

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 022**

51 Int. Cl.:

A61B 10/00 (2006.01)
A61B 10/02 (2006.01)
A61F 13/38 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01)
G01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2020** **PCT/EP2020/068027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2020** **WO20260583**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2020** **E 20734946 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 3989840**

54 Título: **Dispositivo de muestreo para muestras de ensayo biológicas**

30 Prioridad:

28.06.2019 EP 19183233

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
04.11.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE

72 Inventor/es:

NAUWYNCK, HANS;
THEUNS, SEBASTIAAN y
ARNOUTS, SVEN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 985 022 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de muestreo para muestras de ensayo biológicas

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención pertenece al campo de los dispositivos de muestreo para muestras de ensayo biológicas. En particular, la presente invención se refiere a un dispositivo de muestreo para la recogida, el aislamiento y la purificación simultáneos de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación. La solicitud se refiere además a un método para la recogida, el aislamiento y la purificación de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación usando dicho dispositivo de muestreo.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

15 El mercado del diagnóstico espera una revolución con el desarrollo de la tecnología "laboratorio en un chip" que permite realizar PCR, inmunoensayos, recuentos celulares completos, química clínica y secuenciación en dispositivos portátiles. Aunque estas tecnologías innovadoras estarán cada vez más disponibles, un obstáculo importante para la precisión y la velocidad del diagnóstico aún reside en la recogida y purificación de muestras. Esto es válido para los diagnósticos en el lugar de atención, pero es aún más importante para las muestras de diagnóstico enviadas a laboratorios de referencia. Debido al largo tiempo transcurrido entre la recogida de muestras de matrices complejas como sangre, heces y esputo, que incluyen, entre otros, bacterias y enzimas, y su llegada al laboratorio de referencia, es posible que ya se haya producido una degradación parcial o total de los patógenos. Con frecuencia falta una normalización de las metodologías de recogida de muestras, lo que conduce a resultados inexactos por varias razones: metodologías de recogida inadecuadas, dilución excesiva de las muestras, condiciones de almacenamiento deficientes (temperatura, tiempo, fugas), sobrecrecimiento bacteriano, hemólisis en sueros, degeneración (parcial) de agentes infecciosos y desintegración de los ácidos nucleicos de los patógenos. Las matrices de diagnóstico tales como heces, secreciones respiratorias, sangre, orina y semen también contienen impurezas y sustancias (por ejemplo, hemo y metabolitos, polisacáridos ácidos, sales biliares, lípidos...) que tienen efectos inhibidores conocidos en el diagnóstico corriente abajo, tal como PCR (en tiempo real) y secuenciación. Adicionalmente, los diagnósticos habituales con frecuencia pasan por alto los patógenos intracelulares, que se esconden en los leucocitos y, por lo tanto, requieren lisis celular.

El uso de tecnologías de secuenciación de última y tercera generación también se vuelve más importante para el diagnóstico y reemplazará a largo plazo muchos de los ensayos basados en PCR existentes actualmente. Los problemas de enfermedades respiratorias y entéricas son, en su mayoría, el resultado de un complejo de diferentes patógenos, incluyendo virus y bacterias. La detección simultánea de todos los patógenos, conocidos y novedosos, presentes en una muestra sólo es posible usando metagenómica. En este caso, los genomas de los patógenos se secuencian y se comparan con bases de datos de referencia para ver si determinados patógenos están presentes o no. Mientras tanto, se pueden ensamblar genomas completos para proporcionar información sobre cepas para adaptar acciones preventivas/terapéuticas. Esto es imposible con otros procedimientos de diagnóstico.

Un obstáculo para su uso generalizado en el campo es la baja abundancia típica de ácidos nucleicos víricos en una muestra en comparación con los genomas bacterianos y del hospedador. Se necesitan estrategias de enriquecimiento vírico para garantizar que se analicen los virus en lugar de las secuencias de fondo bacterianas y del hospedador. Dichos protocolos incluyen una etapa de centrifugación o ultracentrifugación a baja velocidad, una etapa de filtración y un tratamiento con nucleasas.

Existe una necesidad de dispositivos que permitan la purificación de patógenos en una muestra, en donde los patógenos ya no estén expuestos a la degradación inducida por elementos nocivos en las diferentes matrices y en donde dichos patógenos se puedan analizar con mayor precisión en procedimientos de diagnóstico corriente abajo.

Los dispositivos actualmente disponibles para la recogida de muestras incluyen los dispositivos de torunda clásicos para la recogida de muestras clínicas (por ejemplo, como se divulga en los documentos US5627071, WO04/003515, WO04/086979, WO05/032377, DE10328984, US2009012425 y WO12/093350).

La presente invención proporciona un dispositivo de muestreo que permite la normalización de la recogida y el transporte de muestras y reduce el tiempo para la preparación de las muestras y el intervalo de tiempo entre la recogida de muestras y el diagnóstico.

60 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a un dispositivo de muestreo (100) para la aspiración de muestras, en particular, para la recogida, el aislamiento y/o la purificación de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación. En particular, el dispositivo de muestreo (100) de acuerdo con las diferentes realizaciones de la invención permite específicamente la recogida, el aislamiento y/o la purificación simultáneos de una muestra de ensayo biológica usando sólo una acción de manipulación. Lo típico de la presente invención es que durante la recogida de la muestra

con el dispositivo de muestreo, la muestra de ensayo biológica se puede recoger inmediatamente y transferir a través del cuerpo de soporte del dispositivo de muestreo dentro de un tubo de recogida para su análisis adicional. Por lo tanto, en algunas aplicaciones del dispositivo de muestreo no es esencial volver a sumergir el dispositivo de muestreo en un fluido de recogida para liberar una muestra de ensayo biológica (fluida) de interés dentro de dicho fluido de recogida. Como resultado, se conserva la calidad de la muestra y se reduce la pérdida de material. Opcionalmente, el dispositivo de muestreo de la presente invención todavía se puede sumergir en un fluido de recogida para disolver la muestra de ensayo biológica de interés, por ejemplo, moco, sangre o heces, en dicho fluido de recogida, seguido de la recogida y transferencia inmediata de la muestra de ensayo biológica a través de la punta de torunda y el cuerpo de soporte del dispositivo de muestreo dentro de un tubo de recogida.

La presente invención divulga un dispositivo de muestreo (100) para recoger y aislar una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación, comprendiendo dicho dispositivo de muestreo una punta de torunda (1) y un cuerpo de soporte (2), en donde el cuerpo de soporte tiene una conformación hueca con un primer extremo (3) y un segundo extremo (4), y en donde dicho primer extremo está en conexión fluida con la punta de torunda y más específicamente con la superficie interna de la punta de torunda. Dicho dispositivo de muestreo se caracteriza porque la punta de torunda comprende un material de filtro (8, 9) con un tamaño de poro que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda y porque el cuerpo de soporte (2) está configurado para recoger la muestra a través de la punta de muestra (1) y para transportar la muestra desde su primer extremo (3) hacia su segundo extremo (4).

El dispositivo de muestreo de acuerdo con la presente invención comprende además medios para crear un gradiente de presión negativo a través del dispositivo de muestreo, facilitando de este modo el transporte de la muestra desde la punta de muestra (1) hacia el segundo extremo (4) del cuerpo de soporte a través del primer extremo (2) del cuerpo de soporte. Dichos medios para crear un gradiente de presión pueden ser un dispositivo de jeringa convencional o no convencional. Sin embargo, también se pueden usar otros dispositivos de aspiración capaces de conseguir un gradiente de presión, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos de succión convencionales, aparatos de bombeo de aire, dispositivos de vacío, etc. Aún en otra realización, los medios para crear un gradiente de presión, en particular, un gradiente de presión negativo, también actúan como tubo de recogida; por ejemplo, en dicho caso, los medios para crear un gradiente de presión, en particular, un gradiente de presión negativo, son una jeringa en la que se recoge la muestra de interés.

La punta de torunda de acuerdo con la presente invención se caracteriza normalmente porque comprende un material de filtro (8, 9) con un tamaño de poro que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda y en donde el tamaño de poro de dicho material de filtro es de al menos 5 μm , preferiblemente al menos 10 μm . La punta de torunda de acuerdo con la presente invención también se caracteriza normalmente porque comprende un material de filtro (8, 9) con un tamaño de poro promedio que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda y en donde el tamaño de poro de dicho material de filtro es de al menos 5 μm , preferiblemente al menos 10 μm .

En otro aspecto de la invención, el material de filtro de la punta de torunda es un material de filtro (8) de una sola capa. Incluso en una realización adicional, dicho material de filtro es un material de filtro de una sola capa con un gradiente de tamaño de poro continuo. En dicho aspecto, el tamaño de poro disminuye continua y gradualmente desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda.

En otro aspecto de la invención, el material de filtro de la punta de torunda es un material de filtro (9) de múltiples capas. En otro aspecto, el material de filtro de múltiples capas tiene un gradiente de tamaño de poro discontinuo. Por lo tanto, el material de filtro de múltiples capas de acuerdo con la presente invención comprende 2 o más capas (5, 6) en donde el tamaño de poro de cada capa disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. Por lo tanto, el tamaño de poro disminuye desde la capa externa de la punta de torunda hacia la capa interna de la punta de torunda. En otras palabras, cada capa de dicho material de filtro de múltiples capas comprende un tamaño de poro promedio específico en donde dicho tamaño de poro promedio disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. O dicho de otra manera, cada capa de dicho material de múltiples capas comprende un tamaño de poro promedio específico en donde dicho tamaño de poro promedio específico de la capa externa es mayor que el tamaño de poro promedio de las capas intermedia y/o interna. Como tal, el tamaño de poro promedio de la capa interna es menor que el tamaño de poro promedio de las capas externa y/o intermedia. En un aspecto adicional, dicho material de filtro de múltiples capas comprende 2, 3, 4 o 5 capas. En una realización más preferida, el material de filtro es un material de filtro de múltiples capas que comprende 2 o 3 capas.

Como ya se describió anteriormente, la punta de muestra del dispositivo de muestreo de acuerdo con la presente invención comprende un material de filtro con un tamaño de poro que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. En algunos aspectos de la invención, dicho material de filtro es un material de filtro (9) de múltiples capas. Aún en una realización adicional, el tamaño de poro de la capa externa de dicho material de múltiples capas es de al menos 50 μm ; preferiblemente al menos 100 μm . En otra realización más, el tamaño de poro de la capa interna de dicho material de múltiples capas es de entre 50 μm y 5 μm .

Aún en una realización adicional, el material de filtro comprende un gradiente de tamaño de poro con un tamaño de poro interno de 5-50 μm ; preferiblemente 10-50 μm , y un tamaño de poro exterior de 50-100 μm .

En un aspecto adicional de la invención, la punta de torunda del dispositivo de muestreo comprende además una capa (7) (de tejido) en la superficie externa de la punta de torunda. Aún en una realización adicional, dicha capa (7) comprende poros en donde el tamaño de poro es de al menos 100 μm ; preferiblemente al menos 200 μm . Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, el dispositivo de muestreo de la presente invención comprende una punta de torunda y un cuerpo de soporte, de acuerdo con las diferentes realizaciones, y en donde la punta de torunda comprende un material de filtro con un tamaño de poro que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. En otra realización, el material de filtro tiene un tamaño de poro promedio que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. Complementariamente a dicho material de filtro, la punta de torunda comprende además una capa (de tejido) en su superficie externa. En dicho caso, el tamaño de poro de dicha capa es mayor o igual que el tamaño de poro más grande del material de filtro. En una realización particular, el tamaño de poro de la capa de tejido es de al menos 100 μm ; preferiblemente al menos 200 μm .

En otra realización, la punta de torunda de acuerdo con la presente invención se caracteriza normalmente porque comprende un material de filtro (8, 9) que tiene una densidad que aumenta desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. En un aspecto, la densidad del material de filtro es de al menos 50 g/m^2 , preferiblemente al menos 60 g/m^2 , incluso más preferiblemente al menos 80 g/m^2 .

En otro aspecto de la invención, el material de filtro de la punta de torunda es un material de filtro (8) de una sola capa con una densidad que aumenta continua y gradualmente desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda.

En otro aspecto de la invención, el material de filtro de la punta de torunda es un material de filtro (9) de múltiples capas, en donde la densidad en cada capa aumenta desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. En un aspecto adicional, dicho material de filtro de múltiples capas comprende 2, 3, 4 o 5 capas. En una realización más preferida, el material de filtro es un material de filtro de múltiples capas que comprende 2 o 3 capas.

Como ya se describió anteriormente, la punta de muestra del dispositivo de muestreo de acuerdo con la presente invención comprende un material de filtro con una densidad que aumenta desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. En algunos aspectos de la invención, dicho material de filtro es un material de filtro (9) de múltiples capas. Aún en una realización adicional, la densidad de la capa externa de dicho material de múltiples capas es como máximo de 200 g/m^2 , preferiblemente como máximo 190 g/m^2 . En otra realización más, la densidad de la capa externa de dicho material de múltiples capas es de entre 100 g/m^2 y 200 g/m^2 . En una realización preferida, la densidad de la capa externa de dicho material de múltiples capas es de 190 g/m^2 ; en otra realización preferida, la densidad de la capa externa de dicho material de múltiples capas es de 115 g/m^2 .

En otra realización, la densidad de la capa interna de dicho material de múltiples capas es como máximo de 400 g/m^2 ; preferiblemente como máximo 300 g/m^2 . En otra realización, la densidad de la capa interna de dicho material de múltiples capas es de entre 200 g/m^2 y 400 g/m^2 . En una realización específica, la densidad de la capa interna de dicho material de múltiples capas es de 115 g/m^2 . En otra realización específica, la densidad de la capa interna de dicho material de múltiples capas es de 190 g/m^2 .

Aún en otra realización el dispositivo de muestreo que comprende una punta de muestra con un material de filtro como se ha descrito anteriormente en el presente documento, comprende además una capa adicional en el lado externo de la punta de muestra, que, por ejemplo, es una capa adicional en el lado externo de la punta de muestra, que tiene una función de "raspado" que facilita la recogida de muestras. Dicha capa adicional tiene una densidad de al menos 50 g/m^2 , preferiblemente al menos 60 g/m^2 , incluso más preferiblemente al menos 80 g/m^2 . En otra realización, dicha capa adicional tiene una densidad de entre 50 g/m^2 y 100 g/m^2 ; preferiblemente una densidad de entre 80 g/m^2 y 100 g/m^2 .

Como ya se describió anteriormente, el primer extremo del cuerpo de soporte del dispositivo de muestreo está en conexión fluida con la superficie interna de la punta de torunda. Normalmente, el cuerpo de soporte (2) del dispositivo de muestreo (100) está configurado para recoger la muestra a través de la punta de muestra (1) y para transportar la muestra desde su primer extremo (3) hacia su segundo extremo (4). En otra realización, el primer extremo del cuerpo de soporte termina en una punta abierta. En otra realización, el primer extremo del cuerpo de soporte termina en una punta cerrada. Aún en otra realización el primer extremo del cuerpo de soporte comprende además una o más aberturas (10) en las paredes laterales del mismo. Por lo tanto, en una realización aún más específica, el primer extremo del cuerpo de soporte termina en una punta abierta y comprende además una o más aberturas en sus paredes laterales. En otra realización específica, el primer extremo del cuerpo de soporte termina en una punta cerrada y comprende además una o más aberturas en las paredes laterales del primer extremo del cuerpo de soporte.

Lo típico de la presente invención es que la muestra de ensayo biológica que se ha de recoger y purificar se transfiere a través del material de filtro de la punta de torunda (por ejemplo, mediante aspiración) dentro del cuerpo de soporte (2) hueco. Por lo tanto, en una realización adicional, el dispositivo de muestreo de la presente invención comprende además un tubo de recogida (11) que está en conexión fluida con el segundo extremo (4) del cuerpo de soporte (2).
 Aún en una realización adicional y más específica, se pueden situar uno o más filtros (12) entre el cuerpo de soporte (2) y dicho tubo de recogida (11). En otra realización más, el cuerpo de soporte (2) y el tubo de recogida (11) son iguales. Aún en otra realización, el cuerpo de soporte (2) es también un medio para crear un gradiente de presión negativo (13). Aún en otra realización, el cuerpo de soporte (2) que funciona actúa como medio para crear un gradiente de presión (13) es también un tubo de recogida (11). Por ejemplo, en dicha realización, el cuerpo de soporte es un dispositivo de jeringa.

La presente invención también divulga el uso de un dispositivo de muestreo de acuerdo con todas las realizaciones posibles como se divulgan en el presente documento. En particular, se divulga el uso de dicho dispositivo de muestreo para la recogida y el aislamiento de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra de un sujeto o de una ubicación.

La presente invención proporciona además un método para la recogida y el aislamiento de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación. Dicho método comprende las siguientes etapas:

- raspar con y/o sumergir la superficie externa de la punta de torunda (1) del dispositivo de muestreo (100) de acuerdo con la presente invención en la muestra o en una ubicación;
- recogida de una muestra de ensayo biológica a partir de la muestra o de la ubicación en la superficie externa de dicha punta de torunda;
- transferencia de la muestra de ensayo biológica desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda (1) y adicionalmente dentro del cuerpo de soporte (2) de dicho dispositivo de muestreo; y
- recogida de la muestra de ensayo biológica en el cuerpo de soporte o desde el segundo extremo del cuerpo de soporte de dicho dispositivo de muestreo dentro de un tubo de recogida (11) que está conectado de manera fluida con el segundo extremo (4) del cuerpo de soporte (2),

en donde la recogida y el aislamiento de la muestra de ensayo biológica se realiza usando un gradiente de presión negativo que facilita el transporte de la muestra desde la punta de muestra hacia el segundo extremo del cuerpo de soporte a través del primer extremo del cuerpo de soporte.

El gradiente de presión negativo se puede generar por cualquier medio para crear un gradiente de presión. Dicho medio puede ser un dispositivo de jeringa convencional. Sin embargo, también se pueden usar otros dispositivos capaces de conseguir un gradiente de presión, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos de succión convencionales, aparatos de bombeo de aire, dispositivos de vacío, etc. En otra realización, dichos medios para crear un gradiente de presión actúan como tubo de recogida (11).

En una realización adicional, el método comprende las siguientes etapas:

- raspar con y/o sumergir la superficie externa de la punta de torunda (1) del dispositivo de muestreo (100) de acuerdo con la presente invención en la muestra o en una ubicación;
- recogida de una muestra de ensayo biológica a partir de la muestra o de la ubicación en la superficie externa de dicha punta de torunda;
- opcionalmente llevar la punta de torunda y la muestra de ensayo biológica recogida en un medio líquido;
- transferencia de la muestra de ensayo biológica a través de la punta de torunda (tal como desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda) y adicionalmente dentro del cuerpo de soporte de dicho dispositivo de muestreo;
- recogida de la muestra de ensayo biológica desde el cuerpo de soporte de dicho dispositivo de muestreo dentro de un tubo de recogida (11),

en donde la recogida y el aislamiento de la muestra de ensayo biológica se realiza usando un gradiente de presión.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método para la recogida y el aislamiento de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- raspar con y/o sumergir la superficie externa de la punta de torunda (1) del dispositivo de muestreo (100) de acuerdo con la presente invención en la muestra o en una ubicación recogiendo de este modo una muestra de ensayo biológica en la punta de muestra;
- 5 • conectar el cuerpo de soporte (2) del dispositivo de muestreo a un tubo de recogida (11) en donde el tubo de recogida está en conexión fluida con el segundo extremo del cuerpo de soporte (2) y opcionalmente uno o más filtros que están situados entre el cuerpo de soporte (2) y el tubo de recogida (11) y en donde el tubo de recogida está lleno de un fluido;
- 10 • liberar el fluido desde el tubo de recogida a través del uno o más filtros, el cuerpo de soporte (2) y la punta de torunda dentro de un recipiente de recogida usando un gradiente de presión positiva;
- volver a recoger la muestra de ensayo biológica y el fluido del recipiente de recogida usando un gradiente de presión negativo.

15 En un aspecto adicional de dicho método, el gradiente de presión se puede generar por cualquier medio que sea capaz de crear un gradiente de presión negativo. Dicho medio puede ser un dispositivo de jeringa convencional. Sin embargo, también se pueden usar otros dispositivos capaces de conseguir un gradiente de presión, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos de succión convencionales, aparatos de bombeo de aire, dispositivos de vacío, etc. En otra
20 realización, dichos medios para crear un gradiente de presión actúan como tubo de recogida (11).

25 En un aspecto adicional de dicho método, el fluido presente en el tubo de recogida es cualquier fluido que garantice una buena solubilidad de la muestra de ensayo biológica. En una realización particular, dicho fluido se selecciona de solución salina, agua, una solución tamponada, un medio de transporte de patógenos o cualquier otro tampón de aclarado convencional.

30 En todas las realizaciones posibles de la presente invención, la muestra de ensayo biológica que se ha de recoger y aislar puede ser cualquier muestra de ensayo biológica, preferiblemente la muestra de ensayo biológica se selecciona de bacterias, virus, parásitos, arqueas, hongos y levaduras, en particular, bacterias y virus.

35 Por último, en todos los diferentes aspectos de la invención, la muestra de la que se ha de recoger y aislar la muestra de ensayo biológica puede ser una muestra de agua o una muestra de fluido corporal. En un aspecto adicional, la muestra de agua se selecciona de agua dulce, agua salada, agua salobre y agua residual. Aún en otro aspecto, la muestra de fluido corporal se selecciona de sangre, suero, plasma, moco nasal, esputo, aspirado pulmonar, secreción vaginal, jugo gástrico, saliva, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, leche materna y pus. Aún en otro aspecto, dicha muestra de fluido corporal se recoge de un sujeto. Aún en otro aspecto, la muestra de la que se ha de recoger y aislar la muestra de ensayo biológica se selecciona de tumores sólidos, verrugas, sarcoides o fibromas. En dicho caso, la superficie de la muestra se barre con la punta de muestra del dispositivo de muestreo con el fin de recoger la muestra de ensayo biológica. Por ejemplo, en dicho aspecto, se pueden recoger papilomavirus a partir de sarcoides en caballos.

40 El sujeto se selecciona de un ser humano o un animal no humano; preferiblemente de un ser humano, un mamífero no humano o un no mamífero. Los mamíferos no humanos se seleccionan de primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratones o ratas), cánidos, félidos, équidos, bóvidos, camélidos, óvidos, pócidos, etc. Los no mamíferos se seleccionan de aves, pollos, murciélagos, peces, mejillones, camarones, langostinos, crustáceos, anfibios, reptiles, etc. La presente invención encuentra un uso en investigación, así como en aplicaciones agrícolas (relacionadas con plantas), veterinarias o médicas o no médicas humanas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 Con referencia específica ahora a las figuras, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las diferentes realizaciones de la presente invención únicamente. Se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y sencilla de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se intenta mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención. La descripción tomada con los dibujos hace evidente
55 para los expertos en la materia cómo se pueden realizar en la práctica las diversas formas de la invención.

Fig. 1: Visión de conjunto esquemática de un dispositivo de muestreo de acuerdo con diferentes realizaciones de la presente invención. (A) Dibujo esquemático general; (B) dibujo esquemático de un dispositivo de muestreo que comprende un material de filtro de múltiples capas con gradiente de tamaño de poro discontinuo; (C) dibujo esquemático de un dispositivo de muestreo que comprende un material de filtro de una sola capa con un gradiente de tamaño de poro continuo.

Fig. 2: Visión de conjunto esquemática de un dispositivo de muestreo de acuerdo con diferentes realizaciones de la presente invención. (A) Dibujo esquemático general; (B) dibujo esquemático de un dispositivo de muestreo que comprende un material de filtro de múltiples capas con gradiente de tamaño de poro discontinuo y varias aberturas en la pared lateral del primer extremo del cuerpo de soporte; (C) dibujo

esquemático de un dispositivo de muestreo que comprende un material de filtro de una sola capa con un gradiente continuo de tamaño de poro y varias aberturas en la pared lateral del primer extremo del cuerpo de soporte.

5 Fig. 3: Visión de conjunto esquemática que muestra el método para la recogida y el aislamiento de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra de acuerdo con una realización de la presente invención, y el uso de un dispositivo de muestreo de acuerdo con la presente invención.

10 Fig. 4: Dispositivo de muestreo de acuerdo con una realización de la invención. En esta realización, el dispositivo de muestreo (100) comprende una punta de torunda (1), un cuerpo de soporte (2), uno o más filtros (12) y un dispositivo de recogida (11).

Fig. 5: Visión de conjunto esquemática de diferentes dispositivos de muestreo y/o partes de los mismos.

15 Fig. 6: Recuperación de microesferas de 1 μm , 10 μm , 40 μm y 80 μm de una suspensión aspirada a través del dispositivo de muestreo (A) que comprende una punta de torunda con una capa de tejido y un material de filtro de 2 capas, (B) comprendiendo la punta de torunda sólo la capa de tejido interna del material de filtro, (C) la punta de torunda que comprende sólo la capa de tejido externa del material de filtro, (D) la punta de torunda que comprende sólo la capa de tejido externa, (E) el cuerpo de soporte, (F) el dispositivo de muestreo que comprende una punta de torunda con una capa de tejido y un material de filtro de 2 capas y en conexión con filtros de SFCA de 5 μm y 0,8 μm , (G) sólo paso a través de un filtro de SFCA de 5 μm (G) y (H) sólo paso a través un filtro de SFCA de 0,8 μm (H). Las mediciones de 3 experimentos individuales se muestran mediante puntos. La media y las desviaciones típicas se muestran mediante barras y banderas. * $p < 0,05$: entre la condición sometida a ensayo y el cuerpo de soporte (E).

25 Fig. 7: Títulos infecciosos para diferentes especies víricas tras pasar a través del dispositivo de muestreo y diferentes componentes del dispositivo de muestreo. Se muestra la media $\pm$ desviación típica de títulos de virus infecciosos (DICC₅₀/ml) de al menos 3 experimentos independientes para cada virus. La línea discontinua representa el límite de detección del ensayo de titulación. El filtro de SFCA de 0,8 μm no se sometió a ensayo con adenovirus y, por lo tanto, no se muestran valores.

30 Fig. 8: Influencia del dispositivo de muestreo de la presente invención sobre la carga bacteriana y la capacidad de recuperar bacterias lavando a contracorriente un filtro de SFCA de 0,8 μm . Cargas bacterianas expresadas como log₁₀ de unidades formadoras de colonias por ml. Se muestra la media $\pm$ desviaciones típicas de los títulos de UFC obtenidos durante tres experimentos independientes.

35 Fig. 9: Carga de rotavirus tras la adición de dos diluciones en heces y recogida de muestras con una torunda de algodón (color negro) y el muestreador de la presente invención (color blanco). El panel superior muestra la infectividad vírica en células MA104. El panel inferior muestra las copias del genoma de rotavirus determinadas con RT-qPCR. Se muestra la media $\pm$ desviación típica de tres experimentos independientes.

40 Fig. 10: Número de cultivos de células MA104 en los que se observó sobrecrecimiento bacteriano tras la inoculación con suspensiones fecales recogidas con una torunda de algodón tradicional o el dispositivo de muestreo de la presente invención. Se muestra la media $\pm$ desviación típica de tres experimentos independientes.

45 Fig. 11: (A) Infectividad de PRRSV, gripe y adenovirus tras la adición de diferentes diluciones en moco respiratorio y la recogida de muestras con una torunda de algodón (color negro) y el muestreador completo (color blanco). Para cada virus se muestra el título medio de virus infectivo (DICC₅₀/torunda) $\pm$ desviación típica de tres experimentos independientes. (B) Infectividad del virus de la gripe tras la adición (sin diluir y dilución 1/10) y la recogida con una torunda de algodón (condición A), el dispositivo de muestreo de la presente invención (punta de torunda, cuerpo de soporte) con filtros de SFCA de 5 μm y 0,8 μm y un tubo de recogida (condición B), y el dispositivo de muestreo (punta de torunda y cuerpo de soporte) de la presente invención (condición C)

50 Fig. 12: Copias del genoma de PRRSV cuantificadas tras la adición a la sangre de diferentes concentraciones de virus. Las barras de color negro representan los resultados para las muestras obtenidas del lisado de sangre, sin filtración. Las barras de color blanco representan los resultados obtenidos tras la recogida con el muestreador. La línea discontinua representa el límite de cuantificación de la PCR en tiempo real.

55 Fig. 13: Efecto de la purificación y el tiempo sobre la infectividad del virus de la gripe. Se muestran réplicas individuales para cada punto temporal con puntos (purificadas con filtros de jeringa) o cuadrados (sin purificación de la suspensión de moco). La media y las desviaciones convencional se muestran mediante barras y banderas. El límite de detección de la titulación se muestra con la línea discontinua.

60

65

Fig. 14: Efecto de la purificación y el tiempo sobre la infectividad del virus rotavirus. Se muestran réplicas individuales para cada punto temporal con puntos (purificadas con filtros de jeringa) o cuadrados (sin purificación de la suspensión de moco). La media y las desviaciones convencional se muestran mediante barras y banderas. El límite de detección de la titulación se muestra con la línea discontinua.

Fig. 15: Aplicabilidad directa del dispositivo de muestreo de la presente invención en un proceso de metagenómica vírica. Se adicionaron virus representativos a muestras fecales y de moco y se procesaron con el dispositivo de muestreo de la presente invención en conexión con una serie de filtros de acetato de celulosa exento de tensioactivos de 5 µm y 0,8 µm (barras de color blanco) o un protocolo de metagenómica vírica normalizado como describe Conceição-Neto *et al.*, 2015 (barras de color negro). El panel superior muestra el número total de lecturas y la fracción de lecturas víricas generadas durante la secuenciación. El panel medio e inferior muestra la clasificación taxonómica adicional de las lecturas víricas.

Fig. 16: Enriquecimiento de virus adicionados (A), *Mycoplasma* spp. (B) y bacterias (C) de esputo recogido con el dispositivo de muestreo de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se usan en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes tanto en singular como en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Las expresiones "que comprende", "comprende" y "compuesto por", como se usan en el presente documento, son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método adicionales no citados. La expresión "aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones del +/-20 % o menos, preferiblemente +1-10 % o menos, más preferiblemente +/-5 % o menos, de y a partir del valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean apropiadas para realizarse en la invención divulgada. Se ha de entender que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se divulga específica y preferiblemente. Mientras que las expresiones "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más o al menos un miembros de un grupo de miembros, son claras en sí, mediante ejemplificación adicional, la expresión abarca, entre otras, una referencia a uno cualquiera de dichos miembros, o a dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera >3, >4, >5, >6 o >7, etc. de dichos miembros, y hasta todos dichos miembros. A menos que se defina otra cosa, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos, tienen el significado habitualmente entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. A modo de orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente invención. En los siguientes pasajes se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada uno de los aspectos definidos de este modo se puede combinar con cualquier otro aspecto o aspectos, a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas. La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a "una realización" significa que un rasgo, una estructura o una característica particulares descritos con respecto a la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención.

Los dispositivos de muestreo actuales para la recogida de muestras de ensayo biológicas comprenden normalmente una punta de muestra y un cuerpo de soporte, en donde la punta de muestra se puede usar para raspar o sumergir en la muestra que se ha de recoger, y en donde la muestra de ensayo biológica de interés se recoge primero en la punta de torunda, donde después la punta de la muestra se ha de sumergir en un fluido de recogida para liberar la muestra de ensayo en dicho fluido. Aunque estos dispositivos se usan ampliamente, con frecuencia requieren etapas adicionales para un mayor aislamiento o purificación, tales como ultracentrifugación, etc. Además, la manipulación separada del fluido de recogida también aumenta el riesgo de contaminación adicional y/o pérdida de material de muestra de ensayo.

El dispositivo de muestreo (también denominado en el presente documento "muestreador") de acuerdo con la presente invención permite la recogida, el aislamiento y/o la purificación simultáneos de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra que requiere sólo una acción de manipulación limitada. Este dispositivo ahorra tiempo de procesamiento en los laboratorios y mejora la precisión (especificidad y sensibilidad) de los análisis. En particular, y a diferencia de los dispositivos de muestreo de la técnica anterior, la muestra de ensayo biológica se puede recoger y transferir inmediatamente mediante una punta de torunda y a través del cuerpo de soporte del dispositivo de muestreo dentro de un tubo de recogida. Con la presente invención, no es necesario volver a sumergir el dispositivo de muestreo en un fluido de recogida para liberar una muestra de ensayo biológica en dicho fluido de recogida para su análisis adicional. Como tal, no se requieren manipulaciones adicionales, como el uso de émbolos adicionales, excipientes adicionales, etc., para recoger la muestra para análisis posteriores y, por lo tanto, no existe el riesgo de contaminación adicional y/o degeneración o pérdida del material de la muestra de ensayo que conduzca a pruebas inexactas. se reduce con el presente dispositivo y método. Adicionalmente, el dispositivo y los métodos de la presente invención permiten la recogida y análisis de muestras *in situ* y de manera rápida y normalizada. Opcionalmente, el dispositivo de muestreo de la presente invención todavía se puede sumergir en un fluido de recogida para disolver la muestra de ensayo biológica de interés, por ejemplo, cuando se requiere lisis celular, o cuando la muestra de ensayo biológica no

es fluida, por ejemplo, moco o heces, dentro de dicho fluido de recogida, seguido de la recogida y la transferencia inmediatas de la muestra de ensayo biológica a través de la punta de torunda y el cuerpo de soporte del mismo dispositivo de muestreo dentro de un tubo de recogida.

- 5 Además, mediante el uso de un material de filtro en la punta de torunda, se evita que se recojan partículas más grandes y no deseadas, y también se puede realizar una selección basada en el tamaño de la muestra de ensayo biológica.

10 El dispositivo de muestreo (100) de la presente invención se caracteriza normalmente porque comprende una punta de torunda (1) y un cuerpo de soporte (2), en donde el cuerpo de soporte tiene una conformación hueca con un primer extremo (3) y un segundo extremo (4), y en donde dicho primer extremo está en conexión fluida con la superficie interna de la punta de torunda (Fig. 1A). Además, la punta de torunda comprende un material de filtro (8, 9) con un tamaño de poro que disminuye desde la superficie externa (tal como la superficie en contacto con la muestra) de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda (tal como la superficie en contacto abierto con el cuerpo de soporte), más específicamente en la dirección del flujo del fluido o muestra (Fig. 1B-C). Adicionalmente, el
15 cuerpo de soporte (2) está configurado para recoger la muestra a través de la punta de muestra (1) y para transportar la muestra desde su primer extremo (3) hacia su segundo extremo (4).

20 En otra realización el primer extremo del cuerpo de soporte comprende además una o más aberturas (10) en las paredes laterales del mismo (Fig. 2 A-C). Por lo tanto, en una realización aún más específica, el primer extremo del cuerpo de soporte termina en una punta abierta y comprende además una o más aberturas en sus paredes laterales. En otra realización específica, el primer extremo del cuerpo de soporte termina en una punta cerrada y comprende además una o más aberturas en las paredes laterales del primer extremo del cuerpo de soporte.

25 Como se ha dicho, el cuerpo de soporte (2) del presente dispositivo de muestreo tiene una conformación hueca y, por lo tanto, permite que la muestra de ensayo biológica (15) se transfiera desde la superficie interna de la punta de torunda dentro de dicho cuerpo de soporte y, adicionalmente, a través del cuerpo de soporte dentro de un tubo de recogida (11). En una realización, el cuerpo de soporte y el tubo de recogida son iguales. Por lo tanto, el cuerpo de soporte tiene una conformación hueca que puede tener cualquier forma o diseño (por ejemplo, cilíndrico, hexagonal, etc.). En una realización preferida, el cuerpo de soporte tiene una conformación alargada y/o una conformación
30 sustancialmente en forma de varilla. Por ejemplo, el cuerpo de soporte tiene una configuración de tubo hueco, una configuración de cuboide hueco o una configuración de prisma hueco. En una realización mucho más preferida, el cuerpo de soporte tiene una conformación de tubo hueco. El cuerpo de soporte puede ser de cualquier material y puede ser rígido o semirrígido. En una realización preferida, el cuerpo de soporte está hecho de vidrio, un material plástico, por ejemplo, poliestireno, polipropileno, policarbonato, tereftalato de polietileno o poliamida, cloruro de polivinilo o metal, por ejemplo, aluminio, titanio o acero. En otra realización, el cuerpo de soporte es flexible.

35 Lo típico de la presente invención es que el primer extremo (3) del cuerpo de soporte (2) está en conexión fluida (por ejemplo, a través de una o más aberturas) con la superficie interna (el interior) de la punta de torunda (1) y que dicho cuerpo de soporte (2) está configurado para recoger la muestra a través de la punta de muestra (1) y para transportar la muestra desde su primer extremo (3) hacia su segundo extremo (4). (Fig. 1B-C; Fig. 2 B-C). Como tal, después del paso a través del material de filtro de la punta de torunda, la muestra de ensayo biológica que se ha de recoger se transfiere desde la superficie interna de la punta de torunda dentro del primer extremo del cuerpo de soporte y, adicionalmente, hacia el segundo extremo del cuerpo de soporte. Por lo tanto, la superficie interna de la punta de torunda y el primer extremo del cuerpo de soporte están en conexión fluida entre sí. Aún más, la superficie interna de la punta de torunda y tanto el primer extremo como el segundo extremo del cuerpo de soporte están en conexión fluida entre sí. En una realización específica, la superficie interna de la punta de torunda y el primer extremo del cuerpo de soporte están en contacto con directo y/o están unidos entre sí, tocándose de este modo entre sí. En una realización preferida, el material de filtro de la punta de torunda y el cuerpo de soporte están conectados mediante soldadura térmica o soldadura ultrasónica. En otra realización, el material de filtro de la punta de torunda y el cuerpo de soporte
40 están conectados mediante un pegamento no tóxico que no tiene una repercusión negativa en la muestra de ensayo biológica. Aún en otra realización, el material de filtro de la punta de torunda y el cuerpo de soporte están conectados con un anillo de sellado.

45 El dispositivo de muestreo de acuerdo con la presente invención se caracteriza además normalmente por la presencia de una punta de torunda que comprende un material de filtro con un tamaño de poro que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda (Fig. 1B-C; Fig. 2B-C). Debido a la presencia de este material de filtro, la muestra de ensayo biológica se puede recoger selectivamente basándose en su tamaño y el tamaño de poro del material de filtro. Además, el material de filtro también evita que entren sustancias no deseadas, por ejemplo, impurezas, estructuras de ADN en forma de partículas y grandes, que se han de recoger
50 junto con la muestra de ensayo biológico de interés, aumentando de este modo la pureza de la muestra de ensayo biológico que se ha de recoger. Esto facilitará el uso de las muestras purificadas en vías de diagnóstico molecular corriente abajo (por ejemplo, PCR en tiempo real, PCR, LAMP, secuenciación, aislamiento de virus, ELISA de antígeno o anticuerpo). Por último, el material de filtro también evita la obstrucción del dispositivo de muestreo.

65 El dispositivo de muestreo normalmente es adecuado para la recogida de muestras de ensayo biológicas tales como microorganismos (por ejemplo, bacterias, levaduras, moho, hongos y parásitos) y virus, en particular, virus, bacterias

y parásitos, más en particular virus. Por ejemplo, existen plataformas comerciales de purificación de virus, pero requieren una amplia manipulación de muestras y equipo de laboratorio. También están destinadas a la concentración de virus después de su producción a gran escala en células. Dichos kits y plataformas son caros y, por lo tanto, no son ampliamente aplicables para una preparación *in situ* rápida y económica para aplicaciones de diagnóstico veterinario y humano. Con la presente invención, se proporciona un dispositivo de muestreo que permite una recogida higiénica, rápida y pura de la muestra de ensayo biológico de interés.

El dispositivo de muestreo de la presente invención se caracteriza normalmente porque comprende un material de filtro con un tamaño de poro que disminuye a lo largo de la dirección del flujo de fluido, en particular, desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. En particular, dicho material de filtro tiene un tamaño de poro que aún permite el paso de la muestra de ensayo biológica que se ha de recoger, pero evita el paso de otras sustancias o partículas no deseadas y más grandes. Como resultado, la pureza de la muestra de ensayo biológica que se ha de recoger aumenta considerablemente, dando como resultado muestras representativas en lugar de mezclas sucias de material orgánico. De este modo, el dispositivo de muestreo permite la purificación *in situ* de virus, bacterias, parásitos y otros microorganismos, sin efectos negativos, por ejemplo, sobre la infectividad de virus, bacterias o parásitos. En una realización particular, el material de filtro está exento de tensioactivos.

Por lo tanto, en una realización adicional, el tamaño de poro mínimo del material de filtro es de 5 µm. En una realización adicional, el tamaño de poro mínimo del material de filtro es de 10 µm. Aún en una realización adicional, el tamaño de poro mínimo del material de filtro es de 20 µm.

Un experto sabe cómo determinar el tamaño de poro de un material de filtro. En el contexto de la presente invención, el tamaño de poro de un material de filtro se puede determinar usando diferentes tecnologías, por ejemplo, microscopía electrónica, o evaluando el paso de microesferas (fluorescentes) de un tamaño predefinido a través del material de filtro. En una realización preferida, el tamaño de poro de un material de filtro particular se determina determinando el paso de microesferas fluorescentes de un tamaño predefinido usando un citómetro de flujo o un fluorímetro.

En una realización adicional, el tamaño de poro del dispositivo de muestreo se puede adaptar en función de la muestra de ensayo biológica que se ha de recoger. Por ejemplo, si el dispositivo de muestreo está destinado a recoger sólo virus, el tamaño de poro del material de filtro será diferente del tamaño de poro del material de filtro para un dispositivo de muestreo que también necesita recoger bacterias.

Los tamaños de los virus varían entre 15 nm y 200 nm para aquellos que infectan especies hospedadoras de mamíferos. Los virus no de mamíferos pueden tener un tamaño superior, de hasta 700-800 nm, para los virus de plantas y los virus que infectan amebas. Por lo tanto, en una realización específica, el tamaño de poro del material de filtro de un dispositivo de muestreo para recoger virus específicamente puede ser de al menos 1 µm, pero como máximo de 2 µm. Las dimensiones de las bacterias representativas de los principales filos bacterianos varían entre 700-2000 nm para *Bacteroidetes*, 250-2000 nm para *Proteobacteria*, 500-9000 nm para *Firmicutes* y 600-6000 nm para *Actinobacteria*. Por lo tanto, el tamaño de poro del material de filtro de un dispositivo de muestreo para recoger específicamente bacterias está entre Sum y 10 µm, en particular, al menos 10 µm.

Los ejemplos de parásitos con importancia clínica humana y veterinaria incluyen especies de *Eimeria* tales como *E. acervulina* (18x24 µm), *E. brunetti* (26x22 µm), *E. maxima* (30x20 µm), *E. necatrix* (20x17 µm) y *E. tenella* (23x19 µm) en pollos, *E. meleagridis* (24x18 µm) en pavos, *E. bovis* (28x20 µm) y *E. zuerni* (18x16 µm) en vacas, *E. caprina* (34x23 µm) y *E. ninakohlyakimovae* (21x15 µm) en cabras, *E. deblickei* (18x14 µm) y *E. polita* (26x18 µm) en cerdos, *E. leuckarti* (55x38 µm) en caballos y *E. stiedai* (35x20 µm) y *E. intestinalis* (26x18 µm) en conejos. Las fases infecciosas o quistes (8-12 µm) de *Giardia lamblia/duodenalis* se liberan en las heces y conllevan un riesgo zoonótico.

Son ejemplos de hongos de importancia médica y veterinaria *Microspora canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* y *Candida auris*. Las esporas de hongos tienen un tamaño de 2-4 µm y se pueden unir entre sí formando las denominadas hifas. Las levaduras son hongos unicelulares y tienen un tamaño de aproximadamente 3-6,5 µm x 2,5 µm y para el uso veterinario es importante *Malassezia pachydermatis*.

En una realización, el material de filtro tiene un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 200 o 300 µm, o de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 200 o 300 µm, o de aproximadamente 10 a 150 µm, o de aproximadamente 10 a 100 µm, o de aproximadamente 20 a 200 µm o 300 µm, o aproximadamente de 20 a 150 µm, o de aproximadamente 20 a 100 µm. En particular, el tamaño de poro en el material de filtro (ya sea de una capa o de múltiples capas) disminuye en la dirección del flujo de la muestra o desde el lado exterior al lado interior de la punta de torunda. En un ejemplo específico, la punta de torunda comprende (al menos) dos capas en donde la capa externa tiene un tamaño de poro de aproximadamente 50 a 200 µm, de aproximadamente 50 a 150 µm o de aproximadamente 50 a 100 µm y la capa interna tiene un tamaño de poro de aproximadamente 5 a 50 µm, de aproximadamente 10 a 50 µm, de aproximadamente 20 a 50 µm, de aproximadamente 5 a 40 µm, de aproximadamente 10 a 40 µm, o de aproximadamente 20 a 40 µm.

El material de filtro del presente dispositivo de muestreo puede ser un material de filtro de una sola capa, como se ve, por ejemplo, en la Fig. 1C o la Fig. 2C. En una realización adicional, el material de una sola capa comprende un

gradiente continuo de tamaño de poro que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. En dicho caso, los tamaños de poro cambian y disminuyen gradualmente desde la superficie externa hasta la superficie interna del material de filtro de una capa en la punta de torunda.

En otra realización, hay presente un material de filtro de múltiples capas en la punta de torunda (Fig. 1B; Fig. 2B). En un aspecto adicional, dicho material de filtro de múltiples capas comprende dos o más capas en donde el tamaño de poro disminuye desde la capa externa de la punta de torunda hasta la capa interna de la punta de torunda. En otras palabras, cada capa de dicho material de filtro de múltiples capas comprende un tamaño de poro específico en donde el tamaño de poro de cada capa disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda. En un aspecto adicional, dicho material de filtro de múltiples capas comprende 2, 3, 4 o 5 capas. En una realización más preferida, el material de filtro es un material de filtro de múltiples capas que comprende 2 o 3 capas.

El material de filtro del presente dispositivo de muestreo puede estar hecho de cualquier material conocido en la técnica que permita la presencia de tamaños de poro de acuerdo con las diferentes realizaciones de la invención. En una realización preferida, el material del filtro es a base de poliamida o nylon. Dichos tejidos de nylon se pueden seleccionar, aunque sin limitación, entre tejidos con densidades entre 30 g y 500 g/m², en particular, entre 50 g y 300 g/m². El espesor de los tejidos de nylon puede variar entre 0,10 y 0,80 mm, en particular, entre 0,20 y 0,60 mm. Los ejemplos de dichos tejidos de nylon incluyen tejidos de poliamida con densidades de 190 g/m² o 270 g/m² y un espesor de 0,48 o 0,56 mm. El dispositivo de muestreo de acuerdo con la presente invención comprende además medios para crear un gradiente de presión a través del dispositivo de muestreo, en particular, medios para crear un gradiente de presión negativo que facilita el transporte de la muestra desde la punta de muestra (1) hacia el segundo extremo (4) del cuerpo de soporte a través del primer extremo (2) del cuerpo de soporte. Dichos medios para crear un gradiente de presión, vacío o succión pueden ser un dispositivo de jeringa (o émbolo de jeringa) convencional. Sin embargo, también se pueden usar otros dispositivos o sistemas capaces de conseguir un gradiente de presión, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos de succión convencionales, aparatos de bombeo de bombeo de aire de fontanero de bulto, dispositivos de vacío, etc. En otra realización, los medios para crear un gradiente de presión forman el tubo de recogida. Aún en otra realización, el medio para crear un gradiente de presión forma el cuerpo de soporte del dispositivo de muestreo.

Opcionalmente, la punta de torunda del presente dispositivo de muestreo puede comprender una capa (de tejido) adicional en su superficie externa (la capa externa). En particular, dicha capa adicional está situada sobre la superficie externa del material de filtro de la punta de torunda. Esta capa normalmente se compone de una capa o material suelto que tiene características de raspado o cepillado o capacidad para agarrar material de muestra. Esta capa tiene una superficie no lisa, lo que también se puede conseguir mediante flocado (por ejemplo, usando fibras cortas dispuestas perpendicularmente). Por lo tanto, en una realización particular, la capa adicional sobre la superficie externa de la punta de torunda comprende una pluralidad de fibras cortas que están dispuestas mediante flocado. En otra realización particular, la capa de tejido comprende poros con un tamaño de poro de al menos 100 µm, y normalmente varía de 100 µm a 500 µm. Son ejemplos no limitantes de tejidos adecuados para dicha capa adicional las poliamidas naturales o sintéticas y el algodón. En un ejemplo específico, la punta de torunda comprende tres capas en donde la capa de tejido tiene un tamaño de poro de aproximadamente 100 a 300 µm, la capa externa del material de filtro tiene un tamaño de poro de aproximadamente 50 a 100 µm y la capa interna del material de filtro tiene un tamaño de poro de aproximadamente 10 a 50 µm. En otro ejemplo específico, la punta de torunda comprende tres capas en donde la capa de tejido tiene un tamaño de poro de 200 a 500 µm, la capa externa de la capa de material de filtro tiene un tamaño de poro de 50 a 200 µm y la capa interna del material de filtro tiene un tamaño de poro de 10 a 40 µm.

La presencia de dicha capa de tejido permite recoger la mayor cantidad posible de material orgánico. La capa de tejido se puede usar como superficie de raspado para recoger la muestra de ensayo en una ubicación particular.

Como ya se esbozó anteriormente, la recogida de la muestra de ensayo biológica con el dispositivo de muestreo de la presente invención se puede realizar raspando con la punta de torunda dentro de una muestra de interés o sobre una ubicación de interés (por ejemplo, Fig. 3 A-B). En otro aspecto, la recogida de la muestra de ensayo biológica se puede realizar sumergiendo o introduciendo la punta de torunda dentro de una muestra de fluido (por ejemplo, Fig. 3 C-F). En ambos casos, la punta de torunda garantiza que la muestra de ensayo biológica de interés se recoja durante el raspado en el sitio de recogida, o que la muestra de ensayo biológica se recoja en el dispositivo después de la inmersión de la punta de torunda en una muestra de fluido con el fin de liberar y/o disolver la muestra de ensayo biológica dentro de dicha muestra fluida, en particular, para muestras de ensayo biológicas no fluidas tales como moco o heces, o cuando se requiere lisis celular (por ejemplo, lisis de células sanguíneas). Este es especialmente el caso cuando la consistencia de la muestra de ensayo biológica es demasiado alta, cuando las células necesitan ser lisadas para liberar patógenos intracelulares, o cuando la cantidad de muestra de ensayo biológica es demasiado baja, de manera que no permite la aspiración a través de la punta del dispositivo de muestreo y la posterior recuperación en el segundo extremo del cuerpo de soporte cuando se aplica una presión.

Las muestras que se pueden analizar incluyen muestras clínicas y no clínicas en las que se sospecha o se puede sospechar un crecimiento celular *in vitro* adicional, así como muestras analizadas ocasionalmente para detectar la

presencia de microorganismos o virus. Normalmente, las muestras se pueden analizar directamente con poco o ningún pretratamiento extenso.

Las ubicaciones dentro o sobre un sujeto donde se puede usar la punta de torunda para recoger una muestra de ensayo biológica pueden ser cualquier ubicación dentro o sobre un sujeto. Dichas ubicaciones pueden ser la piel, las vías respiratorias, el esófago, el ano, la vagina, el estómago, la boca, la lengua, la nariz, el oído o cualquier otra ubicación a la que se pueda llegar usando el dispositivo de muestreo. La muestra que se puede recoger durante el raspado puede ser sudor, aspirado pulmonar, secreción vaginal, jugo gástrico, heces, orina, etc.

En otro aspecto, el dispositivo de muestreo se puede sumergir en una muestra de fluido, tal como, por ejemplo, una muestra de fluido corporal (incluyendo secreciones/excreciones). La muestra de fluido corporal se puede seleccionar de sangre, moco respiratorio, aspirado pulmonar, secreción vaginal, jugo gástrico, saliva, orina, heces o líquido cefalorraquídeo. En otro aspecto, la muestra de la que se ha de recoger y aislar la muestra de ensayo biológica se selecciona de tumores sólidos, verrugas, sarcoides o fibromas. En dicho caso, la superficie de la muestra se barre con la punta de torunda del dispositivo de muestreo con el fin de recoger la muestra de ensayo biológica. Para recoger la muestra de ensayo biológica a partir de la muestra, la punta de muestra se puede prehumedecer con un tampón de aclarado. En otro aspecto, después de raspar con la punta de torunda, el dispositivo de muestreo se puede conectar a un tubo de recogida en donde el tubo de recogida está en conexión fluida con el segundo extremo del cuerpo de soporte y en donde el tubo de recogida está lleno de un fluido. La liberación de dicho fluido a través de un gradiente de presión positiva en un recipiente colector da como resultado una solución fluida que comprende la muestra de ensayo biológica. Después, la muestra de ensayo biológica se puede recoger desde el recipiente de recogida a través de la punta de torunda dentro del cuerpo de soporte y el tubo de recogida mediante el uso de un gradiente de presión negativo.

En algunas realizaciones, el dispositivo de muestreo de la presente invención permite la recogida de una muestra de ensayo biológica a partir de un sujeto. Este sujeto puede ser un sujeto vivo o un sujeto muerto. El sujeto puede ser un sujeto sano o un sujeto enfermo. El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano; preferiblemente de un ser humano, un mamífero no humano o un no mamífero. Los mamíferos no humanos se seleccionan de primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratones o ratas), cánidos, felinos, équidos, bóvidos, camélidos, óvidos y pécidos. Los no mamíferos se seleccionan de aves, pollos, murciélagos, peces, mejillones, camarones, langostinos, crustáceos, anfibios, reptiles, etc.

En una realización, la punta de torunda está diseñada para que sea aplicable en orificios pequeños para tomar la muestra (por ejemplo, nariz de animal). El diámetro de la punta puede variar de aproximadamente 0,5 cm a aproximadamente 2 cm, de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 1,5 cm. La punta de torunda del dispositivo de muestreo puede además tener cualquier forma o diseño (por ejemplo, cilíndrico, elipsoidal, esférico, etc.). En una realización preferida, la punta de torunda tiene una conformación de tubo cilíndrico. En otra realización, la punta de torunda tiene una conformación esférica. En otra realización más, la punta de torunda tiene una conformación elipsoidal.

En otro aspecto más, el dispositivo de muestreo de la presente invención también se puede usar para la recogida de muestras de ensayo biológicas en otra ubicación distinta de un sujeto o de otra muestra de fluido que no sea una muestra de fluido corporal. Por lo tanto, en una realización particular, el dispositivo de muestreo se puede usar para la recogida de una muestra de agua a través de raspado en una ubicación particular, por ejemplo, en el fondo de un estanque, un charco, un lago, un río o un mar, o a través de inmersión del dispositivo de muestreo dentro de dicha muestra de agua. Dicha muestra de agua se selecciona de agua dulce, agua salobre, aguas residuales, etc. Otras muestras no clínicas incluyen alimentos, bebidas, productos farmacéuticos, cosméticos, aire, suelo, aguas negras, material vegetal, etc.

Como ya se ha analizado anteriormente, el dispositivo de muestreo de la presente invención es particularmente útil para la recogida de una muestra de ensayo biológica sin el riesgo de que haya otras partículas no deseadas de mayor tamaño presentes en la muestra recogida. El uso de un material de filtro de acuerdo con las diferentes realizaciones descritas en el presente documento garantiza que se evite la recogida de partículas más grandes y no deseadas. El material de filtro también evita la obstrucción del dispositivo con dichas partículas más grandes. En una realización adicional, la obstrucción del dispositivo de muestreo se evita adicionalmente mediante la presencia de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15; o más; en particular aproximadamente y entre 1 y 10; preferiblemente entre 1 y 8) aberturas, aperturas, ranuras o huecos en las paredes laterales del primer extremo del cuerpo de soporte (por ejemplo, Fig. 2 B-C). Dichas aberturas garantizarán una absorción igual de la muestra. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el dispositivo de muestreo comprende una punta de torunda de acuerdo con cualquiera de las posibles realizaciones y un cuerpo de soporte, en donde el cuerpo de soporte tiene una conformación hueca con un primer extremo y un segundo extremo, en donde dicho primer extremo comprende una o más aberturas en las paredes laterales, y en donde el primer extremo está en conexión fluida con la superficie interna de la punta de torunda. Cuando hay presentes una o más aberturas en sus paredes laterales, el primer extremo del cuerpo de soporte puede terminar en una punta cerrada o en una punta abierta. Debido a la presencia de dicha una o más aberturas, se evita la obstrucción de la punta de torunda y se consigue una transferencia más equitativa de la

muestra de ensayo biológica dentro del cuerpo de soporte. La una o más aberturas en la pared lateral del primer extremo del cuerpo de soporte pueden tener cualquier forma (redonda, elipsoidal, cuadrada, rectangular, etc.).

Como ya se ha comentado, la presente invención se refiere a un dispositivo de muestreo para la recogida y el aislamiento de una muestra de ensayo biológica. Por lo tanto, en una realización adicional, el dispositivo de muestreo comprende un tubo de recogida que está en conexión fluida con el segundo extremo del cuerpo de soporte, y en donde el cuerpo de soporte está configurado para recoger la muestra a través de la punta de muestra y para transportar la muestra desde su primer extremo hacia su segundo extremo. Incluso en una realización adicional, hay uno o más filtros integrados en uno o situados entre el cuerpo de soporte y el tubo de recogida (Fig. 4 A-B). Dichos filtros pueden ser cualquier filtro conocido por el experto (por ejemplo, un filtro de nylon, acetato de celulosa, poliéter sulfona, nitrocelulosa, fibras de vidrio, polipropileno, politetrafluoroetileno o difluoruro de polivinilo) y adecuado para la presente solicitud. En una realización particular, dichos filtros son filtros (jeringa) de nylon o acetato de celulosa con un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 6,5 μm , en particular, con un tamaño de poro de 0,1 μm , 0,22 μm , 0,45 μm , 0,8 μm , 1,2 μm , 5 μm , 6 μm o 6,5 μm , e incluso más preferiblemente con un tamaño de poro de aproximadamente 0,8 μm o aproximadamente 5 μm .

Por lo tanto, en una realización, el dispositivo de muestreo comprende una punta de torunda, un tubo de recogida y uno o más filtros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente y entre 4 μm y 6,5 μm , tal como, por ejemplo, 4,0 μm , 4,5 μm , 5,0 μm , 5,5 μm y 6 μm ; y/o uno o más filtros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente y entre 0,1 μm y 1,5 μm , tal como, por ejemplo, 0,1 μm , 0,22 μm , 0,45 μm , 0,8 μm y 1,2 μm . En particular, el filtro es un filtro de acetato de celulosa, más en particular exento de tensioactivos.

La Fig. 5 divulga diferentes tipos de dispositivos de muestreo, de los cuales sólo la Fig. 5E es un dispositivo de muestreo de acuerdo con una realización de la presente invención. La Fig. 5A representa un dispositivo de muestreo que es sólo un tubo hueco, sin presencia de ningún material de filtro. La Fig. 5B representa un tubo cerrado que no permite ninguna recogida de una muestra de ensayo biológica. Las Fig. 5C-D divulgan un dispositivo de muestreo sin punta de torunda que comprende material de filtro. En esos dispositivos de muestreo hay presentes varias aberturas en las paredes laterales del primer extremo del cuerpo de soporte que permiten la recogida de una muestra de ensayo biológica. La Fig. 5E divulga un dispositivo de muestreo similar al dispositivo de la Fig. 5C o la Fig. 5D, pero que incluye una punta de torunda que comprende un material de filtro. En la Fig. 5E, la punta de torunda cubre una o más aberturas en las paredes laterales del primer extremo del cuerpo de soporte.

La presente invención también proporciona un kit de piezas para ensamblar el dispositivo de muestreo como se proporciona en el presente documento. En una realización, dicho kit de piezas incluye un cuerpo de soporte que comprende una punta de torunda como se proporciona en el presente documento, uno o más filtros, un tubo de recogida y un medio para proporcionar un flujo de fluido o gradiente de presión en el dispositivo y, opcionalmente, un recipiente con fluido de recogida.

La presente invención también incluye un método para la recogida y/o el aislamiento de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación. Dicho método comprende las siguientes etapas:

- raspar con y/o sumergir o llevar la superficie externa de la punta de torunda del dispositivo de muestreo de acuerdo con la presente invención en la muestra o en una ubicación;
- recogida de una muestra de ensayo biológica a partir de la muestra o de la ubicación en la superficie externa de dicha punta de torunda;
- opcionalmente llevar la punta de torunda y la muestra de ensayo biológica recogida en un medio líquido;
- transferencia de la muestra de ensayo biológica a través de la punta de torunda (tal como desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda) y adicionalmente dentro del cuerpo de soporte de dicho dispositivo de muestreo; y
- recogida de la muestra de ensayo biológica desde el cuerpo de soporte de dicho dispositivo de muestreo dentro de un tubo de recogida,

en donde la recogida y/o el aislamiento de la muestra de ensayo biológica se realiza usando un gradiente de presión.

Los dispositivos de muestreo de la invención comprenden además un medio para crear un gradiente de presión negativo a través del dispositivo de muestreo. El gradiente de presión negativo se puede generar por cualquier medio para crear un gradiente de presión. Dicho medio puede ser un dispositivo de jeringa convencional. Sin embargo, también se pueden usar otros dispositivos (automáticos o manuales) capaces de lograr un gradiente de presión negativo, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos de succión convencionales, aparatos de bombeo de aire, dispositivos de vacío, etc. Opcionalmente, después del paso a través de la punta de torunda y/o cuerpo de soporte se realiza una etapa de purificación de tamaño transfiriendo la muestra de ensayo biológica a través de uno, dos o más

filtros (sin carga). En el caso de dos o más filtros, estos se colocan tal cual para crear un gradiente de tamaños de poros decrecientes en la dirección del flujo de la muestra.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método para la recogida y el aislamiento de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- raspar con y/o sumergir la superficie externa de la punta de torunda (1) del dispositivo de muestreo (100) de acuerdo con la presente invención en la muestra o en una ubicación recogiendo de este modo una muestra de ensayo biológica en la punta de torunda;
- conectar el cuerpo de soporte (2) del dispositivo de muestreo a un tubo de recogida (11) en donde el tubo de recogida está en conexión fluida con el segundo extremo del cuerpo de soporte (2) y opcionalmente uno o más filtros que están situados entre el cuerpo de soporte (2) y el tubo de recogida (11) y en donde el tubo de recogida está lleno de un fluido;
- liberar el fluido desde el tubo de recogida a través del uno o más filtros, el cuerpo de soporte (2) y la punta de torunda dentro de un recipiente de recogida usando un gradiente de presión positiva;
- volver a recoger la muestra de ensayo biológica y el fluido desde el recipiente de recogida a través de la punta de torunda dentro del cuerpo de soporte y el tubo de recogida mediante el uso de un gradiente de presión negativo.

En un aspecto adicional de dicho método, el gradiente de presión se puede generar por cualquier medio que sea capaz de crear un gradiente de presión positivo y uno negativo. Dicho medio puede ser un dispositivo de jeringa convencional. Sin embargo, también se pueden usar otros dispositivos capaces de conseguir un gradiente de presión, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos de succión convencionales, aparatos de bombeo de aire, dispositivos de vacío, etc. En otra realización, dichos medios para crear un gradiente de presión actúan como tubo de recogida (11).

En un aspecto adicional de dicho método, el fluido presente en el tubo de recogida es cualquier fluido que garantice una buena solubilidad de la muestra de ensayo biológica. En una realización particular, dicho fluido se selecciona de solución salina, agua, una solución tamponada, medio de transporte de patógenos o cualquier otro tampón de aclarado convencional.

En una realización adicional, el método de la presente invención comprende un paso adicional en donde se añade un fluido o líquido adicional a la muestra antes de raspar con y/o sumergir la superficie externa de la punta de torunda en la muestra o en una ubicación. Por ejemplo, cuando se recogen muestras de ensayo biológicas a partir de una muestra de heces, se puede añadir líquido adicional a la muestra de heces para aumentar la fluidez de la muestra. Además, cuando se recogen muestras de ensayo biológicas, por ejemplo, a partir de una muestra tumoral, se puede añadir líquido adicional para optimizar la recogida de la muestra de ensayo biológica. Además de los fluidos fisiológicos, se puede utilizar cualquier otra muestra líquida, tal como agua o tampones de transporte, medio de cultivo celular, tampones de almacenamiento o cualesquier otros productos.

En otra realización del método divulgado, la muestra de ensayo biológica se recoge en un tubo de recogida que está en conexión fluida con el segundo extremo del cuerpo de soporte. Incluso en una realización adicional, se puede aplicar una etapa de tratamiento adicional a la muestra de muestra de ensayo biológica recogida en dicho tubo de recogida. Esta etapa de tratamiento adicional se puede usar para mejorar la calidad o pureza de la muestra de ensayo biológica. Dicha etapa de tratamiento implica infiltración, precipitación, dilución, destilación, mezcla, concentración, inactivación de componentes que interfieren o la adición de reactivos adicionales. Además de los fluidos fisiológicos, se puede usar cualquier otra muestra líquida, tal como agua u otros productos y similares para la realización de cualesquier ensayos corriente abajo. En una realización adicional, el método comprende la etapa de identificar y/o caracterizar la muestra o muestras de ensayo biológicas presentes en la muestra.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes Ejemplos, y no se debe considerar que estos limitan el alcance de la invención a las realizaciones específicas que aparecen en los mismos.

EJEMPLOS

1. Evaluación de los tamaños de poro de los tejidos de poliamida presentes en el dispositivo de muestreo

Los tamaños de poro de las diferentes capas de tejidos de poliamida que se pueden usar como material de filtro en el dispositivo de muestreo de la presente invención se definieron usando microesferas marcadas fluorescentemente de diferentes tamaños.

Materiales

Las microesferas utilizadas en el experimento a continuación se muestran en la Tabla 1.

Las microesferas de 1 μm , 10 μm y 40 μm se analizaron usando un citómetro de flujo Cytotflex (Beckmann Coulter). Las de 80 μm no se analizaron usando el citómetro de flujo Cytotflex para evitar la obstrucción de la boquilla (100 μm de diámetro). Se usó un fluorímetro para evaluar la fluorescencia de las microesferas de 80 μm . Todas las microesferas se manipularon usando puntas de gran diámetro.

Las microesferas fluorescentes se agitaron con formación de vórtice durante 15 segundos, se protegieron de la luz y se almacenaron en hielo entre manipulaciones. Las microesferas de 1 μm y 10 μm eran suspensiones listas para usar. Las microesferas de 40 μm y 80 μm eran partículas secas y se resuspendieron en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (ThermoFischer), seguido de agitación antes de su uso. A continuación, se hicieron diluciones de las microesferas en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (ThermoFischer) dando como resultado un volumen total de 20 ml para su uso en los experimentos. Estas suspensiones se transfirieron a diferentes tubos de recogida de 15 ml (2 ml de suspensión para cada tubo).

Tabla 1. Visión de conjunto de las microesferas y sus propiedades

Tamaño (diámetro)	1 μm	10 μm	40 μm	80 μm
Fabricante y número de catálogo	TermoFischer G0100	TermoFischer CDG1000	TermoFischer 35-7	TermoFischer 35-10
Nombre	Fluoro-Max teñido de color verde	Fluoro-Max teñido	Fluoro-Max de color verde	Fluoro-Max de color verde
	Fluorescente acuoso	Color verde acuoso	Fluorescente seco	Fluorescente seco
	Partículas	Partículas fluorescentes	Partículas	Partículas
Volumen/masa	10 ml (en agua)	10 ml (en agua)	1g, 1ea	1 g, 1 ea.
Composición	Poliestireno	Poliestireno	Poliestireno Divinilbenceno	Poliestireno Divinilbenceno
Color	Color verde	Color verde	Color verde	Color verde
Tipo de colorante	Firefli™ Fluorescente de color verde (468/508nm)	Firefli™ Fluorescente de color verde (468/508nm)	Firefli™ Fluorescente de color verde (468/508nm)	Firefli™ Fluorescente de color verde (468/508nm)
Densidad	1,05 g/cm ³	1,05 g/cm ³	na	na
Concentración	1 % de sólidos	1 % de sólidos	2,83 x 10 ⁷ /gramo	3,54 x 10 ⁶ /gramo
Partículas/ml	1,81 x 10 ¹⁰ /ml	1,81 x 10 ⁷ /ml	na	na

A continuación, se aspiró cada suspensión usando las siguientes condiciones y se recogió en una jeringa:

- A. Dispositivo de muestreo (100) como se presenta en la Fig. 2B, (100), que comprende un cuerpo de soporte con una conformación hueca y varias aberturas en las paredes laterales, y una punta de torunda con un material de filtro con dos capas (capa interna con una densidad de 270 g/m² y capa externa con una densidad de 190 g/m²) y una capa de tejido adicional en el lado externo de la punta de torunda (80 g/m²);
- B. Un dispositivo de muestreo que comprende un cuerpo de soporte con una conformación hueca y varias aberturas en las paredes laterales, y una punta de torunda con un material de filtro con una sola capa (capa 1: tejido de poliamida con una densidad de 270 g/m², mostrado, por ejemplo, en la Fig 2B (5));
- C. Un dispositivo de muestreo que comprende un cuerpo de soporte con una conformación hueca y varias aberturas en las paredes laterales, y una punta de torunda con un material de filtro con una sola capa (capa 2: tejido de poliamida con una densidad de 190 g/m², mostrado, por ejemplo, en la Fig 2B (6));
- D. Un dispositivo de muestreo que comprende un cuerpo de soporte con una conformación hueca y varias aberturas en las paredes laterales, y una punta de torunda con una sola capa de tejido en el lado externo de la punta de torunda (capa 3; tejido de poliamida con una densidad de 80 g/m², Fig 2B (7));
- E. Cuerpo de soporte con aberturas en la pared lateral sin presencia de punta de torunda o capa de tejido externa (Fig 5 C, 10) (control positivo);

F. Dispositivo de muestreo como se presenta en la Fig 2B, (100), que comprende un cuerpo de soporte con una conformación hueca y una punta de torunda con un material de filtro con dos capas (capa interna con una densidad de 270 g/m² y capa externa con una densidad de 190 g/m²) y una capa de tejido adicional en el lado externo de la punta de torunda (80 g/m²) y dicho dispositivo de muestreo está conectado a un filtro de acetato de celulosa exento de tensioactivos (SFCA) de 5 µm y 0,8 µm, respectivamente (Fig 4 A);

G. Aguja de 18 G conectada a un filtro de SFCA de 5 µm;

H. Aguja de 18 G conectada a un filtro de SFCA de 0,8 µm.

El contenido de la jeringa se transfirió a un tubo de recogida de 1,5 ml no esterilizado en autoclave, se almacenó en hielo y se protegió de la luz usando papel de aluminio. Se usaron tubos no tratados en autoclave para evitar la retención de microesferas en las grietas del poliestireno. Las muestras que contenían microesferas de 1 µm, 10 µm o 40 µm se cargaron en placas de 96 pocillos de paredes de color negro para ensayos basados en fluorescencia. El análisis de las microesferas fluorescentes de 1 µm, 10 µm y 40 µm se realizó en un citómetro de flujo Cytoflex usando el software Cytexpert. Al principio, la máquina se lavó y se realizó diariamente un control de calidad usando perlas de QC. Se usaron la señal de fluorescencia y dispersión directa para caracterizar las partículas. Se usó un láser de 488 nm (de color azul) para excitar las microesferas fluorescentes de color verde y la detección se realizó en el canal fluorescente 525/40BP. El recuento de partículas se realizó durante 35 segundos a un flujo de 30 µl por minuto. Para las microesferas de 1 µm, 10 µm y 40 µm, los umbrales se establecieron en 60.277, 278.468 y 300.000, respectivamente. Se realizó un lavado después de cada medición para excluir el arrastre entre muestras. El número de singuletes se contó mediante el citómetro de flujo. El experimento y las mediciones se replicaron para generar un total de 3 mediciones independientes.

Las microesferas de 80 µm se analizaron usando un fluorímetro con excitación a 485 nm y detección de emisión a 527 nm. Se incluyó una serie de diluciones en serie de ½ de las microesferas para permitir la cuantificación de las muestras desconocidas frente a una curva patrón (intervalo entre 35481 y 139 microesferas/ml). Se incluyó una curva patrón en cada repetición. Se adjuntaron dos duplicados para cada punto de dilución de la curva patrón y cada muestra desconocida. El experimento se repitió independientemente tres veces. Se usó regresión lineal para interpolar las incógnitas de la curva patrón.

Las diferencias entre las diferentes condiciones sometidas a ensayo se compararon mediante ANOVA y un ensayo posterior de Holm-Sidak para comparar todas las condiciones sometidas a ensayo contra la muestra recogida usando el cuerpo de soporte (E). Los valores de p se ajustaron para tener en cuenta comparaciones múltiples.

Resultados

Los resultados de los experimentos con las microesferas de 1 µm, 10 µm, 40 µm y 80 µm se muestran en la Fig. 6. En comparación con el número de perlas recuperadas a través del cuerpo de soporte sin punta de torunda, que sirve como control positivo (E), no se puede observar ninguna reducción de microesferas de 1 y 10 µm cuando la aspiración se realiza a través del dispositivo de muestreo o de las capas individuales (1, 2 y 3) de la punta de torunda (A, B, C, D). Por el contrario, el número de microesferas de 1 µm se reduce con un factor de aproximadamente 3,4 log₁₀ cuando el dispositivo de muestreo que comprende 3 capas de tejido está conectado a los filtros de SFCA (F) de 5 µm y 0,8 µm mencionados anteriormente ($p < 0,0001$, media $\pm$ DT $6,96 \pm 0,11$ frente a $3,56 \pm 0,33$ log₁₀ microesferas/ml), un efecto provocado principalmente por el filtro de 0,8 µm ($p < 0,0001$, $3,80 \pm 0,40$). Esto es una ventaja para el uso del muestreador, por ejemplo, en un proceso de metagenómica vírica, ya que las células hospedadoras, bacterias u otros patógenos con un tamaño similar o mayor se reducen considerablemente y se evita la secuenciación del ADN de fondo.

El dispositivo de muestreo o sus diferentes capas de tejidos no tuvieron una repercusión negativa sobre las microesferas de 10 µm ($p > 0,05$) (A, B, C, D). No se observaron microesferas después del paso a través del dispositivo de muestreo que comprende 3 capas de tejido en conexión con los filtros de SFCA (F) de 5 µm y 0,8 µm mencionados anteriormente ($p < 0,0001$), el filtro de SFCA de 5 µm (G) ($p < 0,0001$) y el filtro de 0,8 µm (H) ($p < 0,0001$).

El dispositivo de muestreo y las diferentes capas de la punta de torunda no tuvieron una repercusión significativa en las microesferas de 40 µm en comparación con el tubo de soporte sin punta de torunda ($p > 0,05$). Lógicamente, las microesferas de 40 µm no se detectaron después de la recogida con el dispositivo de muestreo en conexión con los filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm mencionados anteriormente (F) ($p < 0,0001$), el filtro de 5 µm (G) ($p < 0,0001$) o el filtro de 0,8 µm (H) ($p < 0,0001$).

Por último, las microesferas de 80 µm no se detectaron después del paso a través del dispositivo de muestreo (A) o la primera capa más densa de la punta de torunda (B) y, por lo tanto, fueron significativamente diferentes del número de microesferas detectadas después de la recogida con el cuerpo de soporte sin punta de torunda (E) ($p < 0,0001$). Se observó una reducción de microesferas de aproximadamente 225 veces después del paso a través de la segunda capa de tejidos (C) ($p < 0,0001$) en comparación con la recogida con el cuerpo de soporte ($4,53 \pm 0,10$ frente a $2,17 \pm$

1,03). Lógicamente, tampoco se detectaron las microesferas de 80 µm después de la recogida con el dispositivo de muestreo en conexión con los filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm mencionados anteriormente (F) ($p < 0,0001$), el filtro de 5 µm (G) ($p < 0,0001$) o el filtro de 0,8 µm (H) ($p < 0,0001$).

5 **2. Uso de un muestreador para la aspiración de suspensiones turbias**

2A. Aspiración de suspensiones fecales con una torunda de algodón clásica (técnica anterior)

10 En primer lugar se sometió a ensayo la capacidad de una torunda de algodón clásica para aspirar suspensiones fecales. En el segundo extremo se cortó una torunda de algodón con un rayón plástico, compuesta por un primer extremo (punta de algodón), cuerpo de soporte y un segundo extremo. Se insertó una aguja de calibre 18 en el segundo extremo y se conectó a una jeringa de 5 ml con un émbolo de goma (Terumo). La punta de torunda se sumergió en un recipiente con heces de cerdo y después se transfirió dentro de 1 a 5 ml de solución salina tamponada con fosfato. La suspensión se agitó durante 10 segundos y la suspensión se aspiró usando la presión ejercida por la jeringa.

15 Se experimentó una alta resistencia al ejercer presión sobre la jeringa para aspirar las suspensiones fecales de todas las muestras y esto sería una gran desventaja práctica durante el procesamiento *in situ* rápido de muestras en el campo. Los volúmenes aspirados se muestran en la Tabla 2:

Heces resuspendidas en un volumen de PBS (ml)	Volumen aspirado
5	1,4 ml
3	1,6 ml
2	1,5 ml
1	0,9 ml

2B. Capacidades de filtrado de los tejidos de poliamida

25 En este experimento se compararon las capacidades de filtración de diferentes tejidos de poliamida mediante aspiración de suspensiones fecales. El objetivo era seleccionar un material y un tejido de filtro con capacidad filtrante, sin tener que ejercer altas presiones durante la aspiración.

Métodos

30 Se seleccionaron dos tejidos de poliamida con un peso de 115 g/m² o 270 g/m² y se compararon entre sí.

35 Los tejidos de 115 g/m² y 270 g/m² se cubrieron cada uno con una capa externa suelta y menos densa (densidad de 80 g/m²) para capturar la muestra de ensayo de muestra. Estos tejidos de poliamida estaban en conexión fluida con el cuerpo de soporte, que contenía en su primer extremo ocho aberturas en las paredes laterales. Las heces se recogieron con ambos dispositivos de muestreo y se transfirieron directamente a tubos de recogida llenos con 4 ml de medio de transporte. A continuación, se raspó la punta de torunda contra la pared del tubo de recogida para homogeneizar la suspensión fecal y se aspiró usando una jeringa. Se usaron diferentes criterios para determinar la capacidad de filtración: el volumen aspirado, la potencia manual necesaria para aspirar la suspensión fecal y la transparencia del filtrado se juzgaron subjetivamente (a simple vista) y objetivamente (espectrofotometría). La absorbancia de luz de las suspensiones se midió usando un espectrofotómetro y el medio de transporte se usó como blanco.

Resultados

45 Los resultados de la comparación entre ambos tejidos se muestran en la Tabla 3:

Criterios	Tejido 115 g/m ² + 80 g/m ²	Tejido 270 g/m ² + 80 g/m ²
Volumen aspirado	3 ml	1,5 ml
Fuerza de aspiración	Baja	Baja
Transparencia subjetiva	turbia	relativamente transparente
Transparencia objetiva (absorbancia)	>2,0 A	1,93A

50 El mayor volumen aspirado de suspensión fecal se retuvo usando el tejido con la menor densidad (115 g/m²). Sin embargo, este tejido demostró capacidades de filtración deficientes y dio como resultado una suspensión turbia en

comparación con el tejido de 270 g/m². La absorbancia se midió con un espectrofotómetro, pero la muestra obtenida con los tejidos de 115 g/m² estaban fuera de las capacidades de medición del dispositivo, lo que confirma la turbidez alta. Por el contrario, la absorbancia de la suspensión generada con la capa de 270 g/m² fue mucho más baja en A1.93 e indicativa de un efecto de filtrado más fuerte con sólo una cantidad limitada de potencia necesaria para la aspiración. Esta facilidad de uso también sería una ventaja si es necesario conectar diferentes filtros con tamaños de poro más pequeños (5 µm y 0,8 µm) al dispositivo de muestreo para una filtración adicional.

Sin embargo, cuando este dispositivo de muestreo cubierto con tejidos de 270 g/m² y 80 g/m² se conectó a un filtro de acetato de celulosa exento de tensioactivos de 0,8 µm, fue relativamente difícil aspirar la suspensión fecal debido a la rápida obstrucción del filtro de SFCA y sólo se pudieron recoger 0,5 ml de fluido transparente.

Por lo tanto, se decidió que aplicar una capa adicional intermedia de 190 g/m² en la punta de torunda sería beneficioso para que actuase como tamiz adicional. La punta de torunda del dispositivo de muestreo compuesta de capas posteriores de 270 g/m², 190 g/m² y 80 g/m² resultó ser una buena combinación y condujo a la recuperación de 2,8 ml de suspensión fecal. Este dispositivo de muestreo cuya punta de torunda se compone de tres capas de tejidos de poliamida se usó posteriormente en los experimentos que se describen a continuación.

3. Influencia del muestreador sobre la infectividad vírica de virus puros cultivados en cultivo celular

El objetivo del experimento era demostrar la ausencia de efectos negativos del dispositivo de muestreo (que comprende una punta de torunda compuesta por tres capas de tejidos), el dispositivo de muestreo conectado a filtros de acetato de celulosa exentos de tensioactivos de 5 µm y 0,8 µm, o los filtros de celulosa de 5 µm y 0,8 µm individualmente. Se evaluó la infectividad de diferentes virus con una amplia gama de características (composición genómica, tamaño, estructura, resistencia...) aplicando las condiciones mencionadas anteriormente. Conservar la infectividad vírica es importante para el diagnóstico y permite aislar el virus en cultivos celulares. Esto es beneficioso para el desarrollo de nuevas vacunas candidatas para aplicaciones humanas y veterinarias, o para la producción de autovacunas en medicina veterinaria. Tener la capacidad de filtrar impurezas y bacterias también conducirá a muestras víricas más puras, reduciendo el fondo y las posibilidades de señalización falsa positiva en análisis corriente abajo y reduciendo la capacidad de contaminación microbiológica no deseada tras la inoculación en células susceptibles.

Los virus se cultivaron en cultivos celulares y se enriquecieron con solución salina tamponada con fosfato.

Métodos

Se cultivaron seis virus porcinos con diferentes características de virus en sus respectivas células hospedadoras para preparar soluciones madre de virus, que se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Todos los virus se sometieron a ensayo en experimentos separados.

1° virus de la gripe porcina

* cepa Sw/Ghent/28/10/H1 N1 (Qiu *et al.*, 2015, *Veterinary Research*)

* genoma de ARN monocatenario segmentado y negativo (13,5 kb)

* tamaño de 80-120 nm,

* envuelto

* estirpe celular hospedadora: Células de riñón caninas Madin-Darby (MDCK)

2° virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés)

* cepa 13V091 (Frydas *et al.*, 2015, *Veterinary Research*)

* ARN monocatenario no segmentado y positivo (15 kb),

* tamaño de 45-65 nm

* envuelto

* estirpe celular hospedadora: Células Marc

3° herpesvirus equino 1

* cepa 03P37 (Garré *et al.*, 2007, *Veterinary Microbiology*)

* ADN bicatenario no segmentado (150 kb)

* tamaño de 150-200 nm

5 * envuelto

* estirpe celular hospedadora: Células RK-13

4° circovirus porcino 2 (PCV2, por sus siglas en inglés)

10 * cepa Stoon 10/10 (Ellis *et al.*, 1998, *Can Vet J*)

* ADN monocatenario circular y positivo (1,7 kb)

15 * tamaño de 17 nm

* no envuelto

20 * estirpe celular hospedadora: células de riñón porcinas (PK)-15

5° rotavirus A

* cepa RVA/Pig-tc/BEU12R046/2012/G9P (Theuns *et al.*, 2015, *Journal of Virology*)

25 * ARN bicatenario segmentado (18,5 kb)

* tamaño de 80-100 nm

30 * no envuelto

* estirpe celular hospedadora: Células MA104

6° adenovirus porcino

35 * cepa 13V091 (resultados no publicados, aislada en el Laboratorio de Virología)

* ADNbc no segmentado (35 kb)

40 * tamaño de 90 nm

* no envuelto

* estirpe celular hospedadora: células de riñón porcinas (SK)

45 Las soluciones madre de virus se descongelaron y centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se preparó una dilución 1/50 v/v de cada cepa de virus en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Ca^{2+} y Mg^{2+} excepto para el virus del herpes equino, que se diluyó 1/200 (v/v) debido al alto título de la solución madre.

50 Las suspensiones de virus se aspiraron a través de los siguientes componentes:

- el dispositivo de muestreo que comprende una punta de torunda con tres capas (270 g/m², 190 g/m² y 80 g/m²) de tejidos (torunda de Nylon),
- 55 • un filtro de acetato de celulosa exento de tensioactivos (SFCA, por sus siglas en inglés) de 5 µm (Sartorius) (SFCA de 5,0 µm),
- un filtro de SFCA de 0,80 µm (Sartorius) (SFCA de 0,80 µm) y
- 60 • el dispositivo de muestreo que comprende una punta de torunda con tres capas (270 g/m², 190 g/m² y 80 g/m²) de tejidos en conexión a un filtro de SFCA de 5 µm y 0,8 µm (Muestreador).

65 La dilución de virus que se realizó sirvió como control positivo, mientras que PBS sirvió como control negativo para excluir la contaminación cruzada. Todas las muestras se almacenaron en hielo entre las etapas de manipulación. Para cada especie vírica, el experimento se ejecutó al menos tres veces y los títulos de virus infecciosos se evaluaron inmediatamente mediante titulación de infectividad en las células hospedadoras respectivas. Se inocularon diluciones

en serie de 10 veces de las muestras durante 1 h a 37 °C y CO₂ al 5 % para la mayoría de los virus excepto el virus de la gripe, que se inoculó durante 2 h. A continuación, se añadieron 100 µl de medio de cultivo celular antes de la incubación de las células durante 4 a 10 días, dependiendo de la especie vírica. Como se describe en la bibliografía, se incluyó tripsina en el medio de inoculación y cultivo celular del rotavirus y el virus de la gripe, para potenciar la infección. Los efectos citopatógenos se evaluaron usando un microscopio óptico y los títulos de virus infecciosos se determinaron usando la fórmula de Reed y Muench.

Se realizó un ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis en GraphPad Prism (versión 6) para evaluar las diferencias entre las condiciones sometidas a ensayo. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se realizó un ensayo de Dunn posterior para realizar comparaciones múltiples y para evaluar qué condiciones eran significativamente diferentes.

Resultados

Los resultados de la titulación de la infectividad tras el paso de las suspensiones de virus a través de los diferentes componentes del muestreador se muestran en la Fig. 7. No se observaron diferencias significativas entre las condiciones sometidas a ensayo y el control positivo para PCV2 ($p = 0,4444$), PRRSV ($p = 0,1863$), rotavirus ($p = 0,1130$), adenovirus ($p = 0,8364$), virus de la gripe ($p = 0,4409$) y herpesvirus equino 1 ($p = 0,2591$). Los posibles efectos del filtro de SFCA de 0,8 µm sobre el adenovirus porcino no se sometieron a ensayo por separado, pero se pueden excluir ya que el muestreador completo no indujo un impacto negativo sobre la infectividad vírica. Se puede concluir que el dispositivo de muestreo de acuerdo con la presente invención no ejerce ningún efecto negativo sobre la infectividad de diferentes tipos de virus.

4. Influencia del muestreador sobre ADN que flota libremente de alto peso molecular de origen bacteriano.

El objetivo del experimento era demostrar la capacidad del dispositivo de muestreo para capturar cadenas de ADN grandes. Esto sería beneficioso para ensayos moleculares corriente abajo, tales como PCR, PCR en tiempo real, PCR digital, LAMP y secuenciación, ya que reduce la posibilidad de amplificación o detección del ADN de fondo mediante cualquier forma de PCR o secuenciación. Las cadenas grandes de ADN también son difíciles de digerir usando nucleasas.

Métodos

Una suspensión bacteriana de *Escherichia coli DH10B* Se cultivó durante la noche en medio LB durante 18 h a 37 °C en un agitador. Las células bacterianas se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en un tampón (Tris-Cl 50 mM (pH 8,0) y EDTA 10 mM) al que se le añadieron SDS y proteinasa K para la lisis a 50 °C durante 1 h. A continuación, se añadió una cantidad igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se mezclaron agitando hasta que se formó una emulsión de color blanco. La emulsión se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a 4 °C para separar la fase acuosa de la fracción líquida generando al mismo tiempo una fracción rica en proteínas. La fase acuosa superior se recogió sin alterar la interfase rica en proteínas. De nuevo, se añadió una cantidad igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se repitió el proceso para mejorar la pureza. Por último, el ADN se precipitó en la fase acuosa usando etanol absoluto que contenía NaCl 0,03 M y centrifugación a 13.000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se desechó cuidadosamente. Se realizó una etapa de lavado con etanol al 70 % mediante centrifugación durante 5 min a 13.000 rpm y 4 °C. A continuación, el sedimento se secó a 50 °C y se resuspendió en tampón de Tris-EDTA (Tris 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM). El ADN se almacenó a 4 °C y se demostró la presencia de grandes estructuras de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

A continuación, el ADN purificado se diluyó en agua exenta de nucleasas y se aspiró con:

- 1) una aguja conectada a una jeringa,
- 2) el dispositivo de muestreo con una punta de torunda que comprendía tres capas de tejidos de la presente invención, o
- 3) el dispositivo de muestreo conectado a los filtros de SFCA de Sum y 0,8 µm mencionados anteriormente.

Se usó agua como control y se sometió a las mismas manipulaciones. A continuación, los sobrenadantes resultantes se cargaron en un gel de agarosa al 1 %. Se cargó Smartladder (Eurogentec, 10 kb (banda superior) a 200 pb (banda inferior)) para evaluar los tamaños del ADN de *E. coli* purificado. El gel de agarosa se hizo funcionar durante 30 min a 100 mv y los ácidos nucleicos se visualizaron usando bromuro de etidio y luz ultravioleta.

Resultados

En la muestra aspirada usando únicamente una aguja y una jeringa había ADN de alto peso molecular con un tamaño de >10 kb. Sin embargo, la torunda y el muestreador completo retuvieron grandes fracciones de ADN bacteriano con un tamaño de >10 kb (no se muestran los resultados).

5. Efecto del dispositivo de muestreo o sus componentes sobre las bacterias y la capacidad de recuperar estas bacterias de un disco de filtro

El objetivo del experimento era demostrar la ausencia de retención de bacterias en el dispositivo de muestreo de la presente invención tras la aspiración de líquido. El objetivo era mostrar una reducción en la carga bacteriana en el filtrado que pasó a través del filtro de 0,8 µm para garantizar que las bacterias se separen de los virus. Por último, se sometió a ensayo si el filtro de 0,8 µm se podía usar para recoger las bacterias atrapadas por medio de lavado a contracorriente con solución salina fresca tamponada con fosfato.

Métodos

En un primer experimento, la cepa BL21 de *Escherichia coli* se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) que contenía ampicilina. Se preparó una suspensión del caldo bacteriano en PBS y se recogió 1 ml de esta suspensión usando (1) un dispositivo de muestreo que comprendía 3 capas de tejido (270, 190 y 80 g/m²), (2) el dispositivo de muestreo en conexión con los filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm mencionados anteriormente (3) una aguja de 18G conectada a una jeringa como control positivo. Las suspensiones se transfirieron a tubos de recogida de 1,5 ml y se almacenaron en hielo. El dispositivo de muestreo estaba compuesto por las tres capas de tejidos de poliamida descritas anteriormente y el primer extremo del cuerpo de soporte comprende una punta cerrada pero tenía ocho aberturas redondas en la pared lateral. Dichas aberturas redondas se crearon con una aguja de 18G (diámetro de 1,27 mm).

En la segunda parte del experimento, el filtro de SFCA de 0,8 µm se separó de los otros componentes del muestreador y se aspiraron 1000 µl de PBS nuevo dentro de una jeringa nueva y se usaron para lavar a contracorriente las bacterias en la otra dirección. Esta suspensión se recogió en un tubo de recogida de 1,5 ml y se almacenó en hielo.

A continuación, se prepararon series de diluciones 1/10 en serie en caldo Luria-Bertani para todas las muestras. Estas suspensiones se inocularon (200 µl) en placas de Petri (58 cm²) que contenían agar LB que contenía ampicilina. Se añadieron perlas de vidrio estériles y se usaron para esparcir el inóculo uniformemente sobre el agar. Se retiraron las perlas de vidrio y se incubaron placas de Petri con el agar boca abajo durante 24 horas a 37 °C antes de contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Este experimento se ejecutó independientemente tres veces.

Se realizó un ensayo ANOVA para comparar los títulos de UFC de las diferentes muestras. Se realizaron múltiples comparaciones entre el control positivo y las condiciones sometidas a ensayo usando el ensayo posterior de Dunnett.

Resultados

El dispositivo de muestreo de la presente invención no tuvo una repercusión negativa sobre la carga bacteriana en comparación con el control positivo (6,52 ± 0,12 frente a 6,35 ± 0,18 log₁₀ de UFC/ml, sin diferencia significativa) (Fig. 8). Usando el dispositivo de muestreo en conexión con los filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm, sólo se recuperaron 4,90 ± 0,04 log₁₀ de UFC/ml de bacterias, dando como resultado una reducción de 28 veces de las bacterias en el filtrado o una diferencia media de 1,453 log₁₀ de UFC/ml (valor de p < 0,05). Adicionalmente, fue posible lavar a contracorriente las bacterias que quedaron atrapadas en el filtro de SFCA de 0,8 µm (6,16 ± 0,93 log₁₀ de UFC/ml, sin diferencia significativa con el control positivo).

6. Purificación de virus y detección potenciada usando el muestreador para la detección de virus fecales

El objetivo del experimento era imitar el muestreo de virus entéricos a partir de heces usando un experimento de adición *in vitro*. El rendimiento del dispositivo de muestreo con una punta de torunda compuesta por tejidos de 270, 190 y 80 g/m² en conexión con los filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm mencionados anteriormente se comparó con el de una torunda de algodón tradicional. La detección de virus entéricos enriquecidos se ejecutó usando titulación de la infectividad vírica y PCR en tiempo real.

Métodos

Se recogió estiércol de cerdo del suelo de un establo donde se alojaban lechones de 6 semanas de edad. Estos lechones recibieron harina de cerdo normal y estaban sanos. Para obtener lotes de heces de referencia, las heces se dividieron en alícuotas en recipientes fecales y se almacenaron a -20 °C hasta su uso en experimentos de adición.

Se cultivaron dos cepas de rotavirus porcino, RVA/Pig-tc/BEL/12R046/2012/G9P (10^{5,93} DICC₅₀/ml) y RVA/Pig-tc/BEL/12R050/2012/G5P (10^{8,63} DICC₅₀/ml) en cultivos de MA104 y se adicionaron a las heces de referencia (Theuns *et al.*, 2014, *Veterinary Microbiology*; Theuns *et al.*, 2015, *Journal of Virology*). Se pesaron las heces (1,6 g), se añadieron a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugaron. A continuación, se adicionaron 400 µl de soluciones madre de rotavirus sin diluir o diluidas 1/10 sobre las heces y se agitaron durante 15 s, seguido de una breve centrifugación para sedimentar las heces en el fondo del tubo. De cada tubo, en primer lugar se recogió una muestra usando la punta de una torunda de algodón tradicional y se transfirió a un tubo de recogida de 15 ml (condición A) que contenía 4 ml de medio de transporte. A continuación, el dispositivo de muestreo que comprendía tres capas de tejidos se usó para

recoger materia fecal y se transfirió a otro tubo de recogida que contenía 4 ml de medio de transporte (condición B). Se frotaron ambas puntas de las torundas durante 5 segundos contra la pared del tubo de recogida, dando como resultado una suspensión fecal adecuada. A continuación, se recogió 1 ml de la suspensión fecal del tubo de la condición A usando una pipeta serológica de poliestireno de 1 ml (Greiner Bio One). A continuación, el dispositivo de muestreo se conectó a filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm y una jeringa para aspirar la suspensión fecal del tubo de recogida de la condición B. Ambas suspensiones fecales se transfirieron a un tubo estéril de 1,5 ml y se almacenaron en hielo hasta su procesamiento adicional. Estos experimentos se repitieron independientemente tres veces.

Las suspensiones recogidas en ambas condiciones A y B se titularon inmediatamente en células MA104 para determinar el título infectivo del virus. El efecto citopatógeno se evaluó después de 4-5 días con un microscopio óptico y los títulos se calcularon usando la fórmula de Reed y Muench.

Parte de la muestra se usó para la lisis vírica y la purificación de los ácidos nucleicos víricos con el QIAamp Cador Pathogen Mini Kit (Indical) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las copias de genoma de rotavirus A se cuantificaron usando una RT-qPCR interna dirigida al segmento del gen NSP5 (Theuns *et al.*, 2014, *Veterinary Microbiology*).

Resultados

Los resultados de la titulación de infectividad y la cuantificación de copias del genoma se muestran en la Fig. 9. Hubo una tendencia hacia una mayor sensibilidad del dispositivo de muestreo de la presente invención en comparación con la torunda tradicional cuando se tituló el rotavirus, aunque la diferencia entre ambos métodos de muestreo no fue estadísticamente significativa ($p = 0,3016$). Sin embargo, se observó un efecto secundario interesante durante los análisis por microscopía óptica de los pocillos inoculados. Como las heces son ricas en bacterias, existe el riesgo de un sobrecrecimiento bacteriano en los pocillos que se inoculan con diluciones de suspensiones fecales. Se contaron todos los pocillos de las placas que contenían sobrecrecimiento bacteriano. Había presente un mayor número ($p = 0,0038$, ensayo t no apareado) de pocillos ($n = 24 \pm 1,414$ pocillos, media $\pm$ DT) con sobrecrecimiento bacteriano en los pocillos inoculados con suspensiones fecales recogidas con una torunda de algodón tradicional en comparación con las muestras filtradas que se recogieron usando el nuevo muestreador completo ($n = 1 \pm 1,414$) de la presente invención (Fig. 10). Esto es una ventaja cuando es necesario aislar virus de heces con el fin de poder expandir la cepa, por ejemplo, para el futuro desarrollo de vacunas en medicina humana o veterinaria o la producción directa de autovacunas en medicina veterinaria. Es importante destacar que la sensibilidad de la cuantificación del virus usando PCR en tiempo real mejoró significativamente ($p = 0,0124$, ensayo t apareado) para las muestras recogidas con el muestreador de la invención en comparación con las muestras recogidas con una torunda de algodón tradicional (media $\pm$ DT de las diferencias = $0,3038 \pm 0,1141 \log_{10}$ de copias del genoma del rotavirus A/torunda). Esto conduce a una detección/cuantificación más precisa y sensible de los virus en las heces. La mayoría de los virus entéricos se eliminan con cargas víricas elevadas, pero ejemplos tales como el poliovirus en medicina humana requieren herramientas sensibles, ya que plantean un riesgo extremadamente alto para la salud pública.

7. Purificación de virus y detección potenciada usando el muestreador para virus en moco

El objetivo del experimento era imitar el muestreo de virus respiratorios a partir de moco respiratorio usando dos experimentos de adición *in vitro*.

En un primer experimento (Fig. 11A), se comparó el rendimiento del dispositivo de muestreo en conexión con los filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm mencionados anteriormente con una torunda de algodón tradicional.

En un segundo experimento (Fig. 11B), se realizó una comparación entre la recogida del moco respiratorio usando el dispositivo de muestreo (condición C), el dispositivo de muestreo con filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm (condición B) y torundas de algodón (condición A).

En ambos experimentos, la detección de los virus adicionados se realizó usando titulación de la infectividad vírica en las estirpes celulares hospedadoras respectivas.

Métodos

Se aisló moco respiratorio porcino de tráqueas que se recogieron en un matadero belga. El moco se recogió raspando la mucosa traqueal con el dorso de la hoja de un bisturí como se describió anteriormente. El moco se transfirió a tubos de 1,5 ml y se almacenó a -70°C .

En el primer experimento, se adicionó moco ($0,5 \text{ cm}^2$) al fondo de una placa de cultivo de 6 pocillos (Nunc). Se usaron los virus respiratorios porcinos PRRSV, virus de la gripe y adenovirus para la adición en diferentes experimentos. Se adicionaron soluciones madre de virus sin diluir (0) y diluidas ($-1 = 1/10$, $-2 = 1/100$, $-3 = 1/1000$) ($100 \mu\text{l}$ de volumen) al moco y se recogieron usando una torunda de algodón tradicional (condición A) o el muestreador de la presente invención (condición B) y se transfirieron a tubos de recogida de 15 ml separados que contenían 4 ml de medio de transporte. Las torundas se frotaron durante 5 s contra la pared del tubo de recogida, dando como resultado una

suspensión de moco adecuada. A continuación, se recogió 1 ml de la suspensión de moco del tubo de la condición A usando una pipeta serológica de poliestireno de 1 ml. A continuación, se usó el muestreador completo (torunda, filtros y jeringa) para aspirar la suspensión de moco del tubo de recogida de la condición B. Ambas suspensiones fecales se transfirieron a un tubo estéril de 1,5 ml y se almacenaron en hielo hasta su procesamiento adicional. Se realizaron tres experimentos independientes para cada virus, seguidos de una titulación inmediata del virus en las respectivas estirpes celulares hospedadoras.

En el segundo experimento, se siguió el mismo enfoque que en el primer experimento, pero ahora se adicionó virus de la gripe al moco y se recogió con una torunda de algodón (condición A), el muestreador de la presente invención (condición B) o el dispositivo de muestreo solo (condición C). De nuevo, las torundas se transfirieron a tubos de recogida de 15 ml separados que contenían 4 ml de medio de transporte y se frotaron durante 5 s contra la pared del tubo para resuspender el moco. A continuación, se recogió 1 ml de la suspensión de moco del tubo de la condición A usando una pipeta serológica de poliestireno de 1 ml. A continuación, se usó el muestreador completo (torunda, filtros y jeringa) para aspirar la suspensión de moco del tubo de recogida de la condición B. Por último, se usó la torunda para aspirar directamente la suspensión de moco del tubo de recogida de la condición C.

Resultados

En el primer experimento, todo el moco que se introdujo dentro de la placa de 6 pocillos se recogió eficientemente mediante el uso del muestreador de la presente invención para recoger la muestra. Aún quedó una pequeña fracción de moco usando la torunda de algodón tradicional, lo que demuestra una menor capacidad de recogida. Sorprendentemente, y como se muestra en la Fig. 11A, el uso del muestreador en comparación con una torunda de algodón tradicional produce una mayor sensibilidad y una menor variación en la titulación de infectividad vírica del PRRSV ($p = 0,0420$; diferencia media $\pm$ desviación típica: $1,023 \pm 0,7758$ DICC₅₀/torunda), virus de la gripe ($p = 0,0027$; diferencia media $\pm$ desviación típica: $0,3880 \pm 0,1315$ DICC₅₀/torunda) y adenovirus porcino ($p = 0,0229$; diferencia media $\pm$ desviación típica: $0,7627 \pm 0,4749$ DICC₅₀/torunda). Curiosamente, el virus infeccioso no fue detectado por la torunda de algodón tras la recogida y titulación de muestras de moco enriquecidas con cargas bajas de PRRSV (dilución 1/100 y 1/1000), mientras que se observó infección vírica con la dilución de virus 1/100 (3/3 réplicas) y la dilución 1/1000 (1/3 réplicas) cuando se usó el muestreador de la presente invención.

En el segundo experimento (Fig. 11B), se comparó la infectividad del virus de la gripe entre suspensiones de moco recogidas con una torunda de algodón, el dispositivo de muestreo completo con dos filtros de jeringa y un tubo de recogida, y el dispositivo con sólo la punta de torunda y el cuerpo de soporte. La infectividad del virus de la gripe fue mayor en las suspensiones de moco recogidas con el dispositivo que comprendía la punta de torunda y el cuerpo de soporte solo, en comparación con las suspensiones de moco que se recogieron con el dispositivo de muestreo completo o una torunda de algodón, en ese orden.

8. Purificación de virus y detección potenciada usando el muestreador para la detección de virus en sangre

En este experimento, se adicionó PRRSV a la sangre y las muestras se analizaron con PCR en tiempo real para comparar las diferencias en los métodos de recogida utilizados.

Métodos

Se recogió sangre entera porcina de animales donantes sanos usando heparina y se le adicionaron diferentes diluciones (sin diluir, 1/10, 1/100 y 1/1000 v/v) de la cepa 13V091 de PRRSV. Se trajeron ochocientos microlitros de sangre enriquecida en 3200 μ l de tampón de almacenamiento, compuesto de UP y antibióticos como se ha descrito anteriormente. La sangre se centrifugó para que se mezclase. Se recogió un ml usando una pipeta serológica estéril de 1 ml (Greiner Bio One). La suspensión restante se filtró usando la torunda y los filtros de jeringa. El ARN vírico se liberó de los viriones y se purificó usando el QIAamp Cador Pathogen Mini Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los genomas víricos de PRRSV se cuantificaron usando una PCR interna en tiempo real.

Resultados

La Figura 12 muestra los resultados de la detección de PRRSV tras la recogida de lisados sanguíneos con el muestreador de la invención por un lado y una pipeta serológica convencional por el otro.

Usando el muestreador, se muestra un ligero aumento en la detección de copias del genoma de PRRSV en muestras que contenían solución madre de virus diluida y sin diluir (diluida 1/10 y 1/100). No se detectaron genomas víricos en la muestra a la que se le adicionó una dilución 1/1000 del virus, lo que podría indicar que la sangre es una matriz más difícil.

9. Estabilidad del virus después de la recogida a partir de moco y heces con muestreador y almacenamiento durante varios días

Durante el transporte es esencial que se conserve la integridad del virus. Se recogieron moco y heces usando el dispositivo de muestreo de la invención, se resuspendieron en tampón de almacenamiento y se siguieron con purificación o sin purificación y almacenamiento durante varios días a 4 °C. Se determinaron los títulos de virus infecciosos para evaluar los posibles efectos de la purificación del virus y el tiempo sobre la infectividad vírica.

Métodos

Se descongeló el virus de la gripe Ghent/28/10 (Qiu *et al.*, 2015, *Veterinary Research*) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se recogió y se preparó una dilución de virus 1/10 v/v en tampón de almacenamiento compuesto de agua ultrapura, penicilina, estreptomycin, gentamicina y anfotericina B. El moco respiratorio, recogido y almacenado como se ha descrito anteriormente, se descongeló en hielo. Se adicionó moco (0,25 cm²) al fondo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos y se adicionaron 200 µl de suspensión de virus. El moco adicionado se recogió usando la torunda nueva y se sumergió en 4 ml de tampón de almacenamiento para generar una suspensión de moco. Se recogió un ml de la suspensión usando una pipeta serológica de 1 ml, mientras que la suspensión restante se aspiró a través del dispositivo de muestreo que comprende tres capas de tejidos y en conexión con los filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm mencionados anteriormente para purificar las partículas víricas. Se incluyeron controles negativos mediante adiciones de moco con tampón de almacenamiento en lugar de virus o mediante tampón de almacenamiento de recogida. Todas las muestras se almacenaron a 4 °C durante cero, uno o dos días, seguido de una titulación inmediata en células MDCK. El experimento se ejecutó independientemente tres veces. Se leyó el CPE después de 7 días usando un microscopio óptico y se determinaron los títulos de infectividad vírica usando la fórmula de Reed y Muench. Se usó un ANOVA bidireccional de medidas repetidas para determinar los efectos de la purificación y el tiempo sobre la infectividad vírica.

Se ejecutó un experimento similar adicionando la cepa de rotavirus RVA/Pig-tc/BEL/12R050/2012/G5P en heces (Theuns *et al.*, 2014, *Veterinary Microbiology*). Se descongeló rotavirus y se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 min. Se recogió el sobrenadante y se preparó una dilución de virus 1/10 v/v en tampón de almacenamiento. Se recogieron heces y se almacenaron como se ha descrito anteriormente y se pesaron 1,6 g en tubos Falcon de 50 ml. La suspensión de virus (400 µl) se adicionó a las heces, se agitó con formación de vórtice durante 15 segundos para garantizar una mezcla adecuada y después se hizo centrifugó brevemente para obtener las heces en el fondo del tubo. Las heces se recogieron usando la torunda de la invención y se sumergieron en 4 ml de tampón de almacenamiento en un tubo de recogida de 15 ml. Se recogió un ml de las suspensiones fecales usando una pipeta serológica de 1 ml, mientras que la suspensión restante se filtró usando el dispositivo de muestreo de la presente invención. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante cero, uno o dos días. Se realizó una titulación en células MA104 y se leyó el CPE después de 4 a 5 días usando un microscopio óptico. Los títulos de virus infecciosos se determinaron usando la fórmula de Reed y Muench. Se usó un ANOVA bidireccional de medidas repetidas para determinar los efectos de la purificación y el tiempo sobre la infectividad vírica.

Resultados

Se adicionó virus de la gripe al moco y se recogieron usando la punta de torunda de la presente invención.

La Fig. 13 muestra que la purificación de las partículas del virus de la gripe a partir de moco usando el dispositivo de muestreo y una serie de filtros de jeringa tiene una repercusión ($p = 0,0100$) en los títulos infecciosos del virus. El tiempo de almacenamiento no tuvo una repercusión significativa ($p = 0,4187$) en los títulos de virus después del almacenamiento. Estos resultados muestran que el virus de la gripe es relativamente estable en el tampón de almacenamiento a 4 °C. Además, la purificación del virus del moco conduce a títulos de virus infecciosos más elevados, lo que significa que se retiran por filtración algunas sustancias inhibitoras (por ejemplo, polisacáridos ácidos, ácidos siálicos...).

Se adicionó rotavirus a heces y se mantuvo estable después del almacenamiento durante 0 a dos días a 4 °C (Fig. 14). No se observó ningún efecto significativo ($p = 0,3594$) del tiempo de almacenamiento sobre la infectividad. Adicionalmente, la purificación no potenció significativamente ($p = 0,2514$) la infectividad o estabilidad del virus.

10. Implementación del muestreador en un flujo de trabajo de secuenciación de metagenómica vírica

En este experimento, se adicionaron virus representativos a tres matrices de muestras diferentes, incluyendo heces y moco, y se analizaron mediante secuenciación metagenómica vírica. En este caso, el dispositivo de muestreo conectado a una serie de filtros de SFCA de 5 µm y 0,8 µm se usó para recoger muestras de ensayo biológicas después de la transferencia dentro de un líquido. Los filtrados resultantes se procesaron inmediatamente para la secuenciación y se compararon con un protocolo de laboratorio validado más extendido para el enriquecimiento vírico (Novel Enrichment Technique of Viromes (NetoVIR) (técnica novedosa de enriquecimiento de viromas, en inglés). Normalmente, los protocolos de metagenómica vírica de laboratorio hacen uso varias etapas de manipulación que requieren mucho tiempo (por ejemplo, mostradas en la Tabla 4) y requieren equipo especializado para la homogeneización, centrifugación, filtración y tratamiento con nucleasas. Cada manipulación/etapa puede conducir a errores (por ejemplo, contaminación cruzada, errores de pipeteo...) y puede conducir a sesgos inherentes a la etapa de procesamiento utilizada. En este caso, el objetivo era demostrar la aplicabilidad directa de nuestro dispositivo de

muestreo en un flujo de trabajo de metagenómica vírica de diagnóstico. Esto puede ahorrar hasta medio día de carga de trabajo.

Tabla 4. Ahorro de tiempo usando un dispositivo de muestreo para purificar virus para la secuenciación metagenómica corriente abajo

	Tiempo necesario (h) para procesar un lote de 10 muestras usando un protocolo de enriquecimiento vírico de laboratorio en lugar de una purificación <i>in situ</i> con un dispositivo de muestreo
Pesaje/resuspensión de la muestra cuando no se usan torundas	1 h
Homogeneización	15 min
Centrifugación	15 min
Filtración	15 min
Tratamiento con nucleasas (2 h)	2 h 15 min
Total	de 3 a 4 h

Métodos

En este estudio, a tres matrices diferentes se adicionaron virus representativos:

- heces/entérico: rotavirus A (7,93 log₁₀ de DICC50/g de heces) y PEDV (4,13 log₁₀ de DICC50/g de heces);
- moco/respiratorio: PRRSV (5,30 log₁₀ de DICC50/0,25 cm² de moco) y PRV (7,80 log₁₀ de DICC50/0,25 cm² de moco);

Se recogieron heces y moco usando el dispositivo de muestreo y se transfirieron a un tubo de recogida con 4 ml de tampón de almacenamiento por tubo.

Para procesar la muestra con el protocolo de metagenómica vírica NetoVIR, se recogió un ml de cada suspensión (serie de muestras A) usando una pipeta serológica estéril de un ml y se transfirió a un tubo de recogida nuevo de 1,5 ml. La suspensión restante se aspiró usando el dispositivo de muestreo en conexión con la serie de filtros de SFCA mencionados anteriormente (serie de muestras B). Las suspensiones sin filtrar de la serie de muestras A se procesaron usando un protocolo modificado de la estrategia NetoVIR para el enriquecimiento vírico de muestras para estudios metagenómicos mediante secuenciación de Illumina (Conceicao-Neto *et al.*, 2015, *Scientific Reports*). El protocolo consistió en una etapa de centrifugación (13.000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente), seguida de filtración del sobrenadante a través de un filtro de acetato de celulasa exento de tensioactivos de 0,8 µm y tratamiento posterior con nucleasas del filtrado durante 2 h a 37 °C (Benzonase Nuclease) para descartar los ácidos nucleicos que flotan libremente. A continuación, se liberaron y purificaron los ácidos nucleicos víricos de la muestra tratada con nucleasas (400 µl) usando el QIAamp Cadore Pathogen Mini Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero sin la adición de ARN portador.

Las muestras de la serie B no requirieron purificación o pretratamiento adicional y los ácidos nucleicos víricos se liberaron y purificaron directamente con el QIAamp Cadore Pathogen Mini Kit como se ha descrito anteriormente.

A continuación, para ambos flujos de trabajo, el ARN vírico se convirtió en ADN complementario y posteriormente se creó ADN bicatenario usando el módulo de síntesis de segunda cadena de ARN no direccional NEBNext Ultra II antes de la preparación de la biblioteca de secuenciación usando el kit de secuenciación rápida de códigos de barras (SQK-RBK004) de Oxford Nanopore Technologies en una celda de flujo R9.4 MinION. Después, las muestras se secuenciaron durante 6 horas en MinION de Oxford Nanopore Technologies. Las lecturas víricas se identificaron mediante comparación con una base de datos vírica completa interna.

Resultados

La Fig. 15 muestra el número de virus porcinos identificados tras el procesamiento con las dos metodologías diferentes. Usando ambos métodos de purificación de muestras, se pudieron detectar todos los virus enriquecidos. En las heces, también había presentes y se detectaron varios otros virus (por ejemplo, astrovirus, picornavirus, picobirnavirus y sapovirus) usando tanto el dispositivo de muestreo como NetoVIR.

En general, se obtuvieron más lecturas víricas cuando las muestras se procesaron usando el protocolo NetoVIR. Sin embargo, usando el dispositivo de muestreo de la presente invención, en este experimento se podría conseguir una ganancia de tiempo de 3-4 horas. Por otra parte, el método de muestreo mostró una buena sensibilidad para la secuenciación corriente abajo, ya que también se diagnosticaron eficazmente virus poco abundantes, tales como el PEDV adicionado en las heces, usando el dispositivo de muestreo de la presente invención.

11. Purificación y enriquecimiento de diferentes patógenos a partir de una muestra de esputo enriquecida con un complejo de un gran número de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos.

Métodos

En este experimento, se adicionó a una muestra de esputo (500 µl) una combinación de (1) una comunidad vírica simulada (VMC) interna (50 µl), (2) una comunidad bacteriana simulada (BMC, ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (patrón de comunidad microbiana, en inglés) (Zymo Investigación; D6300)) (50 µl) y (3) cepa de tipo PG45 de *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) (ATCC 25523) (50 µl). En la Tabla 5 se proporciona más información sobre los patógenos sometidos a ensayo. Posteriormente, el esputo enriquecido se diluyó en 4 ml de dPBS para permitir la recogida con el dispositivo de muestreo y se aspiró a través de la punta de torunda y un filtro de SFCA de 0,8 µm. Paralelamente, la suspensión de esputo sin filtrar se procesó sin filtrar para la comparación. Ambas muestras se procesaron usando un flujo de trabajo de metagenómica vírica, que incluyó un aislamiento de ácido nucleico vírico usando un kit disponible en el mercado y una amplificación aleatoria de ácido nucleico vírico seguida de una secuenciación durante 12 horas en un MinION. La muestra de esputo original también se analizó con un kit de aislamiento de ADN bacteriano y se secuenció para determinar la presencia de bacterias en la muestra original. Este experimento permitió verificar el posible uso del dispositivo de muestreo como parte de un flujo de trabajo de diagnóstico todo en uno para virus y bacterias.

Resultados

En este experimento, se observó una detección aumentada de lecturas víricas cuando la muestra se filtró usando el dispositivo de muestreo, en comparación con el procesamiento directo de la suspensión de esputo. Esto podría ser el resultado de una eficiencia de amplificación aumentada de ADNc y PCR debido a la filtración (Fig. 16A). Como el esputo no sólo estaba adicionado virus, sino que también contenía una carga muy alta de bacterias, esto puede explicar por qué no se detectaron todos los miembros de la comunidad vírica simulada. Además de la detección de lecturas víricas, también se detectaron lecturas de *Mycoplasma bovis* usando el procesamiento con el flujo de trabajo de metagenómica vírica. La carga de *M. bovis* en el filtrado fue similar a la carga en la suspensión de esputo original. Esto permite combinar inmediatamente la detección de virus y *Mycoplasma* spp. a partir del filtrado en un solo análisis (Fig. 16B).

Se aislaron aproximadamente 431 lecturas bacterianas (excluyendo las lecturas de *E. coli*) de una suspensión de esputo en un flujo de trabajo de metagenómica bacteriana usando un kit de aislamiento de ADN bacteriano específico. Curiosamente, se observó que también se podían detectar lecturas bacterianas en el filtrado cuando se aplicaba el flujo de trabajo de metagenómica vírica con el kit de aislamiento de ácido nucleico vírico. Esto significa que hubo un ligero paso de bacterias a través del filtro de 0,8 µm, pero con una carga que no interfiere con la detección vírica. Además, incluso sugiere la posibilidad de utilizar el dispositivo de muestreo como parte de un ensayo de diagnóstico vírico y bacteriano todo en uno. Este efecto podría indicar una eliminación más eficiente de inhibidores potenciales debido a la filtración que se aplica. La composición de especies bacterianas en todas las muestras se mantuvo en comparación con la muestra de esputo sin filtrar. Adicionalmente, se detectaron lecturas de *Bacillus* sp. en la fracción de filtrado, lo que no fue posible en la muestra de esputo original (Fig. 16C). Esto respalda una posible implementación del dispositivo de muestreo en un enfoque de diagnóstico todo en uno más amplio.

Tabla 5. Visión de conjunto de las especies representadas en comunidades simuladas víricas y bacterianas

Comunidad	Especie	Tamaño del genoma (pb)	Contenido de GC (%)	Observaciones
Comunidad vírica simulada	Cepa 10K413 del virus de la panleucopenia felina	5.323	35,6	ADNmc(+)
	Cepa Sw/Gent/28-10/H1N1 del virus de la gripe A	13.333	43,6	8 segmentos de ARNmc(-)
	Cepa Stoon 10/10 de PCV2	1.767	48,4	ADNmc(+) circular
	Cepa CV777 de PEDV	28.029	41,8	ARNmc(+)
	Cepa Pig-tc/BEL/12R046/2012/G9P de rotavirus porcino A [23]	18.034	32,0	11 segmentos de ARNbc

Comunidad	Especie	Tamaño del genoma (pb)	Contenido de GC (%)	Observaciones
	Cepa 12V091 de PRRSV	15.428	52,8	ARNmc(+)
	Cepa Bartha de Alfarherpesvirus suido 1	142.922	136	ADNbc
Comunidad bacteriana simulada	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B-3509)	6.792.000	66,2	Gram ^{negativo}
	<i>Escherichia coli</i> (B-1109)	4.875.000	46,7	Gram ^{negativo}
	<i>Salmonella enterica</i> (B-4212)	4.670.000	52,2	Gram ^{negativo}
	<i>Lactobacillus fermentum</i> (B-1840)	1.905.000	52,4	Gram ^{positivo}
	<i>Enterococcus faecalis</i> (B-537)	2.845.000	37,5	Gram ^{positivo}
	<i>Staphylococcus aureus</i> (B-41012)	2.730.000	32,9	Gram ^{positivo}
	<i>Listeria monocytogenes</i> (B-33116)	2.992.000	38,0	Gram ^{positivo}
	<i>Bacillus subtilis</i> (B-354)	4.045.000	43,0	Gram ^{positivo}
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Y-567)	12.100.000	38,3	Levadura
	<i>Cryptococcus neoformans</i> (Y-2534)	18.900.000	48,3	Levadura
<i>M. bovis</i>	PG45 de <i>Mycoplasma bovis</i> (ATCC 25523)	1.003.404	29,3	Bacteria sin pared celular

REFERENCIAS

- 5 Conceição-Neto N, Zeller M, Lefrère H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte W, Yinda CK, Lavigne R, Maes P, Van Ranst M, Heylen E, Matthijssens J. *Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. Sci Rep.* 12 de noviembre de 2015; 5:16532.
- 10 Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. *Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Can Vet J.* Enero de 1998; 39(1):44-51.
- 15 Frydas IS, Trus I, Kvisgaard LK, Bonckaert C, Reddy VR, Li Y, Larsen LE, Nauwynck HJ. *Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. Vet Res.* 21 de marzo de 2015; 46:37.
- 20 Theuns S, Desmarets LM, Heylen E, Zeller M, Dedeurwaerder A, Roukaerts ID, Van Ranst M, Matthijssens J, Nauwynck HJ. *Porcine group A rotaviruses with heterogeneous VP7 and VP4 genotype combinations can be found together with enteric bacteria on Belgian swine farms. Vet Microbiol* 6 de agosto de 2014; 172(1-2):23-34.
- 25 Theuns S, Heylen E, Zeller M, Roukaerts ID, Desmarets LM, Van Ranst M, Nauwynck HJ, Matthijssens J. *Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. J Virol.* 15 de enero de 2015; 89(2):1043-57.
- 30 Qiu Y, De Hert K, Van Reeth K. *Cross-protection against European swine influenza viruses in the context of infection immunity against the 2009 pandemic H1N1 virus: studies in the pig model of influenza. Vet Res.* 24 de septiembre de 2015; 46:105.
- Garré B, van der Meulen K, Nugent J, Neyts J, Croubels S, De Backer P, Nauwynck HJ. *In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. Vet Microbiol* 16 de mayo de 2007; 122(1-2):43-51.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de muestreo (100) para recoger y aislar una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación, comprendiendo dicho dispositivo de muestreo:
 - 5 - una punta de torunda (1) y un cuerpo de soporte (2), en donde el cuerpo de soporte tiene una conformación hueca con un primer extremo (3) y un segundo extremo (4), y en donde dicho primer extremo está en conexión fluida con la superficie interior de la punta de torunda, estando dicho dispositivo de muestreo **caracterizado por que** la punta de torunda comprende un material de filtro (8, 9) con un tamaño de poro que disminuye desde la superficie externa de la punta de torunda hasta la superficie interna de la punta de torunda, y **por que** el cuerpo de soporte (2) está configurado para recoger la muestra a través de la punta de muestra (1) y para transportar la muestra desde su primer extremo (3) hacia su segundo extremo (4); y
 - 10 - medios para crear un gradiente de presión negativo a través del dispositivo de muestreo (100) que facilita el transporte de la muestra desde la punta de muestra (1) hacia el segundo extremo (4) del cuerpo de soporte a través del primer extremo (2) del cuerpo de soporte.
- 15 2. El dispositivo de muestreo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tamaño de poro del material de filtro es de al menos 5 μm ; preferiblemente al menos 10 μm .
- 20 3. El dispositivo de muestreo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de filtro es un material de filtro de una sola capa; en particular, un material de filtro de una sola capa con un gradiente de tamaño de poro continuo.
- 25 4. El dispositivo de muestreo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el material de filtro es un material de filtro de múltiples capas; en particular un material de filtro de múltiples capas con un gradiente de tamaño de poro discontinuo.
- 30 5. El dispositivo de muestreo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el tamaño de poro de la capa externa del material de múltiples capas es de al menos 50 μm .
- 35 6. El dispositivo de muestreo de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde el tamaño de poro de la capa interna del material de múltiples capas es de entre 50 μm y 5 μm .
7. El dispositivo de muestreo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la punta de torunda comprende además una capa de tejido sobre la superficie externa de la punta de torunda.
8. El dispositivo de muestreo de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la capa de tejido comprende poros en donde el tamaño de poro es de al menos 100 μm .
- 40 9. El dispositivo de muestreo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer extremo (3) del cuerpo de soporte termina en una punta abierta o cerrada y en donde dicho primer extremo (3) del cuerpo de soporte comprende además una o más aberturas (10) en las paredes laterales del mismo.
- 45 10. El dispositivo de muestreo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los medios para crear un gradiente de presión negativo se seleccionan de la lista que comprende: dispositivo de jeringa convencional o no convencional, dispositivo de succión convencional, aparatos de bombeo de aire y dispositivos de vacío.
- 50 11. El dispositivo de muestreo (100) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un tubo de recogida (11) que está en conexión fluida con el segundo extremo (4) del cuerpo de soporte (2), y opcionalmente uno o más filtros que están situados entre el cuerpo de soporte (2) y el tubo de recogida (11).
- 55 12. Uso de un dispositivo de muestreo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la recogida y el aislamiento de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra de un sujeto o de una ubicación.
- 60 13. Método para la recogida y/o el aislamiento de una muestra de ensayo biológica a partir de una muestra o de una ubicación, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
 - raspar con y/o sumergir la superficie externa de la punta de torunda (1) del dispositivo de muestreo (100) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la muestra o en la ubicación;
 - recogida de una muestra de ensayo biológica a partir de la muestra o de la ubicación en la superficie externa de dicha punta de torunda;
 - 60 - transferencia de la muestra de ensayo biológica desde la superficie externa de la punta de torunda (1) hasta la superficie interna de la punta de torunda y adicionalmente dentro del cuerpo de soporte (2) de dicho dispositivo de muestreo; y
 - recogida de la muestra de ensayo biológica en el cuerpo de soporte o desde el segundo extremo del cuerpo de soporte de dicho dispositivo de muestreo dentro de un tubo de recogida (11) que está conectado de manera fluida con el segundo extremo (4) del cuerpo de soporte (2);
 - 65

en donde la recogida y el aislamiento de la muestra de ensayo biológica se realiza usando un gradiente de presión negativo que facilita el transporte de la muestra desde la punta de muestra hacia el segundo extremo del cuerpo de soporte a través del primer extremo del cuerpo de soporte.

5 14. El método de la reivindicación 13, en donde la muestra de ensayo biológica son bacterias, virus, parásitos y/u hongos.

10 15. El método de la reivindicación 13 o 14, en donde la muestra se selecciona de una muestra de agua o una muestra de fluido corporal; preferiblemente en donde la muestra de agua se selecciona de agua dulce, agua salada, agua salobre o agua residual; o en donde la muestra de fluido corporal se selecciona de sangre, suero, plasma, moco nasal, esputo, aspirado pulmonar, secreción vaginal, jugo gástrico, saliva, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, leche materna o pus.

Fig. 1

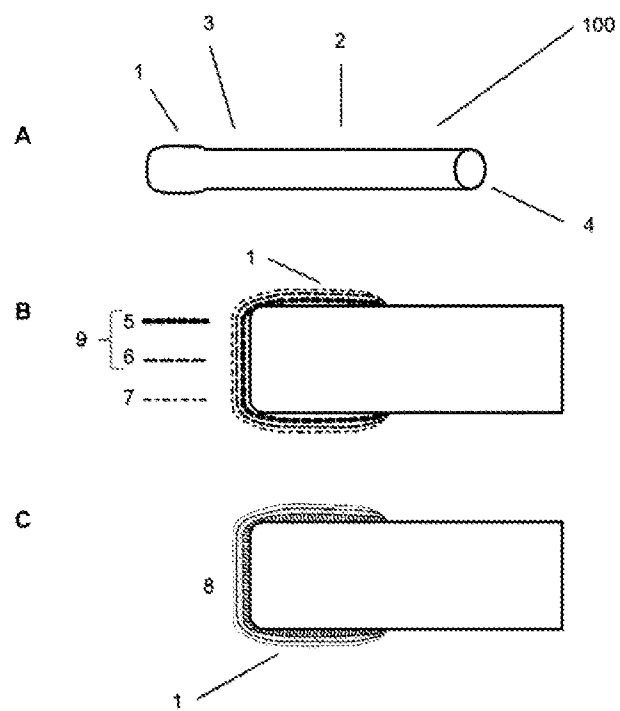


Fig. 2

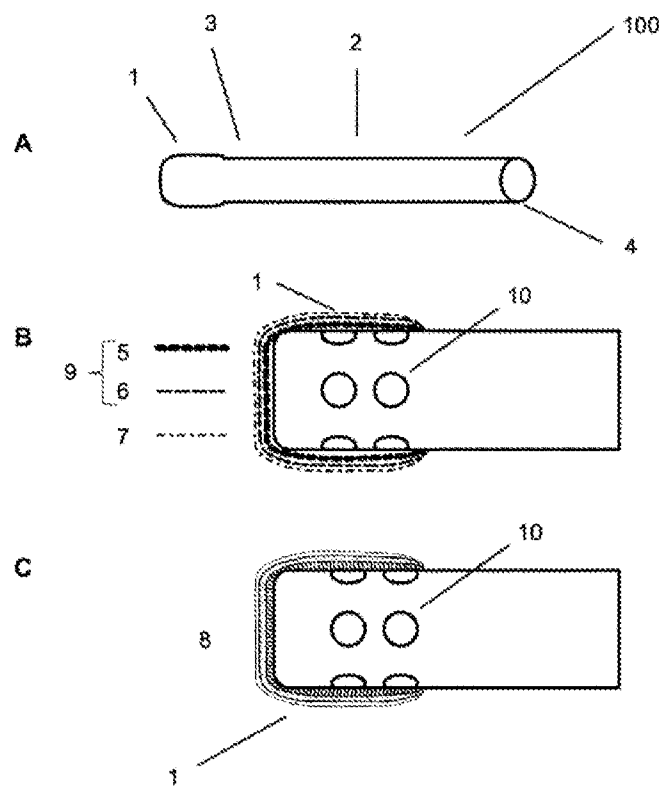


Fig. 3

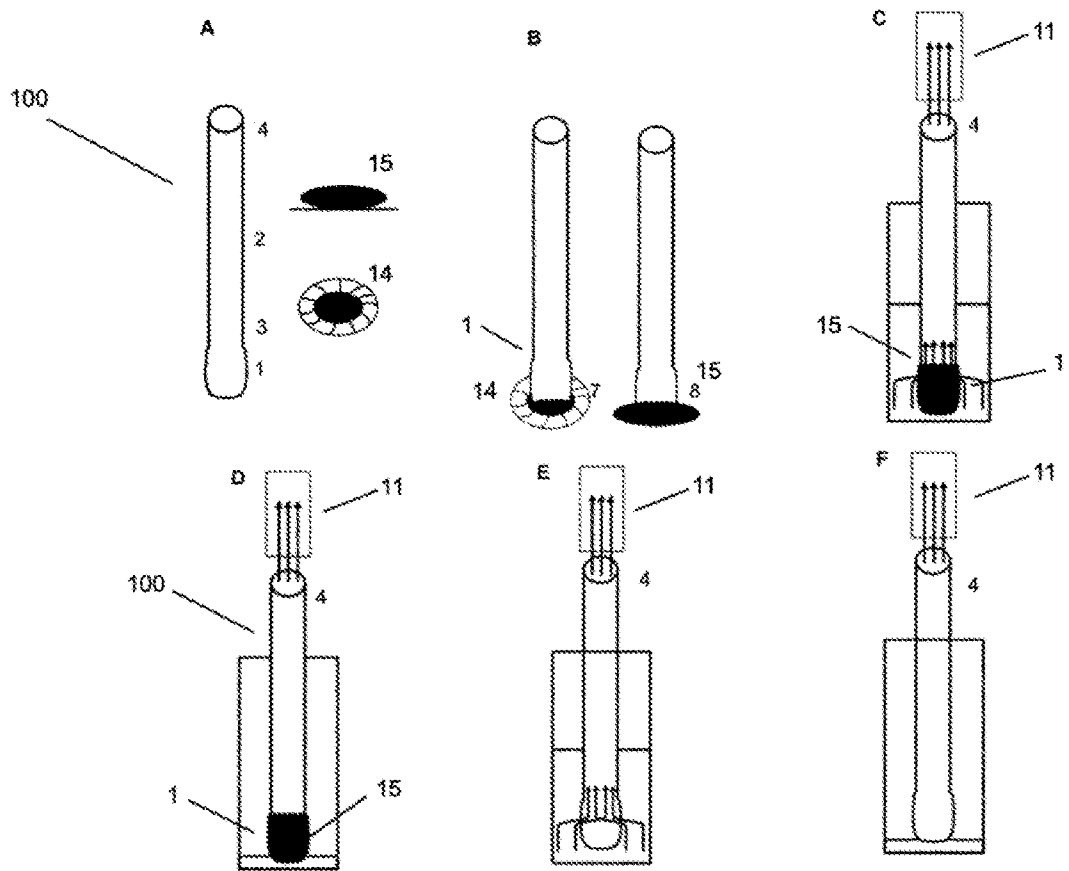


Fig. 4

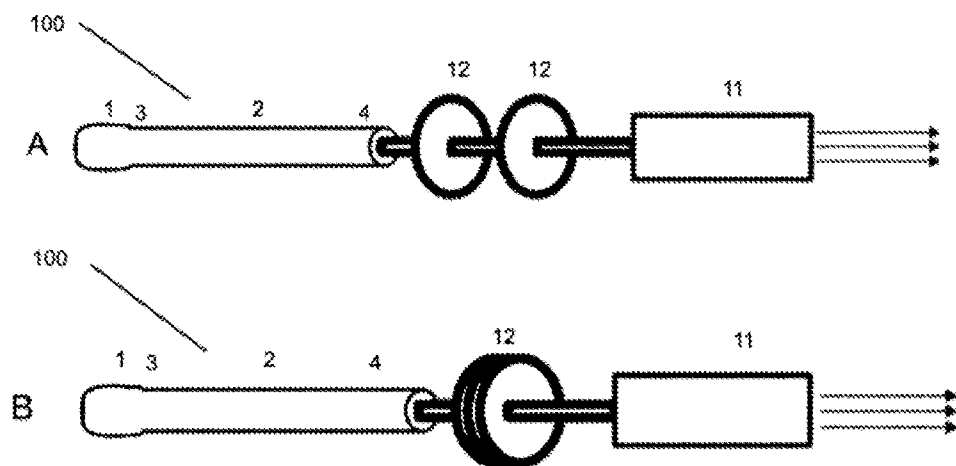


Fig. 5

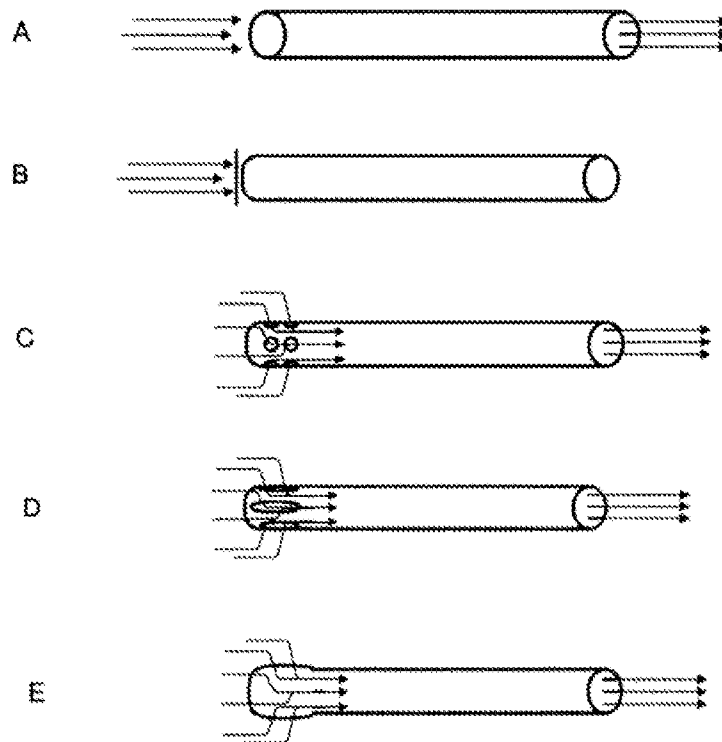


Fig. 6

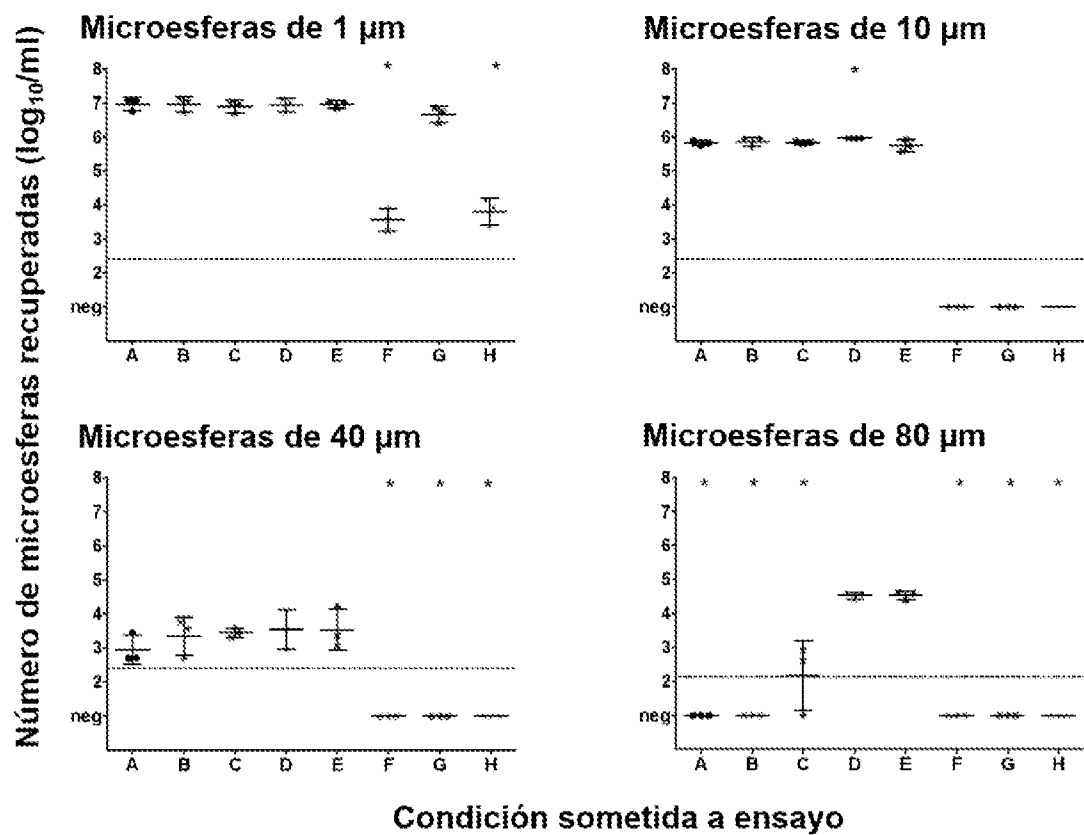


Fig. 7

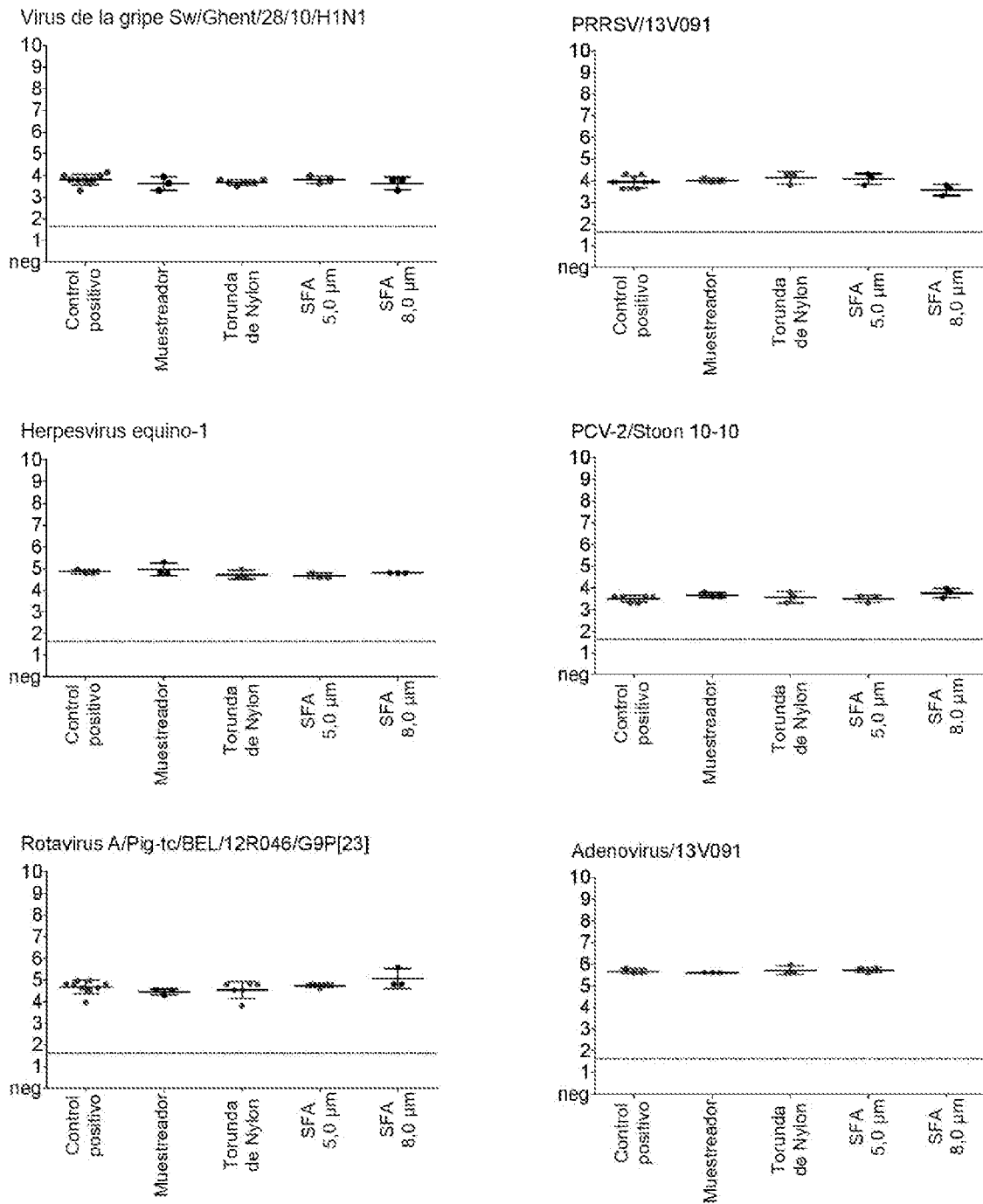


Fig. 8

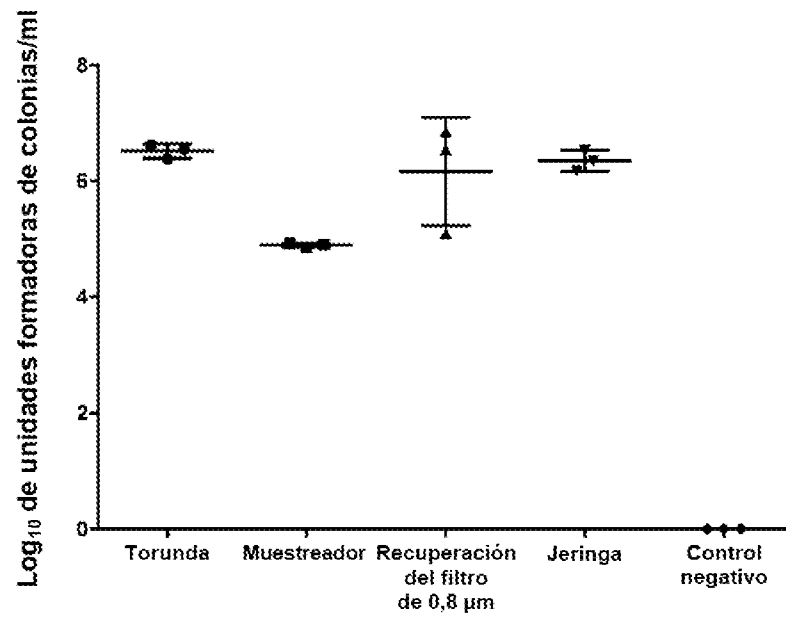
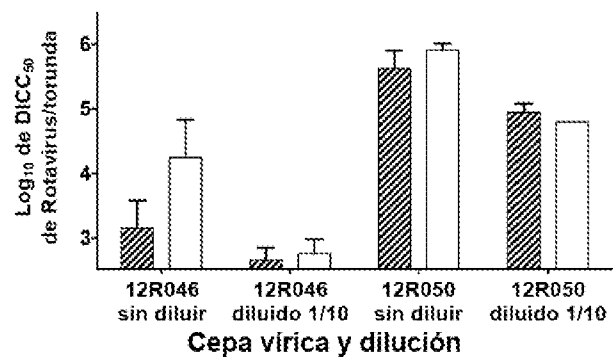


Fig. 9

Título de virus infecciosos



Copias de genoma

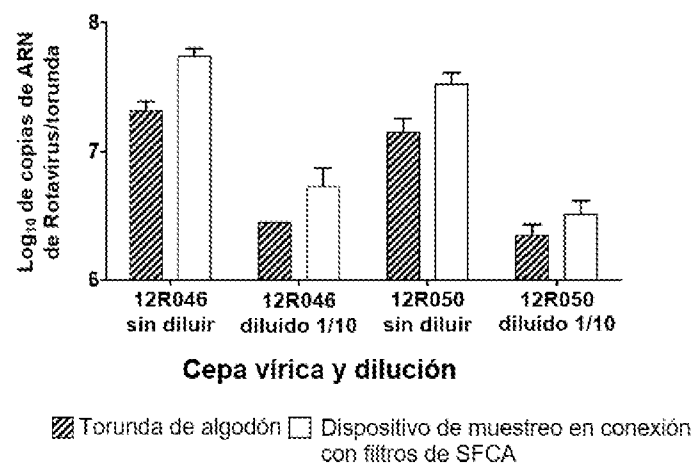


Fig. 10

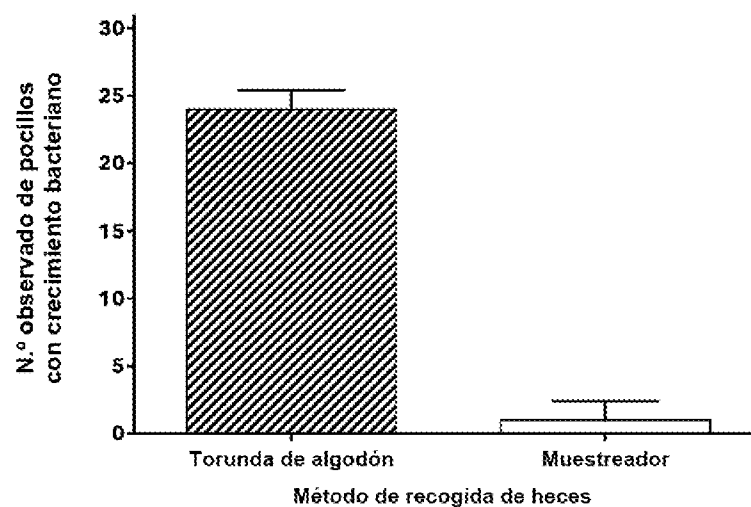


Fig. 11

A

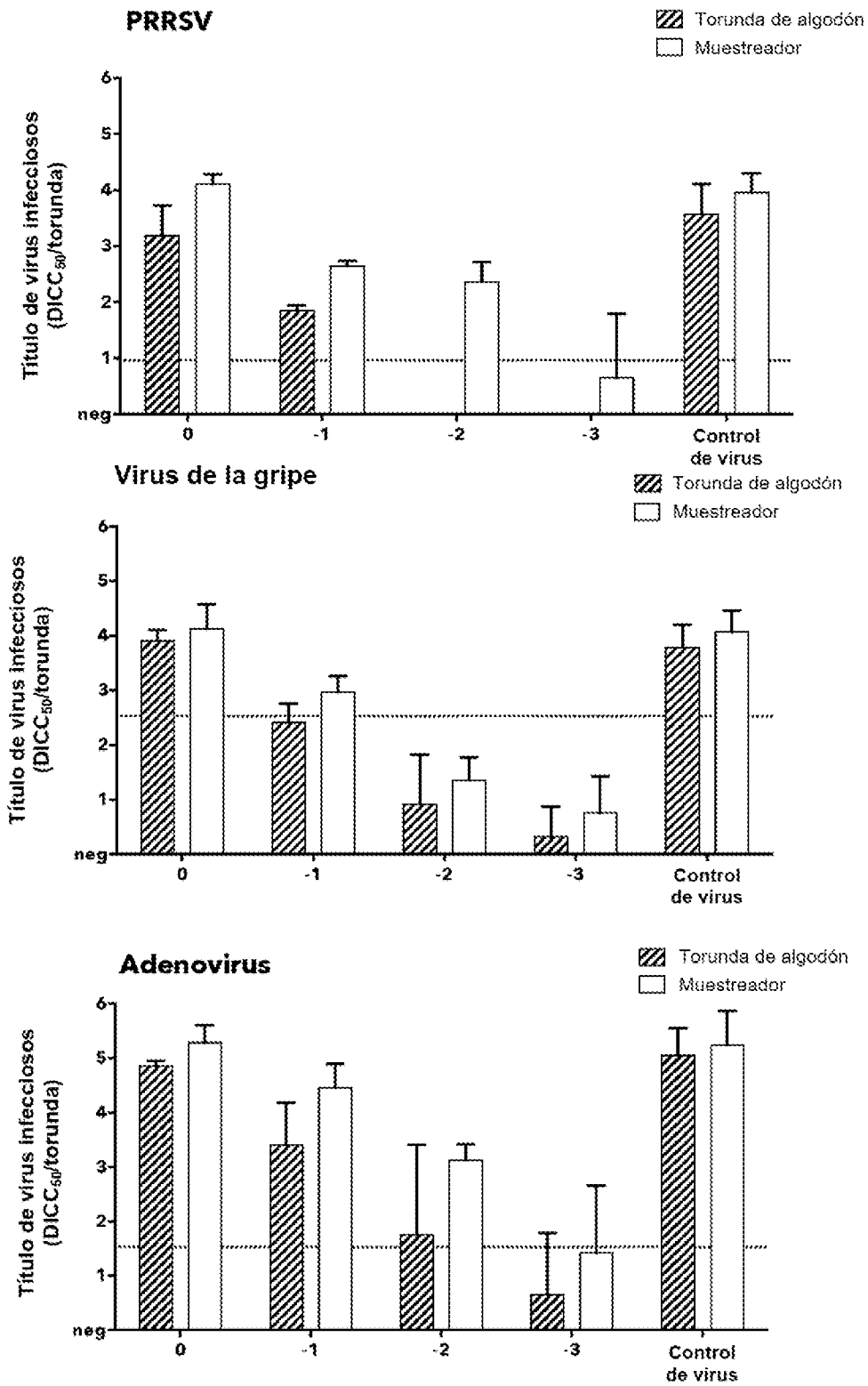


Fig. 11 (continuación)

B

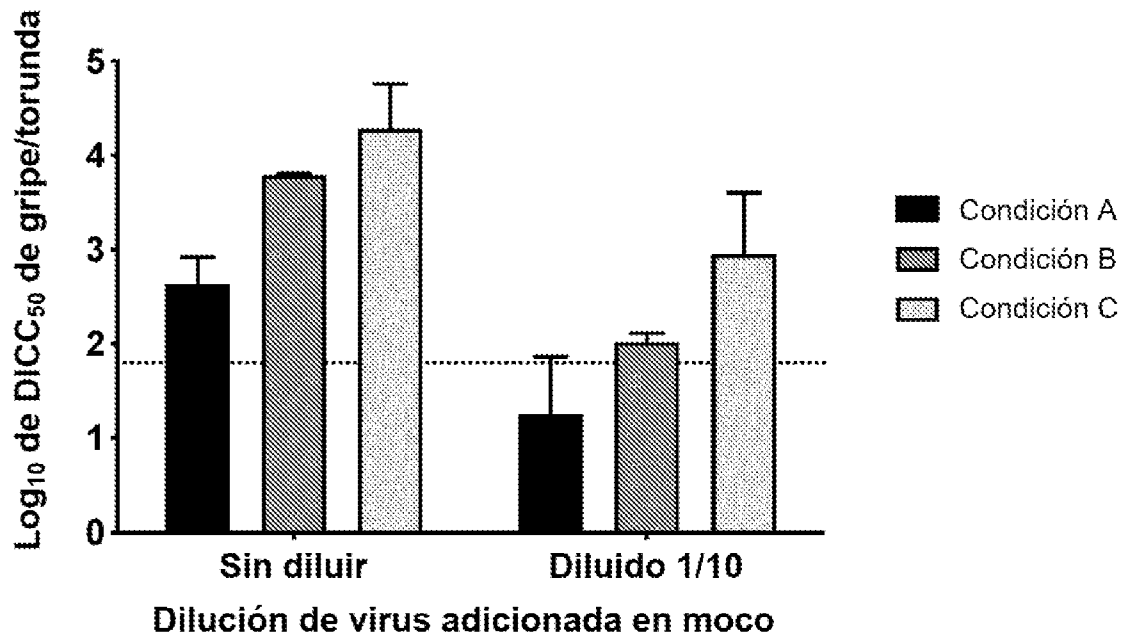


Fig. 12

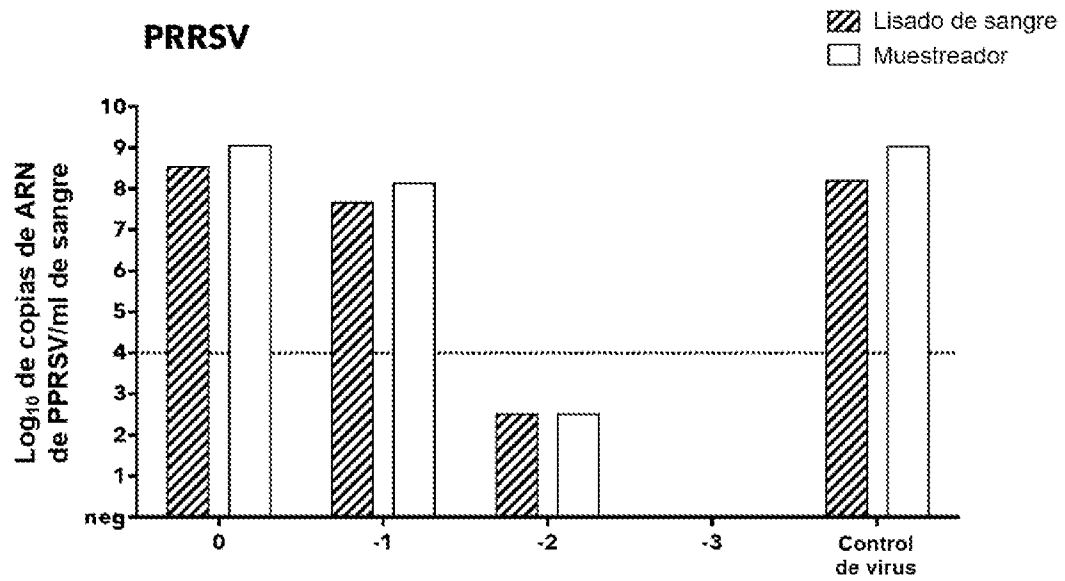


Fig. 13

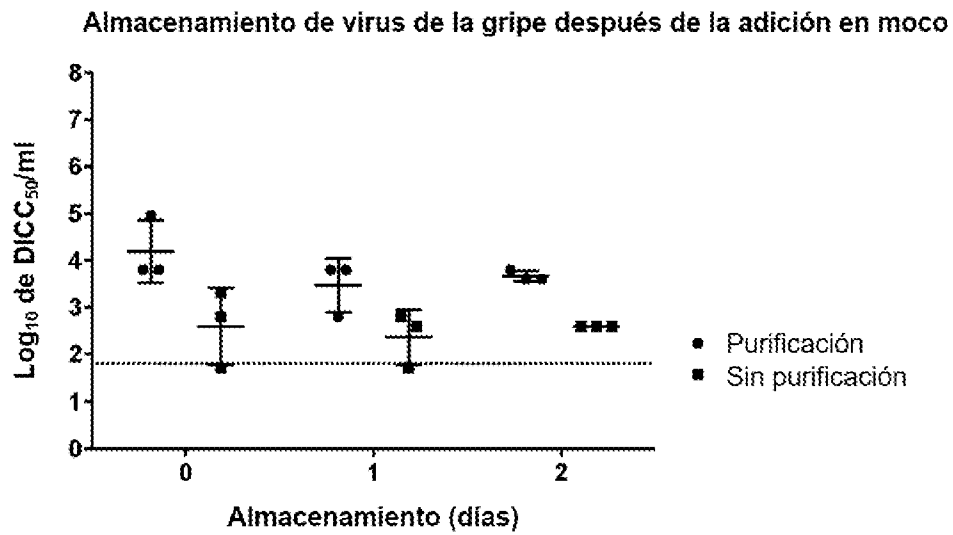


Fig. 14

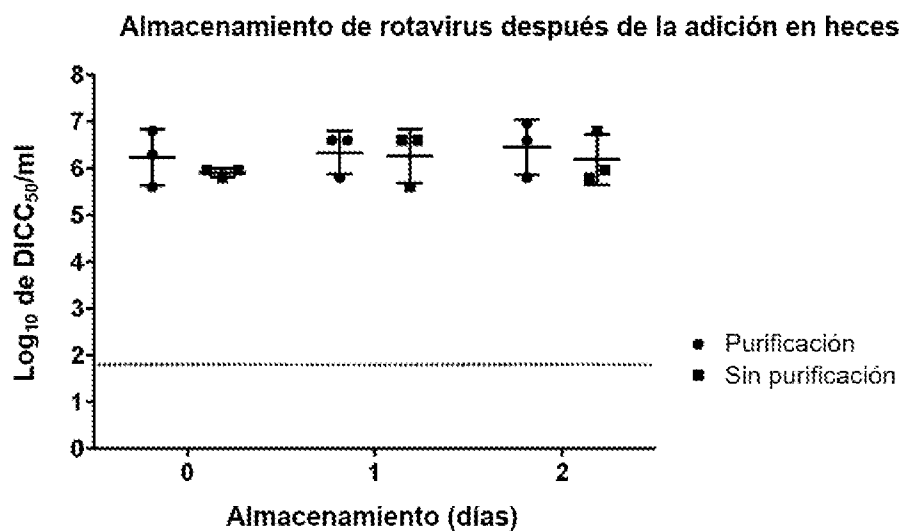


Fig. 15

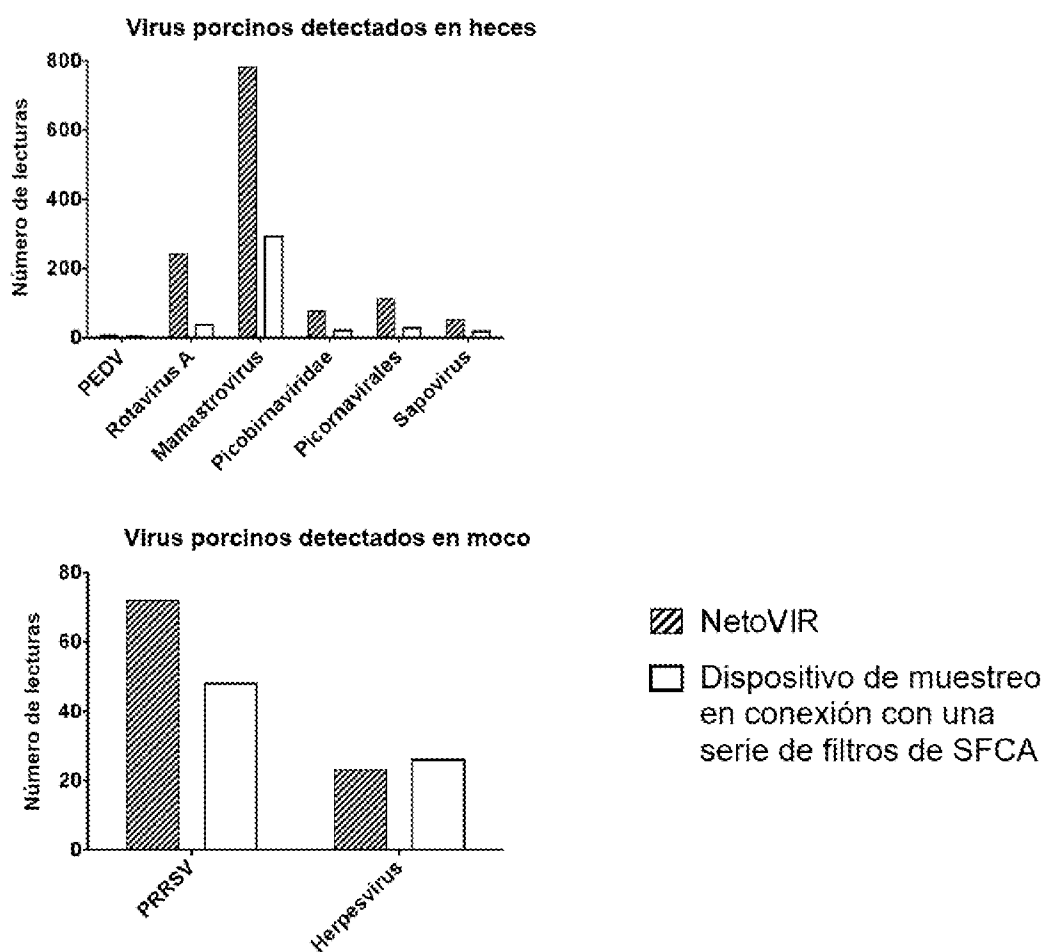


Fig. 16

