

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 335**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

A23L 3/358 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010** **E 10737274 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016** **EP 2467471**

54 Título: **Método para aislar virus**

30 Prioridad:

17.08.2009 EP 09010584

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2016

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**ROSSMANITH, PETER;
MESTER, PATRICK JULIAN;
HUEHN, STEPHAN y
WAGNER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 565 335 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para aislar virus

La presente invención se refiere a un método para el aislamiento de virus a partir de una muestra. La muestra se trata con una disolución de extracción que comprende al menos una sal de cloruro divalente opcionalmente en combinación con un líquido iónico dando como resultado el aislamiento de los virus.

Antecedentes de la invención

El aislamiento de virus a partir de muestras complejas para su identificación o caracterización o simplemente para su procesamiento adicional está pasando a ser cada vez más importante, en particular la identificación de patógenos en muestras, tal como muestras de alimento o muestras clínicas como sangre, tejido o heces. Sin embargo, con el fin de identificar claramente y opcionalmente cuantificar los virus comprendidos en una muestra, deben proporcionarse métodos para su aislamiento.

A diferencia de otros microorganismos tales como células bacterianas, que pueden multiplicarse antes de su detección, es necesario detectar directamente la mayoría de las partículas de virus en la cantidad presente en la respectiva muestra. Por este motivo, es incluso más importante generar métodos muy sensibles que permitan la detección e identificación de sólo muy pocas copias de un único virus en una muestra.

La PCR en tiempo real ha ampliado enormemente el campo de aplicación de la PCR como herramienta cuantitativa en biología molecular en general y para la cuantificación e identificación de microorganismos o virus, en particular de patógenos. La PCR en tiempo real permite la detección y cuantificación fiables de hasta una única diana de ácido nucleico por muestra de PCR, pero requiere ácidos nucleicos de molde altamente purificados. Especialmente cuando se trata de diagnósticos de rutina y de la detección cuantitativa de células o virus en entornos complejos tales como alimentos, estos requisitos desempeñan un papel clave ya que los efectos inhibidores provocados por componentes de estos entornos pueden influir en o incluso inhibir la reacción de PCR. Además, es crucial usar un método de recuperación fiable y eficaz para su uso para el aislamiento de los organismos objetivo a partir de muestras complejas tales como alimentos. Dado que las muestras tales como alimentos implican generalmente grandes volúmenes de muestra, normalmente se usan métodos microbiológicos para el aislamiento y enriquecimiento de microorganismos. Estos métodos representan los métodos "de referencia" y las nuevas técnicas alternativas deben evaluarse comparándolas con los mismos.

Se han dedicados grandes esfuerzos para establecer métodos para la separación de microorganismos, por ejemplo de bacterias, de alimentos, que cumplen los requisitos exigentes de la PCR en tiempo real y de otros métodos moleculares para el análisis posterior de los microorganismos.

También se ha intentado el aislamiento de ácidos nucleicos directamente de alimentos usando métodos de aislamiento de ácido nucleico usados comúnmente en biología molecular. Otros métodos utilizan la afinidad de biomoléculas a estructuras de superficie de microorganismos, pudiendo ser dichas biomoléculas, por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fagos que se unen a bacterias y péptidos antimicrobianos (AMP) opcionalmente en combinación con perlas magnéticas, portaobjetos de vidrio silanizados o transferencia de colonias directa. Por ejemplo, para la detección directa de *Listeria monocytogenes* puede usarse un sistema de separación de dos fases acuosas (Lantz *et al.* Appl Environ Microbiol. (1994) 60:3416-3418).

La mayoría de estos métodos tienen inconvenientes tales como un tamaño insuficiente del volumen de muestra procesado, límites de detección elevados, tasas de recuperación bajas, ausencia de aislamiento cuantitativo de células, un procedimiento que requiere mucho tiempo y costes elevados. Además, la aplicación de estos métodos se ha restringido en la mayoría de los casos a sólo una o un número limitado de diferentes matrices de alimento. Basándose en los requisitos para la cuantificación directa de patógenos en alimentos que son (i) un gran volumen de muestra, (ii) una tasa de recuperación reproducible a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones objetivo, y (iii) la eliminación de inhibidores para ayudar a métodos moleculares alternativos para el análisis posterior, deben proporcionarse nuevos protocolos para el aislamiento de patógenos tales como virus o bacterias.

El documento WO 2008/017097 da a conocer un método para aislar células que están rodeadas por una pared celular de matrices complejas tales como productos alimenticios. Este método usa un tampón de extracción que comprende un agente caotrópico en combinación con un detergente.

Como puede observarse a partir de los métodos conocidos mencionados anteriormente, la mayoría de los métodos van dirigidos al aislamiento de microorganismos más grandes tales como células bacterianas. Aunque las células bacterianas son objetos bastante grandes que pueden investigarse y recuperarse de una muestra de manera bastante sencilla, ninguno de los procedimientos conocidos ofrece una manera sencilla y eficaz para el aislamiento de objetos pequeños tales como virus.

La técnica anterior también incluye Herrmann *et al*, Applied Microbiology, 16, 1968, 595-602. Aquí se da a conocer la extracción de un virus contaminante "modelo" (un virus de Coxsackie) de requesón. Se homogeneizó la muestra tras la preparación en un tampón que contenía, entre otros, $MgCl_2$ a aproximadamente 1 M (tabla 2). Tras la homogenización, se realizaron diversas etapas de concentración y de centrifugación, y se sometió a prueba el virus en cultivo de tejido. La homogenización se realizó durante 2 minutos.

En L. Croci *et al.*, Food Anal. Methods (2008), 1, 73-84, los autores comentan diversos intentos para extraer y concentrar virus a partir de muestras de alimento. Llegan a la conclusión que la contaminación viral se identifica cada vez más debido a enfermedades de transmisión alimentaria, tales como las enfermedades provocadas por norovirus, virus de la hepatitis A, rotavirus o enterovirus. No obstante, se concluye que (aunque se han hecho varios intentos para extraer virus) son necesarios métodos más sensibles, fiables y normalizados.

En consecuencia, existe una clara necesidad de métodos cuantitativos y reproducibles para el aislamiento de virus a partir de matrices complejas, tales como alimentos y muestras clínicas.

Breve descripción de la invención

Se ha encontrado que pueden aislarse virus de manera sencilla y muy eficaz a partir de matrices complejas usando un tampón que comprende al menos una sal de cloruro divalente opcionalmente en combinación con un líquido iónico. Sorprendentemente, la adición de la sustancia o sustancias mencionadas anteriormente da como resultado una lisis de la matriz de muestra compleja tan eficaz que pueden aislarse incluso los virus que normalmente tienden a "adherirse" a la matriz de muestra.

La presente invención se refiere a un método para aislar virus tal como se expone en las reivindicaciones.

La divulgación también se refiere a un kit para el aislamiento de virus a partir de una muestra compleja que comprende

- una disolución de extracción que comprende al menos una sal de cloruro divalente y/o un líquido iónico

y

- al menos una enzima biodegradadora.

Descripción de la invención

Sorprendentemente, resultó que la incubación de una muestra compleja con una disolución de extracción que comprende al menos una sal de cloruro divalente opcionalmente en combinación con un líquido iónico da como resultado una disolución de la muestra tan eficaz que incluso las partículas virales se liberan sin destruirse.

El método según la presente invención puede usarse para aislar virus, también denominados partículas de virus. Un experto en la técnica conoce los virus. Una partícula de virus completa consiste en ácido nucleico rodeado por una capa protectora de proteína denominada cápside. Éstas están formadas normalmente por subunidades de proteína idénticas denominadas capsómeros. La forma de la cápside puede servir como base para la distinción morfológica de los virus. En general, hay cuatro tipos morfológicos de virus principales:

- Helicoidales

El virus del mosaico del tabaco es un ejemplo de un virus helicoidal.

- Icosaédricos

- Con envuelta

El virus de la gripe y el VIH usan esta estrategia.

- Complejos

Un experto en la técnica conoce los diferentes tipos de virus.

La presente invención permite aislar virus en general, preferiblemente virus de alimentos y patógenos, especialmente aquellos relevantes para los seres humanos, por ejemplo aquellos que potencialmente están presentes en alimentos de consumo humano o patógenos con relevancia clínica. A continuación se enumeran

algunos virus a modo de ejemplo que son de especial interés. O bien tienen importancia epidemiológica, tal como el virus influenza (*Orthomyxoviridae*), VIH 1 + 2 (*Orthoretroviridae*), poxvirus (*Poxviridae*, *Orthopoxviridae*), coronavirus (*Coronaviridae*, *Nidovirales*), flavivirus, poliomavirus o papilomavirus o bien pueden encontrarse como contaminantes especialmente en muestras de alimento, tales como adenovirus (*Adenoviridae*), rotavirus (*Rheoviridae*), enterovirus, norovirus, virus Norwalk / de tipo Norwalk (*Caliciviridae*), virus de la hepatitis A (*Picornaviridae*), virus de la hepatitis E (*Herpeviridae*) o astrovirus.

El tamaño (= diámetro) de las partículas virales que van a aislarse según la presente invención es normalmente de entre 10 y 500 nm, preferiblemente de entre 10 y 200 nm, más preferiblemente de entre 10 y 100 nm.

El término “muestra compleja” se refiere a una muestra o matriz de muestra que comprende un mayor o menor número de diferentes compuestos de origen principalmente orgánico, que pueden ser líquidas y/o sólidas. Una muestra compleja según la presente invención comprende normalmente una matriz que comprende péptidos, polipéptidos, proteínas (incluso también enzimas), hidratos de carbono (hidratos de carbono complejos y simples), lípidos, ácidos grasos, grasa, ácidos nucleicos, etc. Una “muestra compleja” también puede comprender una o más sustancias que interfieren con el aislamiento y/o la detección de los virus, por ejemplo inhibiendo la amplificación de los ácidos nucleicos virales. En la invención, la “muestra compleja” es una muestra de alimento o clínica.

Las muestras complejas incluyen, pero no se limitan a, alimentos (por ejemplo leche de vaca, oveja, cabra, yegua, burra, camella, yak, búfala de agua y rena, productos lácteos, carne de vacuno, cabra, cordero, ovino, cerdo, ancas de rana, ternera, roedores, caballo, canguro, aves de corral, incluyendo pollo, pavo, pato, ganso, pichón o paloma, avestruz, emú, alimentos marinos, incluyendo peces de aleta tal como salmón y tilapia, y marisco tal como moluscos y crustáceos, y serpientes, productos cárnicos, productos vegetales, semillas, cereales de gramíneas, incluyendo maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo y mijo, cereales de plantas no gramíneas, incluyendo trigo sarraceno, amaranto y quinoa, legumbres, incluyendo judías, cacahuetes, guisantes y lentejas, frutos secos, incluyendo almendras, nueces y piñones, semillas oleaginosas, incluyendo semillas de girasol, colza y sésamo, plantas tales como hortalizas de raíz, incluyendo patatas, tapioca y nabos, hortalizas de hoja, incluyendo amaranto, espinaca y col, plantas marinas, incluyendo dulce, kombu y *Alaria esculenta*, hortalizas de tallo, incluyendo brotes de bambú, nopales y espárragos, plantas con inflorescencias, incluyendo alcachofas, brócoli y lirios de día, y hortalizas de fruto, incluyendo calabaza, oca y berenjena, frutas, hierbas y especias, sangre completa, orina, esputo, vómito, saliva, líquido amniótico, plasma, suero, lavado pulmonar y tejidos, incluyendo pero sin limitarse a, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas y similares. El experto en la técnica apreciará que también son muestras que se encuentran dentro del alcance de la divulgación realizada los lisados, extractos o material (homogeneizado) obtenido de cualquiera de las muestras a modo de ejemplo anteriores o mezclas de dichas muestras a modo de ejemplo o composiciones que comprenden una o más de dichas muestras a modo de ejemplo.

Según la presente invención, el término “sal de cloruro divalente” significa cloruros de cationes divalentes, tales como $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$, $ZnCl_2$ o $MnCl_2$. Las sales de cloruro divalentes más preferidas son $MgCl_2$ y $ZnCl_2$.

El término “tampón” o “disolución tampón” tal como se usan en el presente documento, se refiere a disoluciones o composiciones acuosas que resisten los cambios de pH cuando se añaden ácidos o bases a la disolución o composición. Esta resistencia al cambio de pH se debe a las propiedades de tamponamiento de tales disoluciones. Por tanto, disoluciones o composiciones que presentan actividad de tamponamiento se denominan tampones o disoluciones tampón. Los tampones generalmente no tienen una capacidad ilimitada para mantener el pH de una disolución o composición. Más bien, normalmente pueden mantener el pH dentro de determinados intervalos, por ejemplo entre pH 7 y pH 9. Normalmente, los tampones pueden mantener el pH dentro de un logaritmo por encima y por debajo de su pK_a (véase, por ejemplo C. Mohan, Buffers, A guide for the preparation and use of buffers in biological systems, CALBIOCHEM, 1999). Los tampones y las disoluciones tampón normalmente están compuestos por sales de tampón o preferiblemente por componentes de tampón no iónicos, tales como TRIS y HEPES. El tampón añadido a la disolución de extracción garantiza que el valor de pH será estable durante el transcurso de la disolución de la matriz. Un valor de pH estabilizado contribuye a resultados reproducibles, una lisis eficaz y conservación de las células aisladas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “detergente” se refiere a moléculas que tienen características lipófilas así como hidrófilas (es decir anfífilas). Un detergente según la presente invención puede comprender, por ejemplo, un residuo de ácido graso y una parte hidrófila (por ejemplo aniónica o catiónica).

Según la divulgación hecha, la muestra puede ser una muestra de alimento, heces, un fluido corporal, en particular sangre, plasma o suero, agua o una muestra de tejido.

Muestras particularmente preferidas son muestras con una matriz compleja (es decir que comprende, entre otros, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, etc.) y/o una alta viscosidad.

La muestra de alimento es preferiblemente un producto lácteo, preferiblemente leche, en particular leche fresca,

- leche en polvo, yogur, queso o helado, un producto de pescado, preferiblemente pescado fresco, un producto cárnico, preferiblemente carne cruda, solución de lavado de carne o salchichas, solución de lavado de ensalada, chocolate, huevo o productos de huevo, tales como mayonesa, ensalada, alimentos marinos, preferiblemente mejillones, frutas, preferiblemente bayas, y pimientos. Muestras de alimento particularmente preferidas usadas en el
- 5 método según la presente invención son muestras de las que se conoce habitualmente que comprenden virus potencialmente patógenos y de las que los virus (debido a una matriz compleja) son difíciles de extraer o en las que son difíciles de detectar con los métodos conocidos en la técnica. En particular, el queso se conoce como alimento con una matriz compleja y alta viscosidad. Muestras clínicas particularmente preferidas son heces y sangre. Las muestras también incluyen muestras de cultivo de células.
- 10 Según la presente invención, la disolución de extracción usada como sistema de lisis de matriz comprende una sal de cloruro divalente opcionalmente en combinación con un líquido iónico. Se ha encontrado que dependiendo del tipo de la muestra y dependiendo del tipo del virus, diferentes composiciones de la disolución de extracción son las más adecuadas. Por ejemplo, los productos lácteos con una matriz compleja que pueden disolverse o extraerse en condiciones suaves se tratan preferiblemente con una disolución de extracción que comprende MgCl_2 .
- 15 Las muestras que comprenden una mayor cantidad de almidón (más del 5% p/p) o las muestras de carne se extraen o se solubilizan preferiblemente con una disolución de extracción que comprende ZnCl_2 en concentraciones de entre 5 y 10 M.
- Las sales de cloruro divalentes, tales como MgCl_2 , están presentes normalmente en concentraciones de entre 0,5 y 6 M, preferiblemente de entre 0,5 y 4 M, más preferiblemente de entre 1 y 2 M.
- 20 También puede usarse ZnCl_2 en mayores concentraciones debido a su solubilidad en agua muy alta. Puede usarse en concentraciones de hasta aproximadamente 15 M. Concentraciones de ZnCl_2 preferidas son de entre 1 y 10 M. Esto ofrece la posibilidad de crear condiciones de extracción muy específicas y de usar directamente la disolución de extracción para la centrifugación en gradiente. Se muestra un ejemplo de un protocolo de extracción con ZnCl_2 en la figura 2. Tras la incubación de la muestra con una disolución de extracción que comprende ZnCl_2 , se ajusta la
- 25 densidad de la mezcla a una magnitud adecuada para la centrifugación en gradiente mediante la adición de agua. Tras esta primera etapa de centrifugación para eliminar los desechos de la muestra y otras impurezas, la muestra restante puede diluirse de nuevo para ajustar la densidad para otra etapa de centrifugación o puede someterse alternativamente a una etapa de filtración.
- 30 El líquido iónico (si está presente) está presente normalmente en concentraciones de entre el 0,5 y el 100% en peso, preferiblemente entre el 1 y el 60% en peso, más preferiblemente entre el 7 y el 40% en peso, basándose en el peso de la mezcla. El líquido iónico puede ser un líquido iónico o una mezcla de dos o más líquidos iónicos.
- La mejor concentración de la sal de cloruro divalente opcionalmente en combinación con un líquido iónico depende principalmente de la muestra que va a disolverse y la especie viral que va a aislarse. El experto en la técnica puede someter a prueba estos parámetros de manera sencilla.
- 35 La disolución de extracción para su uso en la presente invención es normalmente una disolución acuosa y/o una disolución tampón que puede comprender uno o más disolventes orgánicos, preferiblemente uno o más disolventes miscibles con agua, tal como etanol o metanol, también que comprende al menos una sal de cloruro divalente y/o un líquido iónico. Normalmente tiene un valor de pH mayor de 5 y menor de 11, preferiblemente mayor de 6 y menor de 9, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. Preferiblemente, la disolución de extracción comprende agua, una disolución
- 40 tampón o una mezcla de agua o una disolución tampón con hasta el 50% (v/v) de uno o más disolventes orgánicos miscibles con agua y al menos una sal de cloruro divalente en una concentración de entre 0,5 y 6 M.
- El tampón que puede usarse en el método de la presente invención se selecciona preferiblemente del grupo de tampón fosfato, tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS), tampón de solución salina tamponada con TRIS (TBS), TRIS/EDTA (TE), ACES, MES, PIPES, HEPES y tricina. Tampones preferidos son PBS y tricina.
- 45 Con el fin de conseguir una disolución incluso mejor de la muestra, dicha muestra puede incubarse adicionalmente con al menos un detergente, preferiblemente un detergente aniónico y/o un detergente zwitteriónico y/o un detergente no iónico. El detergente puede añadirse a la muestra hasta alcanzar una concentración final en la mezcla del 0,01% al 5%, preferiblemente del 0,1% al 3%, más preferiblemente del 0,2% al 2% (% en peso).
- 50 El detergente aniónico es preferiblemente dodecilsulfato de sodio (SDS), dodecilsulfato de litio (LDS) o desoxicolato (DOC).
- El detergente zwitteriónico es preferiblemente 1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio] (CHAPS) o 2-hidroxil-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio] (CHAPSO).

El detergente no iónico es preferiblemente un alcohol alifático etoxilado, que comprende preferiblemente un alcohol alifático C13 a C15. Tales alcoholes alifáticos etoxilados se conocen también como Lutensol. Detergentes no iónicos adecuados son, en particular, etoxilatos de acilo, alquilo, oleílo y alquilarilo. Estos productos pueden obtenerse, por ejemplo, en el mercado con el nombre Genapol o Lutensol. Esto abarca, por ejemplo, mono-, di- y trialquilfenoles etoxilados (grado de EO (grupo etilenoxilo): de 3 a 50, radical sustituyente alquilo: C4 a C12) y también alcoholes grasos etoxilados (grado de EO: de 3 a 80; radical alquilo: C8 a C36), especialmente etoxilatos de alcohol graso C12-C14 (3-8), etoxilatos de oxoalcohol C13-C15 (3-30), etoxilatos de alcohol graso C16-C18 (11-80), etoxilatos de oxoalcohol C10 (3-11), etoxilatos de oxoalcohol C13 (3-20), monooleato de polioxietilenosorbitano que tiene 20 grupos óxido de etileno, copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno que tiene un contenido mínimo del 10% en peso de óxido de etileno, los éteres de poli(óxido de etileno) (4-20) de alcohol oleílico y también los éteres de poli(óxido de eteno) (4-20) de nonilfenol. También pueden usarse mezclas de dichos detergentes no iónicos.

Naturalmente es posible añadir a la disolución de extracción una o más sustancias adicionales, tales como agentes desestabilizantes o enzimas de degradación de biopolímeros que ayudan a degradar sustancias presentes en muestras específicas. Tal como se comenta más adelante, un ejemplo es la adición de enzimas de degradación de almidón para muestras de alimento que comprenden altas cantidades de colágeno y/o almidón.

La incubación se realiza normalmente a temperaturas de entre 18°C y 98°C, preferiblemente de entre 25°C y 80°C, más preferiblemente de entre 35°C y 70°C.

La muestra se incuba normalmente con la disolución de extracción durante un tiempo de entre 10 minutos y 6 horas, preferiblemente de entre 20 minutos y 1 hora.

Con el fin de disolver la muestra de manera incluso más eficaz y en un tiempo reducido, es ventajoso realizar la incubación a una temperatura elevada.

Sorprendentemente, resultó que la lisis de la matriz según la presente invención es suficientemente eficaz para permitir el aislamiento de virus tras la lisis. Los virus pueden aislarse mediante cualquier método conocido. Métodos preferidos son centrifugación, filtración, tamizado, electroforesis en gel, filtración en gel, dielectroforesis, precipitación, tal como precipitación con polietilenglicol o inmunoprecipitación, extracción con disolvente (con 2 ó 3 fases) y ultrasonidos o unión por afinidad, por ejemplo usando anticuerpos, lectinas, proteínas que se unen a virus o aptámeros que se inmovilizan preferiblemente, por ejemplo, sobre perlas.

Los métodos también pueden combinarse. Preferiblemente, los virus se aíslan principalmente mediante filtración, tamizado o centrifugación, lo más preferiblemente mediante centrifugación. Si es necesario, tras la etapa de centrifugación, los virus pueden aislarse finalmente mediante precipitación. En una realización, esto se lleva a cabo realizando una primera etapa de aislamiento, tal como centrifugación, coagulando después los virus para formar aglomerados, por ejemplo añadiendo anticuerpos adecuados, y aislando después los virus mediante precipitación.

La centrifugación se lleva a cabo normalmente a de 500 a 300.000 g, más preferiblemente a más de 1.000 g, incluso más preferiblemente a más de 20.000 g.

En una realización preferida, se realiza un procedimiento de centrifugación por etapas. En una primera etapa de centrifugación con una centrifugación normalmente de entre 100 y 3.500 g, se eliminan la mayor parte de la matriz de muestra y componentes adicionales, tales como células bacterianas. El sobrenadante restante que comprende al menos las partículas virales puede centrifugarse adicionalmente para aislar las partículas virales. Esto se realiza normalmente con una centrifugación a de 10.000 a 300,000 g dependiendo del tamaño y el tipo del virus.

Alternativamente, tras la eliminación de la matriz de muestra y componentes adicionales (por ejemplo mediante centrifugación), el sobrenadante restante puede tratarse con componentes adecuados para hacer precipitar virus. Ejemplos de tales componentes son $Al_2(SO_4)_3$, azul brillante de Coomassie (R o G), $ZnCl_2$, $MgCl_2$, $NaPO_4$, $ZnSO_4$, cloruro de amonio o polietilenglicol. Los virus aglomerados pueden aislarse entonces mediante centrifugación normalmente de entre 1.000 y 20.000 g. Se ha encontrado que para el método según la presente invención $MgCl_2$ y especialmente $ZnCl_2$ son componentes preferidos para la precipitación de virus. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad del componente necesaria para precipitar los virus. Se aplican $ZnCl_2$ y $MgCl_2$ normalmente en una cantidad que da como resultado concentraciones de más de 3 mol/l, preferiblemente de aproximadamente 4 a 5 mol/l.

Si deben aislarse células bacterianas y partículas virales en paralelo, la muestra puede centrifugarse a baja velocidad (normalmente de entre 100 y 500 g) para eliminar la matriz de la muestra. El sobrenadante puede tratarse entonces con componentes adecuados para hacer precipitar virus. Los virus aglomerados y las células bacterianas pueden aislarse entonces mediante centrifugación normalmente de entre 1.000 y 20.000 g.

El método de centrifugación por etapas es una manera preferida para usar el método de la invención para no sólo

aislar virus sino también aislar células bacterianas u otras células rodeadas por una pared celular y virus a partir de una muestra. Las células rodeadas por una pared celular y los virus tienen propiedades totalmente diferentes, pero se ha encontrado que el método según la presente invención ofrece por primera vez la posibilidad de aislar ambas especies en paralelo (pero con la posibilidad de aislarlos unos después de otros o conjuntamente de manera simultánea).

Las disoluciones de extracción para su uso según la presente invención también son, en principio, adecuadas para el aislamiento de células rodeadas por una pared celular, tales como preferiblemente células bacterianas. Las disoluciones de extracción que comprenden sales de cloruro divalentes, preferiblemente $MgCl_2$ opcionalmente en combinación con un líquido iónico, ofrecen incluso la posibilidad de aislar células bacterianas viables.

El término "células rodeadas por una pared celular" se refiere a todas las células conocidas que tienen o que comprenden una pared celular como barrera con respecto al entorno. Ejemplos de organismos o células que tienen una pared celular son bacterias, arqueobacterias, hongos, plantas y algas. A diferencia de estos, los animales y la mayoría de los demás protistas tienen membranas celulares sin paredes celulares circundantes. Tal como se usa en el presente documento, las "células viables" incluyen células con metabolismo activo, preferiblemente propagables, especialmente células que pueden multiplicarse.

Las células bacterianas que van a aislarse con el método según la presente divulgación son, por ejemplo, bacterias Gram negativas o Gram positivas, lo más preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en *Listeria* spp., *S. aureus*, *P. paratuberculosis*, *Salmonella* spp. o *C. jejuni*.

Si la mezcla de muestra/disolución de extracción se filtra o se tamiza, los virus se retienen en la superficie de dicho filtro, tamiz o gel, cuando el tamaño de poro del filtro está adaptado al tamaño de las partículas virales que van a aislarse. Naturalmente, también es posible aplicar más de una etapa de filtración con diferentes filtros que tienen tamaños de poro variables. Tras la etapa de filtración, los virus pueden retirarse mediante lavado de la superficie del filtro (véase, por ejemplo, Stevens KA y Jaykus L-A, Crit Rev Microbiol (2004) 30:7-24). La filtración de la muestra lisada se requiere en particular cuando la muestra compleja comprende material que difícilmente se lisará o no se lisará con el método de la presente invención. Estos materiales comprenden normalmente almidón y/o fibras.

Sin embargo, el método preferido para aislar los virus a partir de la mezcla de lisis es la centrifugación o la centrifugación combinada con precipitación.

Naturalmente, también es posible aislar los virus a partir del sedimento disuelto formado tras la etapa de centrifugación mediante métodos inmunológicos que implican anticuerpos, en particular anticuerpos inmovilizados sobre perlas, preferiblemente perlas magnéticas, que van dirigidos a epítopos presentes en los virus que van a aislarse. Dado que el uso de perlas de anticuerpos para aislar virus da como resultado en algunos casos una tasa de recuperación reducida, tales métodos pueden emplearse preferiblemente para un aislamiento cualitativo.

Con el fin de facilitar la disolución de la muestra, dicha muestra puede, por ejemplo, homogeneizarse usando un homogeneizador Stomacher antes de su incubación con la disolución de extracción. La disolución se ve ayudada y/o acelerada adicionalmente cuando la mezcla de muestra/disolución de extracción se agita durante la incubación.

La etapa de incubación puede (dependiendo de la matriz de muestra) repetirse una o varias veces, por ejemplo dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o diez veces. Entre estas etapas de incubación los virus y la matriz de muestra restante pueden separarse del sobrenadante mediante, por ejemplo, centrifugación.

Los virus aislados con el método según la presente invención pueden usarse para determinar cuantitativa y/o cualitativamente los virus en la muestra. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante recuento de células, mediante métodos de PCR, en particular mediante PCR en tiempo real, usando lectinas o mediante métodos que implican anticuerpos, proteínas que se unen de manera selectiva a virus o aptámeros dirigidos a estructuras de superficie de dichas partículas de virus (por ejemplo ELISA o RIA específico para partículas). Tras la etapa de aislamiento los virus se lavan preferiblemente con agua, una disolución tampón y/o disoluciones que comprenden detergente. Sin embargo, naturalmente, es posible añadir al tampón de lavado una o más sustancias adicionales. La etapa de lavado puede repetirse varias veces (por ejemplo 2, 3, 4, 5 ó 10 veces) o sólo una vez. En el transcurso de la etapa de lavado los virus normalmente se resuspenden en el tampón y después se filtran o centrifugan. Si hay partículas insolubles presentes en la muestra disuelta (por ejemplo partículas de fosfato de calcio de queso), dichas partículas pueden eliminarse o bien mediante centrifugación a una velocidad de rotación inferior o bien dejando que las partículas se depositen a lo largo del tiempo (los virus permanecerán en ambos casos en el sobrenadante).

Los virus también pueden lavarse con disoluciones que comprenden detergente. Esto permitirá eliminar adicionalmente los residuos de grasa contenidos potencialmente en la suspensión celular. Detergentes preferidos para su uso en esta etapa del método son los detergentes usados regularmente para la eliminación de grasa.

Según un aspecto preferido de la presente divulgación, se determina la cantidad de los virus en la muestra.

La cantidad de los virus en la muestra puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, en particular mediante métodos tales como series de dilución, recuento de fagos, PCR en tiempo real/RT PCR en tiempo real, etc.

- 5 Según otra realización preferida de la presente invención, se aísla el ADN o ARN de los virus. Dependiendo de los virus, pueden emplearse diversos métodos para extraer ADN (por ejemplo ADN genómicos, plásmidos) o ARN (por ejemplo ARNm). Todos estos métodos se conocen en la técnica y los protocolos individuales dependen principalmente de los virus que van a lisarse.

- 10 Con el fin de determinar o monitorizar la eficacia del procedimiento de aislamiento, puede añadirse una cantidad definida de virus de control a la muestra. Los virus de control son normalmente partículas virales inactivadas. Preferiblemente son similares a los virus que se asume que están presentes en la muestra, pero preferiblemente no son idénticos a los virus que se asume que están presentes en la muestra. La cantidad de los virus de control añadidos recuperados permite determinar la eficacia del método de la presente invención y también puede indicar la cantidad de los virus que van a aislarse y determinarse presentes en la muestra inicial.

- 15 Según un aspecto de la presente divulgación, la muestra se incuba adicionalmente con al menos una enzima de degradación de biopolímeros.

- 20 Algunas muestras a partir de las que se aíslan los virus comprenden estructuras de biopolímeros que pueden no lisarse o lisarse sólo de una manera ineficaz mediante la adición de la disolución de extracción. Si la muestra, en particular la muestra de alimento, comprende por ejemplo colágeno y/o almidón en una cantidad de, por ejemplo, más del 10%, dicha muestra puede tratarse con sustancias que pueden degradar al menos parcialmente el contenido en colágeno y almidón antes de su incubación con el sistema de lisis de matriz de la presente divulgación.

- 25 Por tanto, la muestra se incuba preferiblemente de manera adicional con al menos una enzima de degradación de biopolímeros. Muestras que se incuban preferiblemente con enzimas de degradación de biopolímeros son, por ejemplo, carne, pescado, etc. El helado, los huevos, la sangre, la leche, los productos lácteos etc. habitualmente no requieren la adición de enzima de degradación de biopolímeros. Sorprendentemente resultó que el uso de enzimas solas no permite el aislamiento de virus.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "biopolímero" se refiere a proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, tales como celulosa, almidón y glucógeno, etc. Por tanto una "enzima de degradación de biopolímeros" es una enzima que puede degradar un biopolímero (por ejemplo almidón, celulosa), que puede ser insoluble en un tampón acuoso, para dar sustancias de bajo peso molecular o incluso para dar monómeros. Dado que la enzima de degradación de biopolímeros puede ser activa en determinadas condiciones de pH y temperatura (el uso de tampones específicos también puede desempeñar un papel), es ventajoso realizar la incubación con dichas enzimas en condiciones opcionales. Estas condiciones dependen de la enzima usada y se conocen en la técnica. Además, el tiempo de incubación depende de factores extrínsecos, tales como pH y temperatura. Por tanto, 35 el tiempo de incubación puede variar desde 10 s hasta 6 h, preferiblemente de 30 s a 2 h.

La enzima de degradación de biopolímeros se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en proteasas, celulasas y amilasas. Ejemplos de estas enzimas son Savinase 24 GTT (subtilina), Carenzima 900 T, Stainzyme GT. Enzimas de degradación de almidón son, por ejemplo, ciclodextrina glucanotransferasa, alfa-amilasa, beta-amilasa, glucoamilasa, pululanasa e isoamilasa, en particular α -amilasa.

- 40 En métodos conocidos que usan tampones que comprenden agentes caotrópicos y detergentes, las enzimas de degradación de biopolímeros no pueden añadirse durante la etapa de lisis de la matriz, ya que los caótropos y detergentes pueden influir negativamente en la actividad de la enzima, de modo que los biopolímeros no se degradan eficazmente para dar fragmentos o monómeros.

- 45 A diferencia de esto, en el método según la presente invención, en el que en la disolución de extracción se usan sales de cloruro divalentes opcionalmente en combinación con un líquido iónico, la enzima de degradación de biopolímeros puede incubarse con la muestra antes de la etapa b) y/o durante la etapa b) y/o tras la etapa c) (etapa b), siendo la etapa de lisis en la que se incuba la muestra con la disolución de extracción y siendo la etapa c) la etapa de aislamiento).

- 50 El método según la presente invención puede realizarse en el plazo de unas pocas horas, normalmente en el plazo de 1 a 6 horas.

Los líquidos iónicos o las sales líquidas tal como se usan en la presente invención son especies iónicas que consisten en un catión orgánico y un anión generalmente inorgánico. No contienen ninguna molécula neutra y

habitualmente tienen puntos de fusión por debajo de los 373 K.

El área de los líquidos iónicos está investigándose actualmente de manera intensa, dado que las aplicaciones potenciales son muy diversas. Artículos de revisión sobre líquidos iónicos son, por ejemplo, R. Sheldon "Catalytic reactions in ionic liquids", Chem. Commun., 2001, 2399-2407; M.J. Earle, K.R. Seddon "Ionic liquids. Green solvent for the future", Pure Appl. Chem., 72 (2000), 1391-1398; P. Wasserscheid, W. Keim "Ionische Flüssigkeiten - neue Lösungen für die Übergangsmetallkatalyse" [Líquidos iónicos – Disoluciones novedosas para la catálisis con metales de transición], Angew. Chem., 112 (2000), 3926-3945; T. Welton "Room temperature ionic liquid. Solvents for synthesis and catalysis", Chem. Rev., 92 (1999), 2071-2083 o R. Hagiwara, Ya. Ito "Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions", J. Fluorine Chem., 105 (2000), 221-227).

- 5 En general, todos los líquidos iónicos de fórmula general K^+A^- conocidos por el experto en la técnica, en particular los que son miscibles con agua, son adecuados en el método según la invención.

- 15 El anión A^- del líquido iónico se selecciona preferiblemente del grupo que comprende haluros, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, cianamida, tiocianato o imidas de fórmula general $[N(R_i)_2]^-$ o de fórmula general $[N(XR_i)_2]^-$, en las que R_i indica alquilo parcial o completamente sustituido con flúor que tiene de 1 a 8 átomos de C y X indica SO_2 o CO. Los aniones haluro pueden seleccionarse en este caso de aniones cloruro, bromuro y yoduro, preferiblemente de aniones cloruro y bromuro. Los aniones A^- del líquido iónico son preferiblemente aniones haluro, en particular aniones bromuro o yoduro, o tetrafluoroborato o cianamida o tiocianato, siendo el más preferido el tiocianato.

- 20 No hay restricciones *per se* con respecto a la elección del catión K^+ del líquido iónico. Sin embargo, se da preferencia a cationes orgánicos, de manera particularmente preferible cationes amonio, fosfonio, uronio, tiouronio, guanidinio o cationes heterocíclicos.

Los cationes amonio pueden describirse, por ejemplo, mediante la fórmula (1)



en la que

R indica en cada caso, independientemente entre sí,

- 25 H, no pudiendo ser todos los sustituyentes R simultáneamente H,

OR', NR'₂, con la condición de que un máximo de un sustituyente R en la fórmula (1) sea OR', NR'₂,

alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de C,

alqueno de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más dobles enlaces,

alquino de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más triples enlaces,

- 30 cicloalquilo saturado, parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C,

que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C, en el que uno o más R pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X, -NO₂, y en el que uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R que no están en la posición α pueden estar sustituidos por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, en los que R' puede ser = H, fenilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo C₃ a C₇, alquilo C₁ a C₆ no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado y X puede ser = halógeno.

- Los cationes fosfonio pueden describirse, por ejemplo, mediante la fórmula (2)



- 40 en la que

R² indica en cada caso, independientemente entre sí,

H, OR' o NR'₂

alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de C,

alqueno de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más dobles enlaces,

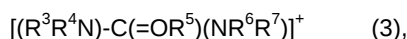
alquino de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más triples enlaces,

cicloalquilo saturado, parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C,

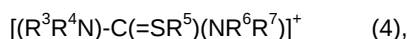
- 5 que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C, en el que uno o más R^2 pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X, -NO₂, y en el que uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R^2 que no están en la posición α pueden estar sustituidos por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, en los que R' = H, fenilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo C₃ a C₇, alquilo no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado en C₁ a C₆ y X = halógeno.

Sin embargo, los cationes de fórmulas (1) y (2) en las que los cuatro o tres sustituyentes R y R^2 están completamente sustituidos con halógenos están excluidos, por ejemplo el catión tris(trifluorometil)metilamonio, el catión tetra(trifluorometil)amonio o el catión tetra(nonafluorobutil)amonio.

- 15 Los cationes de uronio pueden describirse, por ejemplo, mediante la fórmula (3)



y los cationes de tiouronio mediante la fórmula (4),



en las que

- 20 R^3 a R^7 indican cada uno, independientemente entre sí,

hidrógeno, estando excluido el hidrógeno para R^5 ,

alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de C,

alqueno de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más dobles enlaces,

alquino de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más triples enlaces,

- 25 cicloalquilo saturado, parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C,

que pueden estar sustituidos con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C, en el que uno o más de los sustituyentes R^3 a R^7 pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X, -NO₂, y en el que uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R^3 a R^7 que no están en la posición α pueden estar sustituidos por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, en los que R' = H, fenilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo C₃ a C₇, alquilo C₁ a C₆ no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado y X = halógeno.

Los cationes de guanidinio pueden describirse mediante la fórmula (5)



- 35 en la que

R^8 a R^{13} indican cada uno, independientemente entre sí,

hidrógeno, -CN, NR'₂, -OR'

alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de C,

alqueno de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más dobles enlaces,

alquino de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más triples enlaces,

cicloalquilo saturado, parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C,

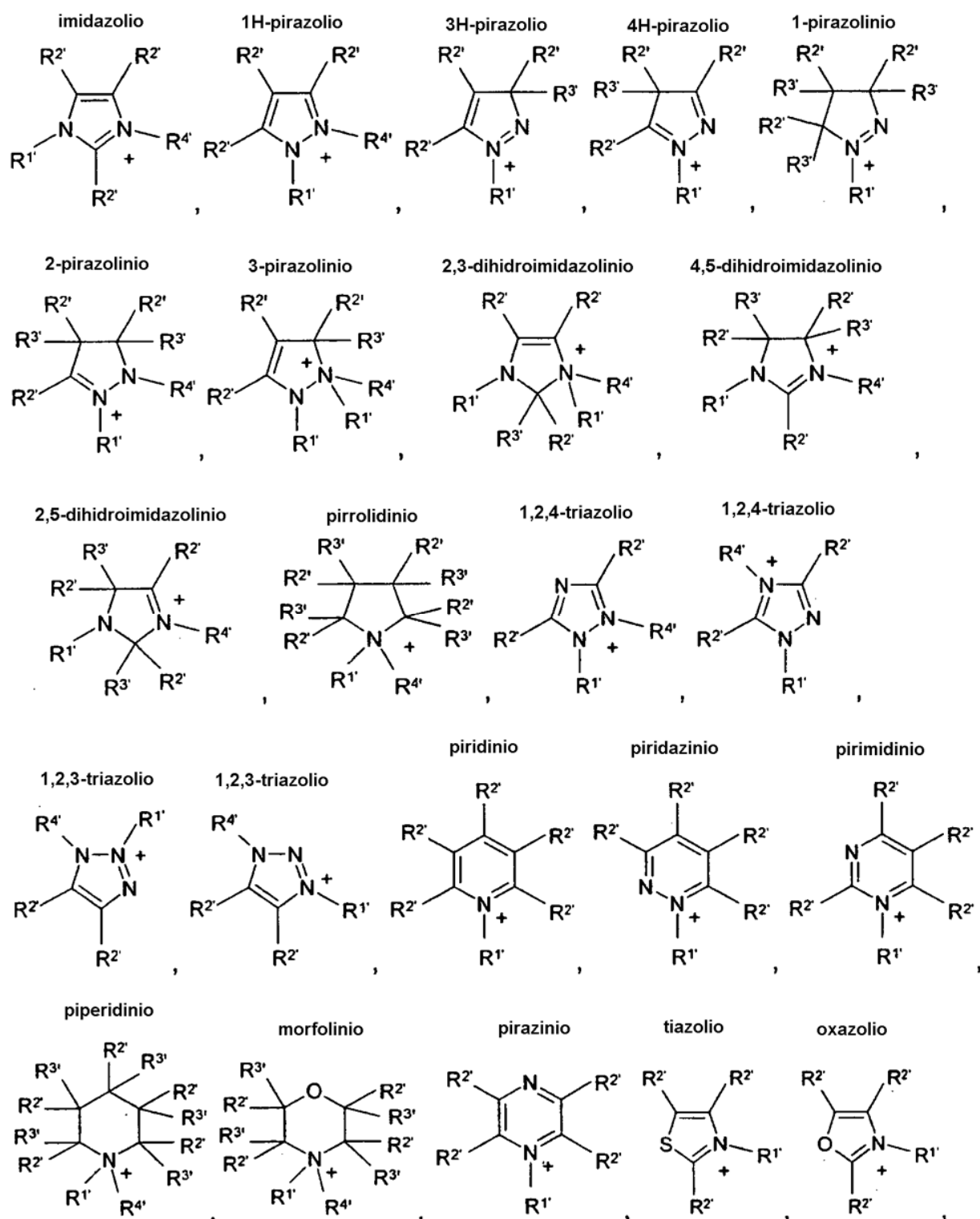
- 5 que pueden estar sustituidos con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C, en el que uno o más de los sustituyentes R^8 a R^{13} pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X, -NO₂, y en el que uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R^8 a R^{13} que no están en la posición α pueden estar sustituidos por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, en los que R' = H, fenilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo C₃ a C₇, alquilo C₁ a C₆ no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado y X = halógeno.
- 10

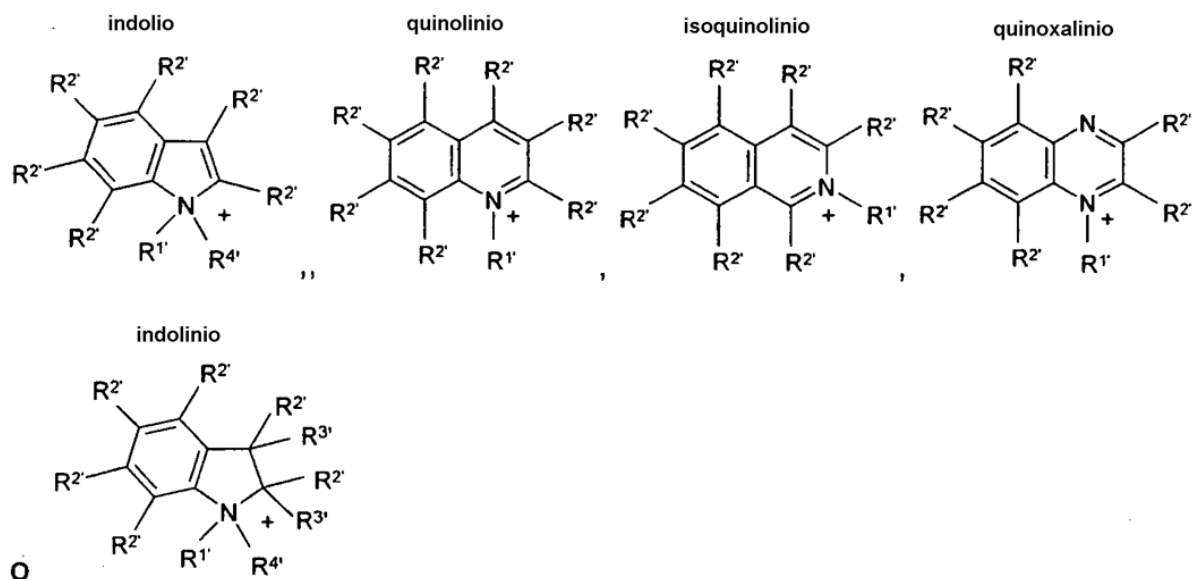
Además, es posible emplear cationes de fórmula general (6)



en la que

- 15 HetN⁺ indica un catión heterocíclico seleccionado del grupo





en los que los sustituyentes

R¹ a R⁴ indican cada uno, independientemente entre sí,

hidrógeno, -CN, -OR', -NR'₂, -P(O)R'₂, -P(O)(OR')₂, -P(O)(NR'₂)₂, -C(O)R', -C(O)OR',

5 alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de C,

alquenilo de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más dobles enlaces,

alquinilo de cadena lineal o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más triples enlaces,

cicloalquilo saturado, parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C,

que pueden estar sustituidos con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C,

10 heteroarilo saturado, parcial o completamente insaturado, heteroaril-alquilo C₁-C₆ o aril-alquilo C₁-C₆,

en los que los sustituyentes R¹, R², R³ y/o R⁴ juntos también pueden formar un sistema de anillo,

en los que uno o más sustituyentes R¹ a R⁴ pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, en particular -F y/o -Cl, u -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X, -NO₂, pero en los que R¹ y R⁴ no pueden simultáneamente estar completamente sustituidos con halógenos, y en los que, en los sustituyentes R¹ a R⁴, uno o dos átomos de carbono no adyacentes que no están unidos al heteroátomo pueden estar sustituidos por átomos y/o grupos de átomos seleccionados de -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, en los que R' puede ser = H, fenilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo C₃ a C₇, alquilo C₁ a C₆ no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado y X = halógeno.

20 Para el propósito de la presente invención, se entiende que sustituyentes completamente insaturados también significan sustituyentes aromáticos.

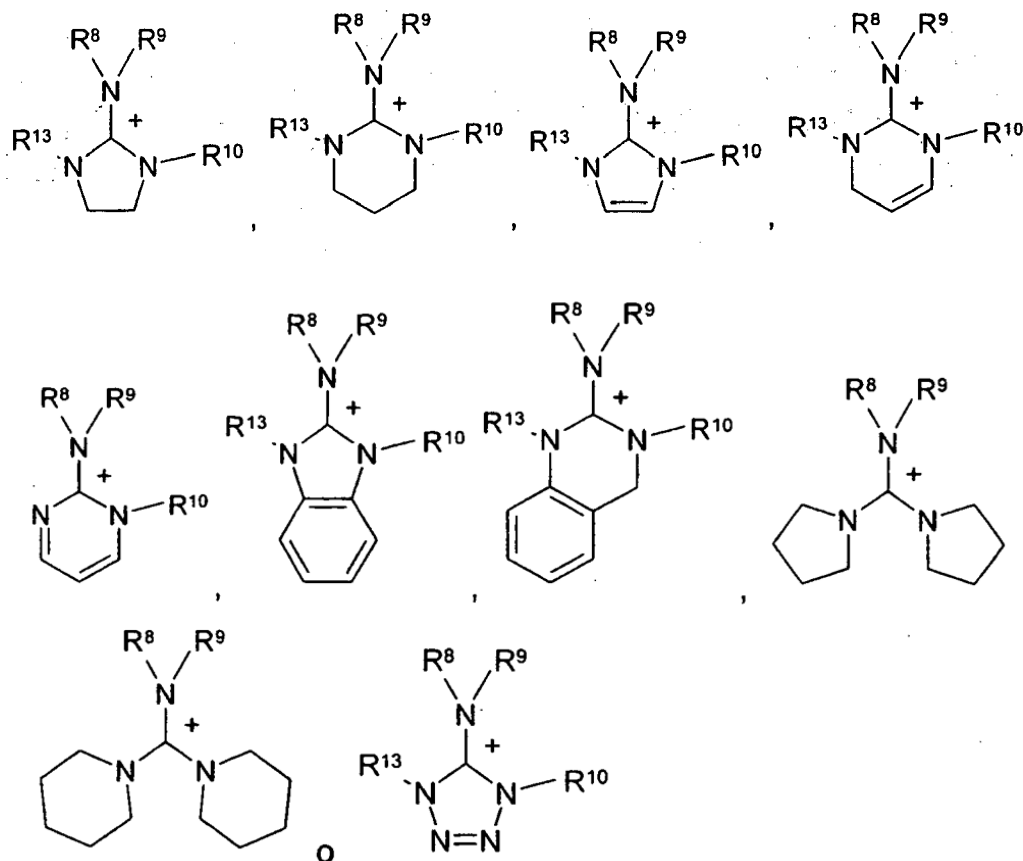
Según la invención, sustituyentes adecuados para R y R² a R¹³ de los compuestos de fórmulas (1) a (5), aparte de hidrógeno, son preferiblemente: grupos alquilo C₁ a C₂₀, en particular C₁ a C₁₄, y grupos cicloalquilo C₃ a C₇ saturados o insaturados, es decir también aromáticos, que pueden estar sustituidos con grupos alquilo C₁ a C₆, en particular fenilo.

Los sustituyentes R y R² en los compuestos de fórmula (1) o (2) pueden ser idénticos o diferentes en este caso. Los sustituyentes R y R² son preferiblemente diferentes.

Los sustituyentes R y R² son de manera particularmente preferible metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, decilo o tetradecilo.

Hasta cuatro sustituyentes del catión guanidinio [C(NR⁸R⁹)(NR¹⁰R¹¹)(NR¹²R¹³)]⁺ pueden también estar unidos en parejas de tal manera que se forman cationes mono-, bi- o policíclicos.

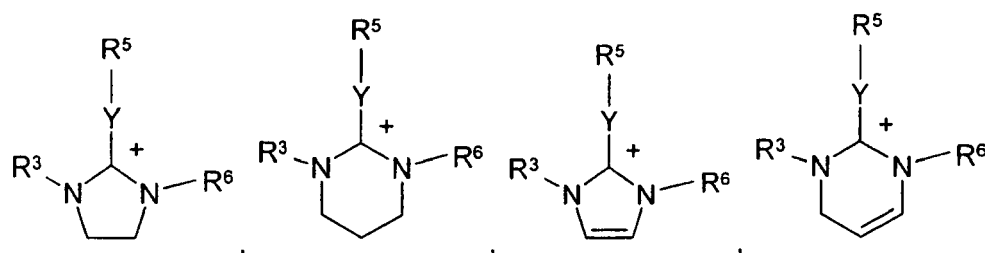
5 Sin restringir la generalidad, ejemplos de tales cationes guanidinio son:

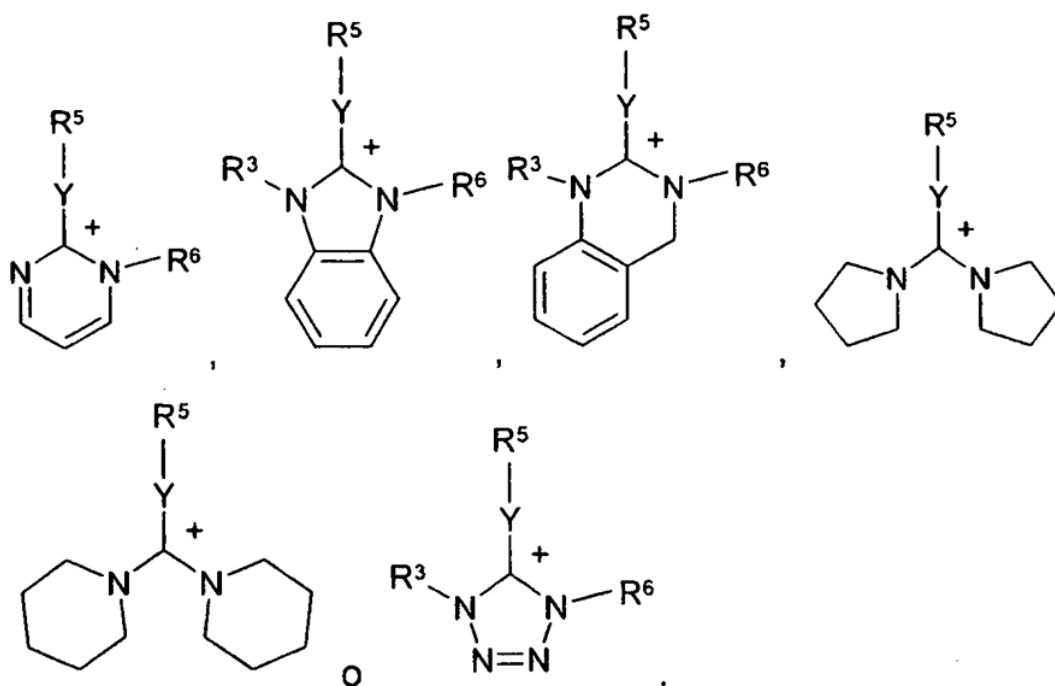


10 en los que los sustituyentes R⁸ a R¹⁰ y R¹³ pueden tener un significado o significado particularmente preferido indicado anteriormente. Si se desea, los anillos carbocíclicos o heterocíclicos de los cationes guanidinio indicados anteriormente pueden también estar sustituidos con alquilo C₁ a C₆, alqueno C₁ a C₆, NO₂, F, Cl, Br, I, OH, alcoilo C₁-C₆, SCF₃, SO₂CF₃, COOH, SO₂NR'₂, SO₂X' o SO₃H, en los que X y R' tienen el significado indicado anteriormente, fenilo no sustituido o sustituido o un heterociclo no sustituido o sustituido.

15 Hasta cuatro sustituyentes del catión uronio [(R³R⁴N)-C(=OR⁵)(NR⁶R⁷)]⁺ o catión tiouronio [(R³R⁴N)-C(=SR⁵)(NR⁶R⁷)]⁺ pueden también estar unidos en parejas de tal manera que se forman cationes mono-, bi- o policíclicos.

Sin restringir la generalidad, ejemplos de tales cationes están indicados a continuación, en los que Y = O o S:





en los que los sustituyentes R^3 , R^5 y R^6 pueden tener un significado o significado particularmente preferido indicado anteriormente. Si se desea, los anillos carbocíclicos o heterocíclicos de los cationes indicados anteriormente pueden también estar sustituidos con alquilo C_1 a C_6 , alquenilo C_1 a C_6 , NO_2 , F, Cl, Br, I, OH, alcoxilo C_1 - C_6 , SCF_3 , SO_2CF_3 , $COOH$, $SO_2NR'_2$, SO_2X o SO_3H o fenilo sustituido o no sustituido o un heterociclo no sustituido o sustituido, en los que X y R' tienen un significado indicado anteriormente.

Los sustituyentes R^3 a R^{13} son cada uno, independientes entre sí, preferiblemente un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de C. Los sustituyentes R^3 y R^4 , R^6 y R^7 , R^8 y R^9 , R^{10} y R^{11} y R^{12} y R^{13} en los compuestos de fórmulas (3) a (5) pueden ser idénticos o diferentes. R^3 a R^{13} son de manera particularmente preferible cada uno, independientemente entre sí, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, fenilo o ciclohexilo, de manera muy particularmente preferible metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o n-butilo.

Según la invención, los sustituyentes adecuados R^{11} a R^{41} de los compuestos de fórmula (6), aparte de hidrógeno, son preferiblemente: grupos alquilo C_1 a C_{20} , en particular C_1 a C_{12} , y grupos cicloalquilo C_3 a C_7 saturados o insaturados, es decir también aromáticos, que pueden estar sustituidos con grupos alquilo C_1 a C_6 , en particular fenilo.

Los sustituyentes R^{11} y R^{41} son cada uno, independientemente entre sí, de manera particularmente preferible metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, decilo, ciclohexilo, fenilo o bencilo. De manera muy particularmente preferible son metilo, etilo, n-butilo o hexilo. En compuestos de pirrolidinio, piperidinio o indolinio, los dos sustituyentes R^{11} y R^{41} son preferiblemente diferentes.

El sustituyente R^{21} o R^{31} es en cada caso, independientemente entre sí, en particular hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, ciclohexilo, fenilo o bencilo. R^{21} es de manera particularmente preferible hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo o sec-butilo. R^{21} y R^{31} son de manera muy particularmente preferida hidrógeno. El grupo alquilo C_1 - C_{12} es, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo o terc-butilo, además también pentilo, 1-, 2- o 3-metilbutilo, 1,1-, 1,2- o 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo o dodecilo. Opcionalmente difluorometilo, trifluorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo o nonafluorobutilo.

Un alquenilo de cadena lineal o ramificado que tiene de 2 a 20 átomos de C, en el que también pueden estar presentes una pluralidad de dobles enlaces, son, por ejemplo, alilo, 2- o 3-butenilo, isobutenilo, sec-butenilo, además 4-pentenilo, isopentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo, $-C_9H_{17}$, $-C_{10}H_{19}$ a $-C_{20}H_{39}$; preferiblemente alilo, 2- o 3-butenilo, isobutenilo, sec-butenilo, además preferiblemente 4-pentenilo, isopentenilo o hexenilo.

Un alquinilo de cadena lineal o ramificado que tiene de 2 a 20 átomos de C, en el que también pueden estar presentes una pluralidad de triples enlaces, es, por ejemplo, etinilo, 1- o 2-propinilo, 2- o 3-butinilo, además 4-pentinilo, 3-pentinilo, hexinilo, heptinilo, octinilo, $-C_9H_{15}$, $-C_{10}H_{17}$ a $-C_{20}H_{37}$, preferiblemente etinilo, 1- o 2-propinilo, 2-

o 3-butinilo, 4-pentinilo, 3-pentinilo o hexinilo.

Aril-alquilo C₁-C₆ indica, por ejemplo, bencilo, feniletilo, fenilpropilo, fenilbutilo, fenilpentilo o fenilhexilo, pudiendo estar tanto el anillo de fenilo como la cadena de alquileo parcial o completamente sustituidos, como se describió anteriormente, con halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X, -NO₂.

Grupos cicloalquilo no sustituidos, saturados o parcial o completamente insaturados que tienen 3-7 átomos de C son por tanto ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclopenta-1,3-dienilo, ciclohexenilo, ciclohexa-1,3-dienilo, ciclohexa-1,4-dienilo, fenilo, cicloheptenilo, ciclohepta-1,3-dienilo, ciclohepta-1,4-dienilo o ciclohepta-1,5-dienilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido con grupos alquilo C₁ a C₆, en los que el grupo cicloalquilo o el grupo cicloalquilo sustituido con grupos alquilo C₁ a C₆ puede también a su vez estar sustituido con átomos de halógeno, tales como F, Cl, Br o I, en particular F o Cl, o con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X, -NO₂.

En los sustituyentes R, R² a R¹³ o R^{1'} a R^{4'}, uno o dos átomos de carbono no adyacentes que no están unidos en la posición α al heteroátomo pueden también estar sustituidos por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, en los que R' = fenilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo C₃ a C₇, alquilo C₁ a C₆ no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado.

Sin restringir la generalidad, ejemplos de sustituyentes R, R² a R¹³ y R^{1'} a R^{4'}, modificados de este modo son: -OCH₃, -OCH(CH₃)₂, -CH₂OCH₃, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -C₂H₄OCH(CH₃)₂, -C₂H₄SC₂H₅, -C₂H₄SCH(CH₃)₂, -S(O)CH₃, -SO₂CH₃, -SO₂C₆H₅, -SO₂C₃H₇, -SO₂CH(CH₃)₂, -SO₂CH₂CF₃, -CH₂SO₂CH₃, -O-C₄H₈-O-C₄H₉, -CF₃, -C₂F₅, -C₃F₇, -C₄F₉, -C(CF₃)₃, -CF₂SO₂CF₃, -C₂F₄N(C₂F₅)C₂F₅, -CHF₂, -CH₂CF₃, -C₂F₂H₃, -C₃FH₆, -CH₂C₃F₇, -C(CF₃)₂, -CH₂C(O)OH, -CH₂C₆H₅, -C(O)C₆H₅ o P(O)(C₂H₅)₂.

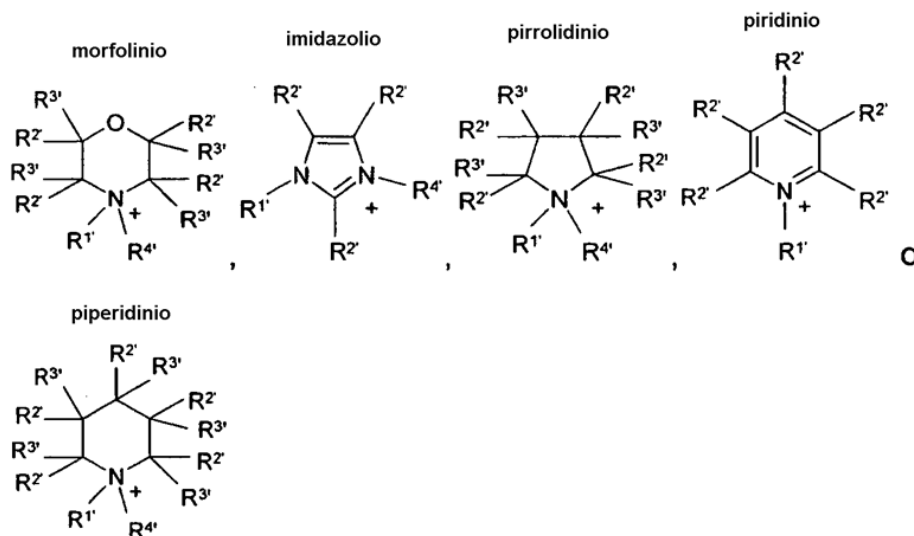
En R', cicloalquilo C₃ a C₇ es, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

En R', fenilo sustituido indica fenilo que está sustituido con alquilo C₁ a C₆, alqueno C₁ a C₆, NO₂, F, Cl, Br, I, OH, alcoxilo C₁-C₆, SCF₃, SO₂CF₃, COOH, SO₂X', SO₂NR''₂ o SO₃H, en los que X' indica F, Cl o Br y R'' indica un cicloalquilo C₃ a C₇ o alquilo C₁ a C₆ no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado como se define para R', por ejemplo o-, m- o p-metilfenilo, o-, m- o p-etilfenilo, o-, m- o p-propilfenilo, o-, m- o p-isopropilfenilo, o-, m- o p-terc-butilfenilo, o-, m- o p-nitrofenilo, o-, m- o p-hidroxifenilo, o-, m- o p-metoxifenilo, o-, m- o p-etoxifenilo, o-, m-, p-(trifluorometil)fenilo, o-, m-, p-(trifluorometoxi)fenilo, o-, m-, p-(trifluorometilsulfonil)fenilo, o-, m- o p-fluorofenilo, o-, m- o p-clorofenilo, o-, m- o p-bromofenilo, o-, m- o p-yodofenilo, además preferiblemente 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dimetilfenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dihidroxifenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-difluorofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-diclorofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dibromofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dimetoxifenilo, 5-fluoro-2-metilfenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo o 2,4,5-trimetilfenilo.

En R^{1'} a R^{4'}, se entiende que heteroarilo significa un radical heterocíclico mono- o bicíclico saturado o insaturado que tiene de 5 a 13 miembros de anillo, en el que 1, 2 ó 3 átomos de N y/o 1 ó 2 átomos de S u O pueden estar presentes y el radical heterocíclico puede estar mono- o polisustituido con alquilo C₁ a C₆, alqueno C₁ a C₆, NO₂, F, Cl, Br, I, OH, alcoxilo C₁-C₆, SCF₃, SO₂CF₃, COOH, SO₂X', SO₂NR''₂ o SO₃H, en los que X' y R'' tienen el significado indicado anteriormente. El radical heterocíclico es preferiblemente 2- o 3-furilo, 2- o 3-tienilo, 1-, 2- o 3-pirrolilo, 1-, 2-, 4- o 5-imidazolilo, 3-, 4- o 5-pirazolilo, 2-, 4- o 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 2-, 4- o 5-tiazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo, 2-, 3- o 4-piridilo, 2-, 4-, 5- o 6-pirimidinilo, además preferiblemente 1,2,3-triazol-1-, -4- o -5-ilo, 1,2,4-triazol-1-, -4- o -5-ilo, 1- o 5-tetrazolilo, 1,2,3-oxadiazol-4- o -5-ilo, 1,2,4-oxadiazol-3- o -5-ilo, 1,3,4-tiadiazol-2- o -5-ilo, 1,2,4-tiadiazol-3- o -5-ilo, 1,2,3-tiadiazol-4- o -5-ilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-2H-tiopirano, 2-, 3- o 4-4H-tiopirano, 3- o 4-piridazinilo, pirazinilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzofurilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzotienilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-1H-indolilo, 1-, 2-, 4- o 5-bencimidazolilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzopirazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoxazolilo, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-bencisoxazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzotiazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-bencisotiazolilo, 4-, 5-, 6- o 7-benz-2,1,3-oxadiazolilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-quinolinilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-isoquinolinilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 9-carbazolilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-acridinilo, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-cinnolinilo, 2-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-quinazolinilo o 1-, 2- o 3-pirrolidinilo.

Se entiende que heteroaril-alquilo C₁-C₆, de manera análoga a aril-alquilo C₁-C₆, significa, por ejemplo, piridinilmetilo, piridiniletilo, piridinilpropilo, piridinilbutilo, piridinilpentilo, piridinilhexilo, en los que los radicales heterocíclicos descritos anteriormente puede estar además unidos a la cadena de alquileo de este modo.

HetN⁺ es preferiblemente



en los que los sustituyentes R^1 a R^4 , cada uno, independientemente entre sí, tienen un significado descrito anteriormente. Los cationes morfolinio e imidazolio se prefieren particularmente en la presente invención, indicando R^1 a R^4 en dichos cationes, en particular, en cada caso independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene 1 a 20 átomos de C, en los que uno o más sustituyentes R^1 a R^4 , pueden estar parcialmente sustituidos con -OH o -OR¹, en los que R^1 = fenilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo C₃ a C₇, alquilo C₁ a C₆ no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado.

Los cationes del líquido iónico según la invención son preferiblemente cationes amonio, fosfonio, imidazolio o morfolinio, los más preferidos son cationes imidazolio.

De manera muy particularmente preferida los sustituyentes R, R^2 , R^1 a R^4 , de los cationes amonio, fosfonio, imidazolio o morfolinio preferidos se seleccionan de grupos metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo, decilo, dodecilo, octadecilo, etoxietilo, metoxietilo, hidroxietilo o hidroxipropilo.

Es preferible que los cationes imidazolio estén sustituidos con grupos alquilo, alquenilo, arilo y/o aralquilo que pueden a su vez estar sustituidos con grupos funcionales tales como grupos que contienen nitrógeno, azufre y/o fósforo, en los que son posibles diferentes estados de oxidación. Ejemplos preferidos de estos grupos funcionales según la invención son: grupos amina, carboxilo, carbonilo, aldehído, hidroxilo, sulfato, sulfonato y/o fosfato.

Uno o ambos átomos de N del anillo de imidazolio pueden estar sustituidos con sustituyentes idénticos o diferentes. Preferiblemente ambos átomos de nitrógeno del anillo de imidazolio están sustituidos con sustituyentes idénticos o diferentes.

También es posible o se prefiere según la invención que las sales de imidazolio estén sustituidas adicional o exclusivamente en uno o más de los átomos de carbono del anillo de imidazolio.

Se prefiere que los sustituyentes sean grupos alquilo C₁-C₄ tales como grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo y/o isobutilo. Sustituyentes que también se prefieren son grupos alquenilo C₂-C₄ tales como etileno, n-propileno, isopropileno, n-butileno y/o isobutileno, también están comprendidos sustituyentes alquilo y alquenilo que tienen más de 4 átomos de C en los que por ejemplo también se prefieren todavía sustituyentes alquilo o alquenilo C₅-C₁₀. Debido a la solubilidad del líquido iónico, podría ser favorable que estos grupos alquilo o alquenilo C₅-C₁₀ tengan uno o más de otros sustituyentes tales como grupos fosfato, sulfonato, amino y/o fosfato en sus grupos alquilo y/o alquenilo.

Como sustituyentes arilo se prefieren según la invención grupos arilo mono y/o bicíclicos, fenilo, bifenilo y/o naftaleno así como derivados de estos compuestos que portan grupos hidroxilo, sulfonato, sulfato, amino, aldehído, carbonilo y/o carboxilo. Ejemplos de sustituyentes arilo preferidos son fenol, bifenilo, bifenol, naftaleno, ácidos naftalenocarboxílicos, ácidos naftalenosulfónicos, bifeniloles, ácidos bifenilcarboxílicos, fenol, sulfonato de fenilo y/o ácidos fenolsulfónicos.

Se emplean de manera muy particularmente preferible tiocianatos, dicianamidas, tetrafluoroboratos, yoduros, cloruros, bromuros o hexafluorofosfatos de imidazolio en los métodos según la invención, en los que bromuro de 1-decil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-decil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-decil-3-metilimidazolio,

5 tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-decil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-decil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-dodecil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-dodecil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-dodecil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-dodecil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-dodecil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-hexil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-hexil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-hexil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-hexil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-octil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-octil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-octil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-octil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-butil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-butil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-butil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-etil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-etil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-etil-3-metilimidazolio, se prefieren especialmente en el método según la invención. Los más preferidos son tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-butil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-butil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-etil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-hexil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-hexil-3-metilimidazolio.

20 Los líquidos iónicos usados según la invención son preferiblemente líquidos, es decir preferiblemente son líquidos que son iónicos a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Sin embargo, también pueden usarse líquidos iónicos que no son líquidos a temperatura ambiente pero que deben estar presentes en una forma líquida o deben ser solubles en la disolución de extracción a la temperatura a la que se realiza el método de la presente invención.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a una disolución de extracción para el aislamiento de células a partir de una matriz compleja que comprende al menos:

- una sal de cloruro divalente opcionalmente en combinación con un líquido iónico
- 25 normalmente en agua, y/o un tampón acuoso.

Las sales de cloruro divalentes como $MgCl_2$ normalmente están presentes en concentraciones de entre 0,5 y 6 M, preferiblemente de entre 0,5 y 4 M, más preferiblemente de entre 1 y 2 M.

30 También puede usarse $ZnCl_2$ en concentraciones superiores debido a su solubilidad en agua muy alta. Puede usarse en concentraciones de hasta aproximadamente 15 M. Concentraciones de $ZnCl_2$ preferidas son de entre 1 y 10 M. Esto ofrece la posibilidad de crear condiciones de extracción muy específicas y de usar directamente la disolución de extracción para la centrifugación en gradiente.

El líquido iónico (si está presente) está presente normalmente en concentraciones de entre el 0,5 y el 100% en peso, preferiblemente entre el 1 y el 60% en peso, más preferiblemente entre el 7 y el 40% en peso, basándose en el peso de la mezcla. El líquido iónico puede ser un líquido iónico o una mezcla de dos o más líquidos iónicos.

35 La disolución de extracción de la presente divulgación es una disolución acuosa o una disolución tampón. Normalmente tiene un valor de pH mayor de 5 y menor de 11, preferiblemente mayor de 6 y menor de 9, más preferiblemente de entre 6,5 y 7,5. La disolución de extracción puede comprender adicionalmente hasta el 20% de uno o más disolventes orgánicos miscibles con agua como etanol. La disolución de extracción también podría comprender un componente adicional, tal como por ejemplo detergentes.

40 El tampón de la presente divulgación se selecciona del grupo de tampón fosfato, tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS), tampón de solución salina tamponada con TRIS (TBS), TRIS/EDTA (TE), ACES, MES, PIPES, HEPES y tricina. Tampones preferidos son PBS y tricina.

45 Aún otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit para el aislamiento de virus a partir de una matriz compleja que comprende:

- una disolución de extracción según la presente divulgación y
- al menos una enzima de degradación de biopolímeros (véase anteriormente).

Según un aspecto preferido de la presente divulgación, la al menos una enzima de degradación de biopolímeros se selecciona del grupo que consiste en proteasas, celulasas y amilasas, preferiblemente α -amilasas.

- El método según la presente invención ofrece un sistema de lisis de matriz muy suave y eficaz. La disolución de extracción lisa eficazmente la matriz de la mayoría de las muestras complejas que son por ejemplo típicas del análisis de alimentos mientras que los virus diana permanecen sin afectar. A pesar de las condiciones de lisis de la matriz bastante suaves, pueden aislarse incluso los virus muy pequeños a partir de las muestras complejas. A diferencia de métodos de aislamiento conocidos, el método según la presente invención no comprende ninguna etapa adicional en la que la muestra se una a una fase sólida o se trate con reactivos de extracción adicionales. Especialmente el método según la presente invención no implica una etapa en la que las partículas virales y/o la matriz se unan a una fase sólida. La única excepción es la posibilidad de unir virus a una fase sólida tras la extracción y el aislamiento por ejemplo mediante centrifugación.
- 5 Eso significa que el método según la presente invención preferiblemente tiene sólo las siguientes etapas:
- a) proporcionar una muestra de alimento o clínica,
- b) incubar dicha muestra durante un tiempo de entre 10 minutos y 6 horas con una disolución de extracción que comprende al menos una sal de cloruro divalente en una concentración de entre 0,5 y 6 M, opcionalmente en combinación con un líquido iónico
- 15 c) aislar dichos virus a partir de la mezcla de la etapa b), preferiblemente mediante centrifugación, unión por afinidad y/o filtración,
- mediante lo cual entre la etapa a) y la etapa b) y entre la etapa b) y la etapa c) no se realizan otras etapas como unión a una fase sólida, tratamiento con disoluciones o reactivos de extracción adicionales.
- En consecuencia, el método de la presente invención ofrece un modo sencillo y rápido para aislar virus a partir de muestras complejas y (en combinación con métodos de detección sensibles como PCR en tiempo real) permite una detección rápida y sensible de patógenos en muestras de alimento, clínicas y otras muestras complejas.
- 20 El método según la presente invención tiene normalmente una tasa de recuperación de más del 10%. Eso significa que normalmente más del 10% de los virus presentes en una muestra pueden aislarse mediante el método según la presente invención. La optimización del procedimiento puede conducir fácilmente a tasas de recuperación de más del 20%. Las tasas de recuperación pueden determinarse añadiendo a la muestra una cantidad definida de virus antes de realizar el método según la presente invención.
- 25 Una importante ventaja del método según la presente invención es que la cantidad de la matriz de muestra se reduce significativamente. La matriz de muestra de una muestra compleja puede comprender por ejemplo uno o más de los siguientes constituyentes: péptidos, polipéptidos, proteínas (incluyendo también enzimas), hidratos de carbono (hidratos de carbono complejos y sencillos), lípidos, ácidos grasos, grasa, ácidos nucleicos, etc. Una matriz de muestra compleja a menudo interfiere con los métodos analíticos o hace incluso imposible aplicar métodos de biología molecular para analizar la muestra. Se ha encontrado que con el método según la presente invención es posible una lisis al menos parcial de la matriz de muestra y la reducción de la cantidad de matriz de muestra ofrece la posibilidad de llevar a cabo el análisis adicional de la contaminación viral.
- 30 La presente invención se ilustra además mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin embargo, sin limitarse a los mismos.
- La figura 1 proporciona un esquema de flujo a modo de ejemplo para las etapas de procedimiento que pueden realizarse usando el método según la presente invención para detectar (cualitativa y/o cuantitativamente) virus en muestras complejas, tales como muestras de alimento.
- 40 La figura 2 proporciona un esquema de flujo a modo de ejemplo para las etapas de procedimiento que pueden realizarse cuando se aplica una disolución de extracción que comprende ZnCl_2 en el método según la presente invención.
- La figura 3 proporciona un esquema de flujo a modo de ejemplo para las etapas de procedimiento que pueden realizarse cuando se aplica una disolución de extracción que comprende un líquido iónico, tal como tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio, en el método según la presente invención.
- 45

Ejemplos

Ejemplo I: Separación de bacteriófago MS2 de muestras de queso.

Se usó el bacteriófago MS2 como partícula modelo para norovirus y rotavirus según Dreier *et al.*, debido a la

similitud de las propiedades físicas y químicas del bacteriófago MS2 y los rotavirus y norovirus patógenos. A diferencia de los virus patógenos, MS2 es fácil de manipular, no son necesarios requisitos de seguridad especiales y la propagación en *E. coli* no necesita equipos especiales tales como se usan en cultivo celular para líneas celulares eucariotas, que son necesarias para norovirus y rotavirus.

5 Lisis de la matriz y aislamiento del virus

Se inoculan tres gramos de queso (Gouda) con 500 µl de disolución de fago MS2 (10^{10} UFP ml⁻¹). Se añade el tampón de lisis (MgCl₂ 1 M, tricina 50 mM) hasta un volumen final de 25 ml. Se homogeneiza la muestra mediante un homogeneizador Stomacher y se incuba durante 30 min a 37°C y se centrifuga durante 20 min a 4000 rpm para separar los residuos de alimento restantes. Se añade MgCl₂ a 750 µl del sobrenadante hasta una concentración final de 4 M. Se mezcla la muestra agitando con vórtex y se centrifuga a 14000 rpm durante 1 h. Se usa el sedimento resultante para el aislamiento del ARN.

Se usa el kit PureLink® Viral RNA/DNA Mini (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Con el fin de potenciar la lisis, se realiza la etapa de proteinasa K durante la noche. Se eluye el ARN unido a la sílice con 20 µl de agua. Como control de proceso y patrón para la PCR en tiempo real, se aísla ARN de 15 µl de disolución de fago MS2 (10^{10} UFP ml⁻¹). Para la síntesis de ADNc, se transcribe 1 µl de ARN con transcriptasa inversa del VMA clonada (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En lugar de un volumen total de 10 µl, se producen 20 µl. El cebador usado para la transcripción inversa (MS2-TM-R) es igual que el cebador usado en la PCR específica para el gen de replicasa de MS2 y descrito en Dreier *et al.*, 2005. Para la PCR en tiempo real TaqMan®, se añaden 5 µl de una dilución 1:2 del ADNc a 20 µl de mezcla de reacción que contiene 1x tampón de PCR (Invitrogen), MgCl₂ 4,5 mM, cebador 500 nM (MS2-TM-F, MS2-TM-R descrito en Dreier *et al.* 2005), sonda TaqMan® marcada con FAM 250 nM (Dreier *et al.* 2005, pero marcada con FAM), NTP 0,8 mM (Thermo Scientific) y 0,2 µl de ADN polimerasa Platinum Taq (5 U/µl). Se realiza la PCR en tiempo real en el termociclador MX3000P (Stratagene) tal como sigue: desnaturalización durante 5 min a 94°C, seguido por 45 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C y una etapa de extensión final a 72°C durante 2 min. La muestra, el control y el control negativo se procesan por duplicado. Para el control, se usa una dilución en serie (10^{-1} - 10^{-3}). Para el análisis de los datos experimentales, se comparan los valores de Ct de los controles de proceso y las muestras. En la tabla 1 se muestran los valores de Ct de la muestra y los controles. Un log es aproximadamente 3,5 valores de Ct, por tanto la recuperación de MS2 es igual a ½ log. La diferencia entre el control y la muestra corresponde a una recuperación de aproximadamente el 25%.

Nombre del pocillo	Ensayo	Umbral (dR)	Ct (dR)
MgCl ₂ 4 M	FAM	1241,86	18,71
Control	FAM	1241,86	16,76
Control 10^{-1}	FAM	1241,86	20,54
Control 10^{-2}	FAM	1241,86	23,47
Control 10^{-3}	FAM	1241,86	27,29
Control neg.	FAM	1241,86	No Ct

La reducción desde inicialmente 3 gramos de la matriz de alimento aplicada (queso Gouda) durante la etapa de lisis en el tampón de lisis (MgCl₂ 1 M y tricina 50 mM) dio como resultado un sedimento de aproximadamente 15-25 µl de volumen tras la centrifugación.

Ejemplo II: Separación de bacteriófago MS2 de muestras de queso.

Lisis de la matriz y aislamiento del virus

Para la inoculación de 6,5 gramos de muestra de queso (Gouda), se usa 1 ml de fagos MS2 (10^{10} UFP ml⁻¹). Se añade el tampón de lisis (1x PBS, tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio al 7,5%) hasta un volumen final de 45 ml. Se homogeneiza la muestra mediante un homogeneizador Stomacher y se incuba durante 30 min a 37°C y se centrifuga durante 20 min a 3200 rpm. Se añade una cantidad de 0,5 ml de MgCl₂ 4 M a 1 ml del sobrenadante. Se mezcla la muestra agitando con vórtex y se centrifuga a 14000 rpm durante 1 h. Se usa el sedimento resultante para el aislamiento del ARN.

Se usa el kit PureLink® Viral RNA/DNA Mini (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Con el fin de potenciar la lisis, se realiza la etapa de proteinasa K durante la noche. Se eluye el ARN unido a la sílice con 20 µl de agua. Como control de proceso y patrón para la PCR en tiempo real, se aísla ARN de 22,2 µl de disolución de fago MS2 (10^{10} UFP ml⁻¹). Para la síntesis de ADNc, se transcribe 1 µl de ARN con transcriptasa inversa del VMA clonada (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El cebador usado para la transcripción inversa (MS2-TM-R) es igual que el cebador usado en la PCR específica para el gen de replicasa de MS2 y descrito en Dreier *et al.*, 2005. Se añaden cinco µl del ADNc a 20 µl de mezcla de reacción que contiene 1x tampón de PCR (Invitrogen), MgCl₂ 4,5 mM, cebador 500 nM (MS2-TM-F, MS2-TM-R descrito en Dreier *et al.* 2005), sonda TaqMan® marcada con FAM

250 nM (Dreier *et al.* 2005, pero marcada con FAM), NTP 0,8 mM (Thermo Scientific) y 0,2 µl de ADN polimerasa Platinum Taq (5 U/µl). Se realiza la PCR en tiempo real en el termociclador MX3000P (Stratagene) tal como sigue: desnaturalización durante 5 min a 94°C, seguido por 45 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C y una extensión final a 72°C durante 2 min. La muestra, el control y el control negativo se usan por duplicado. Para el análisis de los datos experimentales, se comparan los valores de Ct de los controles de proceso y las muestras. En la tabla 2 se muestran los valores de Ct de la muestra y los controles. Un log es aproximadamente 3,5 valores de Ct, por tanto la diferencia entre el control y la muestra corresponde a una recuperación de aproximadamente el 17%.

Nombre del pocillo	Ensayo	Duplicación	Umbral (dR)	Ct (dR)
Control	FAM	2	326,273	17,38
Muestra	FAM	4	326,273	20,27

La reducción desde inicialmente 3 gramos de la matriz de alimento aplicada (queso Gouda) durante la etapa de lisis en el tampón de lisis (1x PBS, tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio al 7,5%) dio como resultado un sedimento de aproximadamente 50-100 µl de volumen tras la centrifugación.

Ejemplo III: Separación de bacteriófago MS2 de muestras de huevo.

Se mezclan un volumen final de 45 ml de tampón de lisis (MgCl 1 M y tricina 50 mM) y una muestra de huevo de 6,5 gramos mediante un homogeneizador Stomacher. Se inoculan 500 µl de la mezcla con 600 µl de disolución de fago MS2 (10^{10} UFP ml⁻¹) y se incuban durante 30 min a 37°C y se centrifugan durante 30 min a 3200 rpm. Posteriormente se añade ZnCl₂ (concentración final 2 M) al sobrenadante y se incuban durante 15 min a 30°C. Se centrifuga la muestra a 14000 rpm durante 45 min y se usa el sedimento resultante para el aislamiento de ARN. Se usa el kit PureLink® Viral RNA/DNA Mini (Invitrogen) para el aislamiento del ARN del sedimento y el control de proceso según las instrucciones del fabricante. Se eluye el ARN unido a la sílice con 20 µl de agua. Para la síntesis de ADNc, se transcribe 1 µl de ARN con transcriptasa inversa del VMA clonada (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante pero se produjeron en total 8 µl en lugar de 20 µl de ADNc. El cebador usado para la transcripción inversa (MS2-TM-R) es igual que el cebador usado en la PCR específica para el gen de replicasa de MS2 y descrito en Dreier *et al.* 2005. Para la PCR en tiempo real TaqMan®, se añaden 5 µl del ADNc a 20 µl de mezcla de reacción que contenía 1x tampón de PCR (Invitrogen), MgCl₂ 4,5 mM, cebador 500 nM (MS2-TM-F, MS2-TM-R descritos en Dreier *et al.* 2005), sonda TaqMan® marcada con FAM 250 nM (Dreier *et al.* 2005, pero marcada con FAM), NTP 0,8 mM (Thermo Scientific) y 0,2 µl de ADN polimerasa Platinum Taq (5 U/µl). Se realiza la PCR en tiempo real en el termociclador MX3000 P (Stratagene) tal como sigue: desnaturalización durante 5 min a 94°C, seguido por 45 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C y una extensión final a 72°C durante 2 min. La muestra, el control y el control negativo se usan por duplicado. Para el análisis de los datos experimentales, se comparan los números de copias resultantes tras la PCR en tiempo real del control de proceso y las muestras. Se encuentran 1,94E+08 copias en la muestra y se encuentran 7,37E+08 copias en el control de proceso. Por tanto, la tasa de recuperación de la muestra en comparación con el control de proceso es del 26,3%.

La reducción desde inicialmente 6,5 gramos de la matriz de alimento aplicada (huevo) durante la etapa de lisis en el tampón de lisis (MgCl₂ 1 M y tricina 50 mM) dio como resultado un sedimento de aproximadamente 15-25 µl de volumen tras la centrifugación.

REIVINDICACIONES

1. Método para aislar virus de una muestra de alimento o clínica que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar una muestra de alimento o clínica,
 - b) incubar dicha muestra durante un tiempo de entre 10 minutos y 6 horas con una disolución de extracción que comprende al menos una sal de cloruro divalente en una concentración de entre 0,5 y 6 M
 - c) aislar dichos virus a partir de la mezcla de la etapa b).
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la disolución de extracción comprende MgCl_2 en concentraciones de entre 0,5 y 6 M.
3. Método según una o más de reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque en la etapa c) los virus se aíslan a partir de la mezcla mediante centrifugación y/o precipitación.
4. Método según una o más de reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se añade a la muestra una cantidad definida de virus de control antes de la etapa b).
5. Método según una o más de reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la muestra se incuba adicionalmente con al menos una enzima de degradación de biopolímeros.
6. Método según una o más de reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque en una etapa adicional d) los virus se analizan mediante recuento de células, mediante métodos de PCR, usando lectinas o mediante métodos que implican anticuerpos o proteínas que se unen de manera selectiva a virus o aptámeros dirigidos a estructuras de superficie de dichas partículas de virus.
7. Método según una o más de reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque en la etapa c) se aíslan virus y células rodeadas por una pared celular en paralelo o en etapas de aislamiento subsiguientes.
8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque en la etapa c) se realizan al menos dos etapas de centrifugación subsiguientes.
9. Método según una o más de reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque los virus aislados en la etapa c) tienen un diámetro de entre 10 y 100 nm.

Fig. 1

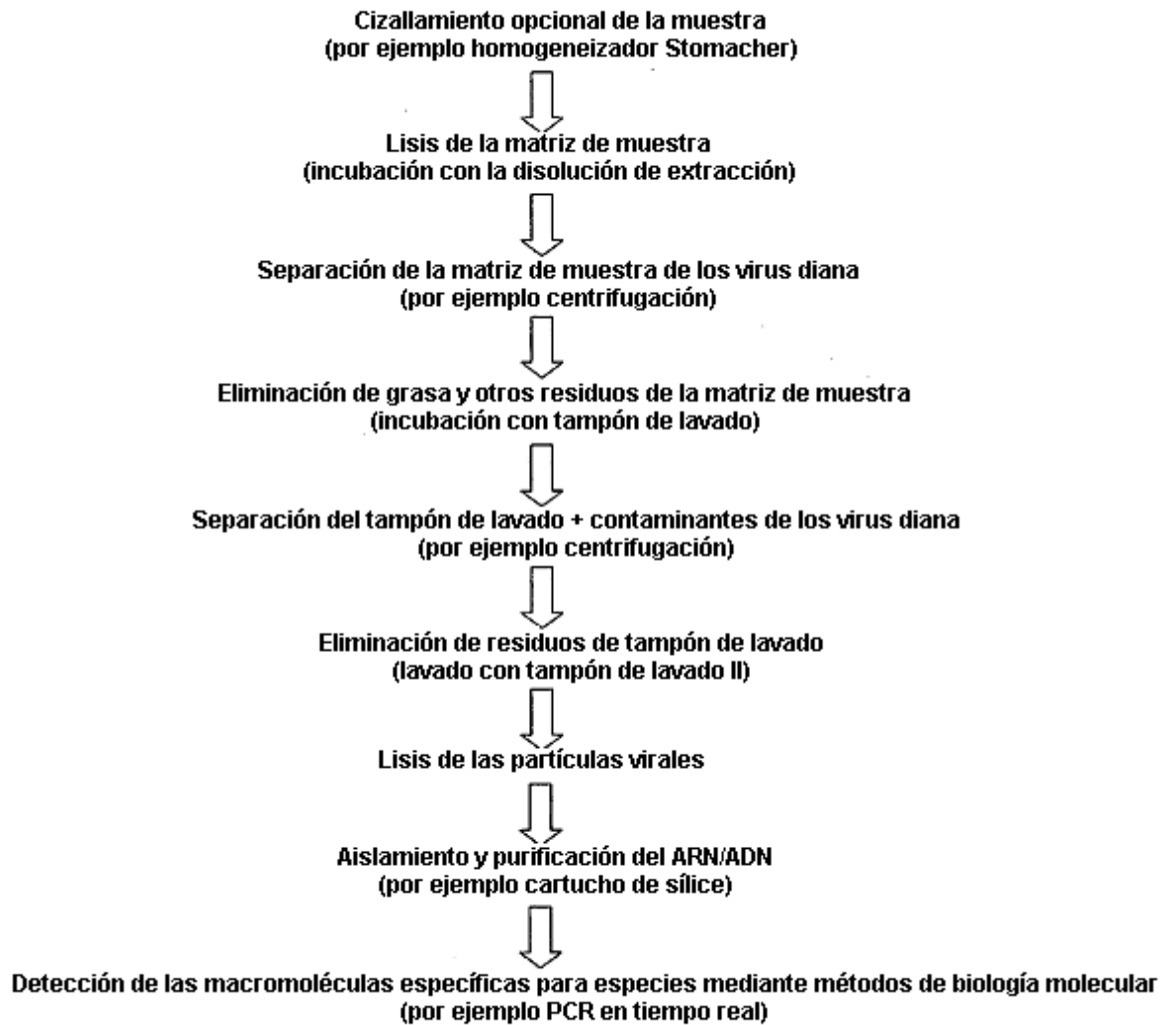


Fig. 2

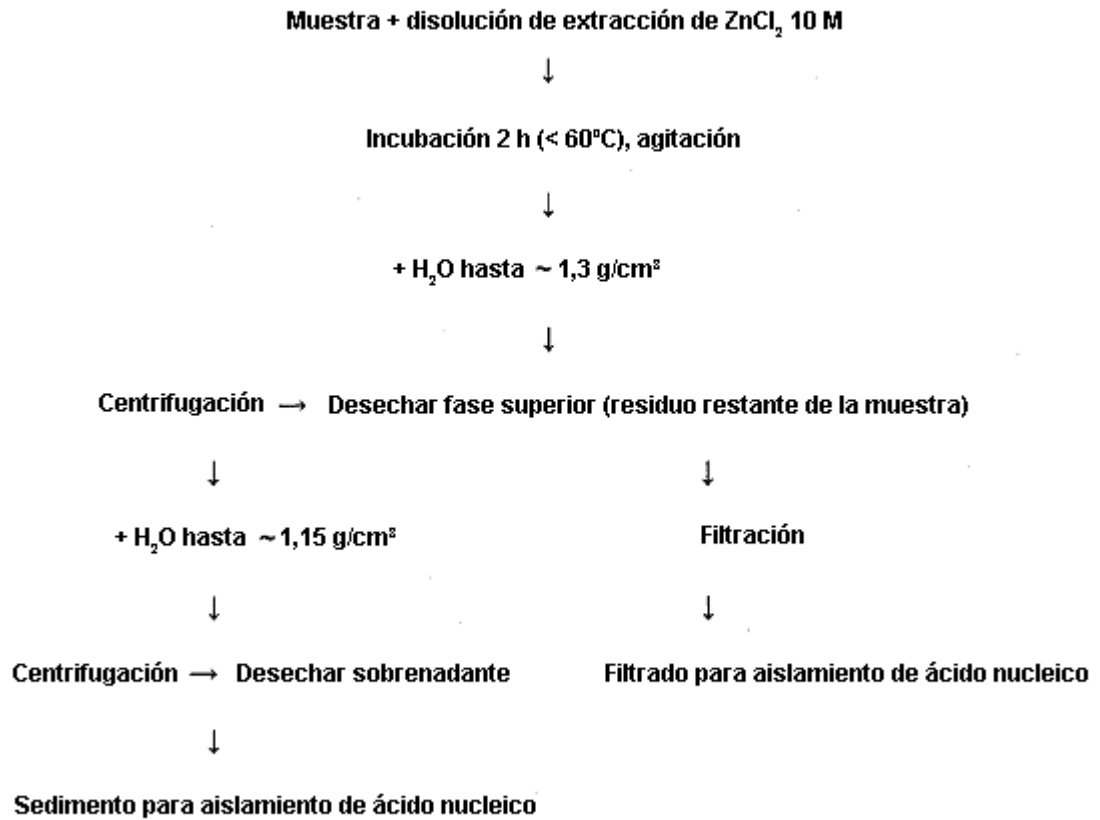


Fig. 3

