

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 743**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2011 PCT/AU2011/001156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO2013033749**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011 E 11871849 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2753710**

54 Título: **Ensayo de detección molecular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.05.2017**

73 Titular/es:

**HUMAN GENETIC SIGNATURES PTY LTD  
(100.0%)**

**Virology Research Laboratory Level 3, Clinical  
Sciences Building Prince of Wales Hospital  
Randwick, NSW 2031, AU**

72 Inventor/es:

**MILLAR, DOUGLAS, SPENCER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 613 743 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**

Ensayo de detección molecular

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos para el procesamiento de muestras para ensayos de detección molecular, particularmente el procesamiento de muestras clínicas para ensayos de detección de ácidos nucleicos para detección de enfermedades.

10

Antecedentes de la invención

Las pruebas moleculares en seres humanos se han vuelto cada vez más importantes para el diagnóstico médico y el tratamiento de pacientes. Las pruebas moleculares en animales están ganando importancia en aplicaciones veterinarias. Las pruebas de ácidos nucleicos son una herramienta esencial para aplicaciones forenses, de inmigración, de asignación de paternidad y otras aplicaciones de identidad humana. La epigenética es cada vez más importante para la investigación del cáncer, la identificación de biomarcadores, factores de predisposición y objetivos de fármacos potenciales. La genotipificación de ARN comprende una serie de aplicaciones utilizadas para analizar diferencias genéticas entre individuos o células, en todos los ámbitos de la investigación, pruebas aplicadas y diagnósticos. Cuando se trata de muestras biológicas, las presentes pruebas moleculares requieren pretratamiento específico de las muestras antes de llevar a cabo la detección de ácidos nucleicos con técnicas tales como reacción en cadena de polimerasa (PCR). El pretratamiento de muestras actualmente se considera esencial y se han desarrollado muchos kits y sistemas comerciales que se utilizan en el mercado. Lamentablemente, el pretratamiento agrega un coste a las pruebas moleculares y requiere equipos y tiempo de procesamiento adicionales.

15

20

25

Human Genetic Signatures Pty Ltd (Sidney, Australia) ha desarrollado un método para la detección de microorganismos como se divulga en el documento WO 2006/058393 y US 7833942. El método implica tratar el ácido nucleico microbiano de un microorganismo con un agente para formar una forma simplificada del ácido nucleico derivado del ácido nucleico microbiano que tiene secuencias de ácidos nucleicos únicas que se pueden utilizar para detectar el microorganismo.

30

La presente invención ha desarrollado un ensayo de detección molecular mejorado que no requiere pretratamiento de muestras como se requiere en los ensayos de detección molecular actualmente.

35

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un ensayo de detección molecular llevado a cabo en una muestra biológica que no requiere una etapa de limpieza de la muestra o el procesamiento de la muestra biológica para lisar las células o purificar el ácido nucleico.

40

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un ensayo de detección molecular que comprende:

tratar una muestra biológica directamente con un agente de bisulfito en una concentración de 2.5 M a 3.5 M y un rango de pH de 4.5 a 5.5 calentar entre 75° C y 95° C durante 1 minuto a 30 minutos para permitir el tratamiento de ácido nucleico e interrupción celular;

45

eliminar el agente de bisulfito de la muestra tratada; y

detectar un ácido nucleico objetivo en la muestra tratada, en el que el ensayo se lleva a cabo sin pretratamiento de la muestra biológica antes de tratar con el agente de bisulfito.

50

La muestra biológica requiere interrupción celular o tratamiento químico/físico antes de la etapa (a).

La muestra biológica se puede seleccionar de muestra fecal, nasal, sanguínea, plasma, suero, células bucales, pus, herida, filtrados concentrados, líquido cefalorraquídeo, semen, citología de base líquida (LBC), tejido, FFPE, células capturadas por láser, células cultivadas, células sedimentadas, cultivos bacterianos, colonias bacterianas, suspensiones víricas, aspirados, lavado bronquial, muestra de esputo, muestra ambiental, concentrado ambiental, productos alimenticios, materia prima, muestra de agua o concentrado de agua, y similares.

55

El ácido nucleico detectado puede ser ADN, ARN o combinaciones de ADN y ARN.

60

El ensayo es adecuado para detectar una enfermedad infecciosa, enfermedad genética o rasgo genético en un animal. Preferiblemente, el animal es un ser humano.

La enfermedad infecciosa puede ser provocada por un microorganismo, incluso bacterias, virus, viroides, levaduras, hongos, priones, parásitos y amebas.

65

## ES 2 613 743 T3

La enfermedad genética puede ser cáncer, mutación, variación en el número de copias, trastorno hereditario, enfermedad inducida por el ambiente, enfermedad provocada por la exposición a carcinógenos, enfermedad caracterizada por la expansión o reducción en una longitud de repetición de nucleótidos en un genoma.

5 El rasgo genético puede ser la susceptibilidad al cáncer o cualquier otra enfermedad en donde los cambios genéticos y epigenéticos contribuyen al desarrollo de un estado de la enfermedad.

10 Preferiblemente, el agente de bisulfito es bisulfito de sodio o metabisulfito de sodio. Preferiblemente, el agente de bisulfito se utiliza en una concentración de entre aproximadamente 2.5 M a aproximadamente 3.5M con un intervalo de pH entre aproximadamente 4.5 a aproximadamente 5.5. Más preferiblemente, el agente de bisulfito se utiliza en una concentración de aproximadamente 3M en un pH de aproximadamente 5.0.

15 Preferiblemente, la etapa (a) implica calentar entre aproximadamente 75° C y 95° C durante aproximadamente de 1 minuto a 30 minutos. Más preferiblemente, la muestra se calienta durante aproximadamente de 10 a 20 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 80° C y 95° C. Se apreciará que la temperatura y la duración del calentamiento pueden variar dependiendo de la muestra que se trata y la fuente celular del ácido nucleico que se va a detectar.

20 El bisulfito se puede eliminar de la muestra tratada a través de cualquier medio adecuado. Ejemplos incluyen purificación basada en columna o purificación basada en perlas, que son óptimas, pero en algunos casos una etapa de precipitación sencilla puede ser suficiente.

25 Después de la eliminación del bisulfito, preferiblemente la muestra se resuspende en regulador de elución que tiene un pH de por lo menos 10, más preferiblemente entre aproximadamente pH 11.5 a aproximadamente 12.5. Se ha descubierto que un pH de por lo menos aproximadamente 12 es adecuado para la mayoría de las muestras.

El agente de bisulfito modifica la citosina a uracilo en el ácido nucleico tratado. En ADN de cadena doble, el agente de bisulfito modifica la citosina a uracilo en cada cadena del ADN genómico de cadena doble complementario que forma dos moléculas de ácido nucleico derivado pero no complementario.

30 En una forma preferida, el ácido nucleico microbiano derivado sustancialmente contiene bases adenina (A), guanina (G), timina (T) y uracilo (U) y tiene sustancialmente el mismo número total de bases que el ácido nucleico sin tratar correspondiente.

35 Si el ácido nucleico tratado se amplifica, el ácido nucleico amplificado contiene sustancialmente las bases adenina (A), guanina (G) y timina (T). La amplificación se puede llevar a cabo mediante cualquier medio adecuado tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica o amplificación de señal.

40 En una forma preferida, el ensayo incluye adicionalmente proporcionar sondas o cebadores de ácido nucleico para la muestra tratada.

Preferiblemente, la muestra tratada sufre una reacción de amplificación para formar una molécula de ácido nucleico objetivo específica para el microorganismo o indicador genético.

45 La molécula de ácido nucleico objetivo se detecta preferiblemente por amplificación. Ejemplos de detección por amplificación adecuada incluyen PCR, qPCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR digital, amplificación isotérmica o amplificación de señal.

50 El ácido nucleico tratado también se puede detectar por un método de secuenciación como los sistemas Roche 454, ABI SOLiD o Ion torrent Systems, Illumina Hi Seq SBS technology, Helicos Heliscope o tecnología SMRT empleada por Pacific Biosciences o cualquier otra tecnología equivalente.

En una forma preferida, la molécula de ácido nucleico objetivo se detecta al:

55 Al proporcionar un ligando detector que se puede unir a una región objetivo de la molécula de ácido nucleico específica microbiana y permitiendo un tiempo suficiente para que el ligando detector se una a la región objetivo; y

medir la unión del ligando detector a la región objetivo para detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico específica microbiana.

60 En otra realización, el ácido nucleico objetivo se detecta al secuenciar la muestra tratada.

65 En otra forma preferida, la molécula de ácido nucleico objetivo se detecta al separar un producto de amplificación y visualizar el producto separado. Preferiblemente, el producto de amplificación se separa por electroforesis y se detecta por visualización de una o más bandas en un gel.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico objetivo no se produce naturalmente en una célula.

También se describe un kit para un ensayo de detección molecular para tratamiento directo de una muestra, el kit comprende:

- 5 un reactivo de bisulfito;  
reactivos de reacción y elución de ácido nucleico;  
cebadores de PCR para el ácido nucleico objetivo; e  
instrucciones para llevar a cabo el ensayo.

10 El kit puede incluir adicionalmente columnas de purificación o separación de ácido nucleico, mezcla de reacción PCR, reactivos para PCR, cebadores de ácido nucleico de control, tubos de reacción, tubos de ensayo, hisopos y similares.

15 A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto indique lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento indicado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

20 Cualquier planteamiento de los documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente especificación es solamente a los efectos de proporcionar un contexto para la presente invención. No se debe tomar como una admisión de que cualquiera o todos estos asuntos forman el componente de la base de la técnica anterior o eran el conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención tal como existía en Australia antes del desarrollo de la presente invención.

25 Para que se entienda más claramente la presente invención, se describirán realizaciones preferidas con referencia a los siguientes dibujos y ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 muestran los resultados de la detección de *C. difficile* utilizando la presente invención. A. El canal Fam es específico para los genes *tcdA/B* de *C. difficile*; B. muestra el canal Cy5 específico para el control de extracción.

La figura 2 muestran los resultados de amplificación de tres virus a partir de la misma muestra. A. Fam=Norovirus (virus de ARN de cadena sencilla); B. Hex=Adenovirus (virus de ADN de cadena doble); C. Cy5=Rotavirus (virus de ARN de cadena sencilla).

35 La figura 3 Muestra el efecto de agregar células humanas en materia fecal. A. muestra las células MRC5 humanas calentadas durante 15 minutos en reactivo bisulfito 3M a 95° C, luego resuspendidas en regulador de pH alto (12.3) y amplificadas para el gen humano  $\beta$ -globina. B. muestra las mismas células adicionadas en materia fecal calentadas durante 15 minutos en reactivo bisulfito 3M a 95° C, luego resuspendidas en regulador de pH alto (12.3) y amplificadas para el gen humano  $\beta$ -globina.

40 Modos para llevar a cabo la invención

Ventajas

45 La presente invención tiene muchas ventajas sobre los métodos de la técnica anterior que incluyen lo siguiente.

a. La lisis de las células y la conversión de ácido nucleico de la muestra se producen simultáneamente en el mismo tubo y se alcanza la conversión y la lisis y en menos de 30 minutos, e incluso se pueden alcanzar en tan poco como en 10 a 20 minutos.

50 b. Las muestras tales como la materia fecal se pueden procesar directamente sin pérdida de sensibilidad.

c. Las pruebas basadas en la presente invención tienen la ventaja de poder realizarse en la muestra primaria de un paciente sin pretratamiento con enzimas tales como proteinasa K.

55 d. El método no requiere ningún método de purificación costoso, por ejemplo los kits de purificación comerciales actualmente en el mercado. Estos kits comerciales están disponibles para casi cualquier tipo de muestra tales como sangre, heces, células cultivadas, FFPE, bacterias, virus y parásitos, por mencionar solo algunos. Estos kits comerciales pueden llegar a costar miles de dólares y pueden tardar de 2 a 4 horas para purificar una muestra. Casi todos los laboratorios en el mundo utilizan estos kits para la purificación de la muestra antes de cualquier etapa de amplificación posterior en ensayos moleculares empleados actualmente.

60 e. Después de la eliminación del bisulfito la muestra se resuspende en un regulador de elución simple que no requiere ningún tratamiento adicional tal como desulfonación por calor, simplificando así el proceso.

65

f. El método puede detectar simultáneamente virus de ARN y ADN en el mismo tubo de la misma muestra sin necesidad de utilizar un kit de purificación viral especializado. Los virus de ARN y ADN (incluso aunque uno es de cadena sencilla y uno es de cadena doble) se someten a lisis y se convierten con igual eficiencia por la presente invención.

5 g. Sorprendentemente, el regulador de elución, que tiene un pH alto, no degrada el ARN. Este hallazgo contradice lo que se ha enseñado en la técnica anterior ya que el principio de la técnica anterior recomienda específicamente que se evite el tratamiento de ARN a temperaturas y pH altos.

10 h. El método puede someter a lisis y convertir todos los tipos bacterianos utilizando condiciones similares de esta manera se puede utilizar una única muestra de paciente para múltiples pruebas para detectar *C. difficile*, *Salmonella*, *Campylobacter* y parásitos, etc. eliminando así el problema de un método de extracción independiente para cada bacteria o microorganismo objetivo.

15 i. El método es aplicable a muestras difíciles de lisar tales como parásitos, que pueden formar una capa exterior fuerte que las hace resistentes a técnicas de lisis convencionales. Por lo tanto, sería ideal detectar organismos objetivo tales como *Mycobacterium tuberculosis* (TB) (muy resistentes a las técnicas de lisis convencionales), ya que se requieren pruebas de diagnóstico basadas en ácidos nucleicos sensibles.

20 j. El método puede someter a lisis y convertir de manera eficiente el virus de la hepatitis C (HCV) directamente de suero utilizando tan solo 10 copias del virus demostrando la utilidad de detectar virus de ARN importantes en un nivel muy bajo.

25 k. El método también reduce el tiempo de procesamiento de pruebas por muchas horas y elimina el problema de que la muestra tenía que ser purificada, luego convertida con bisulfito y purificada nuevamente como se lleva a cabo actualmente.

30 l. El método es adecuado para la detección sensible de cáncer colorrectal en la materia fecal del paciente. Dichas muestras no son invasivas y reducirían la dependencia de la endoscopia como el medio de detección primario. Adicionalmente, se esperaría una "muestra para dar como resultado" en menos de tres horas sin proceso de procesamiento complejo de muestras. El uso de materia fecal sobre muestras de suero para el diagnóstico tiene muchas ventajas, la más significativa es que es probable que haya una gran cantidad de células humanas en la muestra, a diferencia de las muestras de suero en donde la sensibilidad siempre es un problema importante.

#### Muestras

35 La presente invención es adecuada para procesar muestras que incluyen muestra fecal, nasal, sanguínea, plasma, suero, células bucales, pus, herida, filtrados concentrados, líquido cefalorraquídeo, semen, citología de base líquida (LBC), tejido, FFPE, células capturadas por láser, células cultivadas, células sedimentadas, cultivos bacterianos, colonias bacterianas, suspensión viral, aspirados, lavado bronquial, muestra de esputo, muestra ambiental, concentrado ambiental, productos alimenticios, materia prima, muestra de agua, concentrado de agua, o similares.

#### Tratamiento de la muestra (HGS)

45 El siguiente es un método preferido para tratar una muestra de acuerdo con la presente invención. Se coloca la muestra directamente en 200 µl de bisulfito de sodio 3M (rango 2.5 a 3.5M) de pH 5.0 (rango de pH de 4.5 a 5.5) y se calienta entre aproximadamente 75° C y 95° C entre 10 y 20 minutos.

50 Se elimina el bisulfito de la muestra tratada mediante cualquier medio adecuado. Ejemplos incluyen purificación basada en columna o purificación basada en perlas, que son óptimas, pero en algunos casos puede ser suficiente una etapa de precipitación sencilla.

Después de la eliminación del bisulfito, la muestra se resuspende en regulador de elución que tiene un pH de entre 11.5 a 12.5 (>pH 12 preferido).

55 La muestra está lista para la amplificación por PCR sin procesamiento adicional.

#### Eliminación de bisulfito

60 Se puede utilizar la eliminación de bisulfito a través de un método disponible a nivel comercial tal como la técnica de MethylEasy™ (Human Genetic Signatures). En resumen, se agrega 240 µl de reactivo No. 3 a la muestra y la muestra se transfiere a una columna de centrifugación. La columna se centrifuga a 10.000 xg para eliminar el bisulfito. La columna se lava x2 con 300 µl de reactivo No. 4 que gira a 10.000 xg entre lavados. Se agrega de 20 a 50 µl de regulador de elución y la muestra se centrifuga en un tubo de recolección limpio. La muestra está lista para amplificación por PCR.

65 Pretratamiento de la muestra

## ES 2 613 743 T3

El pretratamiento de la muestra actual implica kits comerciales comercializados por Qiagen Inc (Valencia, CA 91355 EUA), Sigma Life Sciences (St Louis, MO, EUA), Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA 92008, EUA) y Promega Corporation (Madison, WI 53711 EUA).

5 La presente invención se comparó con los siguientes métodos.

Prueba "interna" en hospital

10 Se calentó una muestra de heces a 95° C durante 10 minutos, luego se diluyó y la muestra se amplificó para el gen tcdB de *C. difficile*.

Purificación de Qiagen

15 QIAamp DNA Stool Mini Kit (50) Cat No. 51504.

Pruebas comerciales de parásitos

Parásitos gastrointestinales de AusDiagnostics 5, número de catálogo: 6502.

20 Resultados

Muestras fecales

25 Todas las muestras fecales evaluadas en las tablas 1, 2, 3 y 4 se trataron de la siguiente forma:

Se colocó un hisopo en materia fecal y luego se transfirió a un tubo que contenía 200 µl de bisulfito de sodio 3M pH 50, se mezcló y luego se calentó a 95° C durante 15 minutos.

30 Se eliminó el bisulfito utilizando el método de MethylEasy™ y las muestras se resuspendieron en 20 a 50 µl de regulador de elución, luego se amplificaron utilizando condiciones estándar.

35 La tabla 1 muestra los resultados de una prueba interna de hospital, las mismas muestras evaluadas utilizando la purificación de Qiagen y las mismas muestras evaluadas utilizando el método de acuerdo con la presente invención. Como se puede observar a partir de los resultados, la prueba interna de hospital produjo 7 resultados negativos falsos y 1 resultado positivo falso (confirmado por EIA y cultivado así como un kit de diagnóstico molecular disponible a nivel comercial) que indican que el método no tenía la sensibilidad requerida para la detección de *C. difficile* en muestras primarias de un paciente. Utilizando el método de Qiagen, 4 muestras no tuvieron suficiente material para procesar mientras 1 muestra dio un resultado negativo falso (GDH positivo por EIA). Estos resultados demuestran la utilidad del método de acuerdo con la presente invención (método HGS) para el diagnóstico rápido de *C. difficile*. Adicionalmente, 40 las muestras que tienen volúmenes limitados se evalúan fácilmente utilizando el método HGS. Adicionalmente, el método Qiagen requiere un tiempo de preparación de la muestra de por lo menos 2 horas y tiene que pesar cantidades predeterminadas de materia fecal.

45 Tabla 1. Resultados de la prueba interna de hospital contra purificación de Qiagen contra método HGS para la detección de *C. difficile*.

# de muestra	"interna"	Qiagen	HGS	# de muestra	"interna"	Qiagen	HGS
1	NEG	NEG	NEG	24	NEG	POS	POS
2	POS	POS	POS	25	POS	INSUF	POS
3	NEG	NEG	POS	26	NEG	NEG	NEG
4	POS	POS	POS	27	NEG	POS	POS
5	POS	POS	POS	28	NEG	NEG	NEG
6	NEG	NEG	NEG	29	NEG	NEG	NEG
7	POS	POS	POS	30	NEG	NEG	NEG
8	NEG	POS	POS	31	POS	INSUF	POS
9	NEG	NEG	NEG	32	POS	POS	POS
10	NEG	NEG	NEG	33	NEG	NEG	NEG
11	NEG	NEG	NEG	34	NEG	NEG	NEG
12	NEG	POS	POS	35	NEG	NEG	NEG
13	NEG	NEG	NEG	36	NEG	NEG	NEG
14	NEG	NEG	NEG	37	NEG	NEG	NEG

ES 2 613 743 T3

15	POS	NEG	NEG	38	NEG	POS	POS
16	NEG	NEG	NEG	39	POS	POS	POS
17	NEG	NEG	NEG	40	POS	POS	POS
18	NEG	INSUF	NEG	41	POS	POS	POS
19	NEG	NEG	NEG	42	POS	POS	POS
20	NEG	POS	POS	43	POS	INSUF	POS
21	POS	POS	POS	44	NEG	NEG	NEG
22	POS	POS	POS	45	NEG	NEG	NEG
23	NEG	NEG	NEG				

Tabla 2. Resultados de la microscopia estándar vs kit de detección de parásitos disponible a nivel comercial vs método HGS.

# de muestra	Parasito Detectado	Parásitos Intestinales EasyPlex 5	HGS	Otros Resultados Clínicos
1	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
2	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
3	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
4	Cryptosporidium spp.	Negativo	Cryptosporidium spp	
5	Cryptosporidium spp.	Negativo	Cryptosporidium spp	
6	Cryptosporidium spp.	Negativo	Cryptosporidium spp	
7	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
8	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
9	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
10	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp and Entamoeba	
11	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	
12	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	
13	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis and Entamoeba	
14	Giardia intestinalis	Cryptosporidium spp.	Giardia intestinalis and Entamoeba	
15	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis and Entamoeba	
16	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
17	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis, Giardia intestinalis,	
18	D.fragilis, G.lamblia	Cryptosporidium spp.	Dientamoeba y Salmonella spp.	Salmonella Aislada
19	Giardia intestinalis	Giardia	Giardia intestinalis	

ES 2 613 743 T3

20	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
21	Giardia intestinalis	Cryptosporidium spp.	Giardia intestinalis	
22	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	
23	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis, Dientamoeba y Campy	C. jejuni Aislado
24	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
25	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
26	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
27	NPI	Negativo	Negativo	
28	NPI	Negativo	Negativo	
29	NPI	Negativo	Negativo	
30	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp. y Shigella	No Shigella Aislada
31	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp. y Shigella	No Shigella Aislada
32	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp. y Shigella	No Shigella Aislada
33	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp. y Shigella	No Shigella Aislada
34	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp. y Shigella	No Shigella Aislada
35	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	Cryptosporidium spp.	
36	Giardia intestinalis	Giardia	Giardia intestinalis, Entamoeba, Shigella	Shigella spp también aislada
37	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	Shigella spp también aislada.
38	Giardia intestinalis	Giardia	Giardia intestinalis, Entamoeba, Shigella	
39	Giardia intestinalis	Giardia	Giardia intestinalis, Entamoeba, Shigella	Shigella spp también aislada.
40	NPI	Negativo	Negativo	
41	NPI	Negativo	Giardia intestinalis	
42	NPI	Negativo	Negativo	
43	NPI	Negativo	Giardia intestinalis	
44	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
45	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
46	NPI	Negativo	Giardia intestinalis	
47	NPI	Negativo	Giardia intestinalis	
48	NPI	Negativo	Giardia intestinalis	
49	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
50	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	

51	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
52	NPI	Negativo	Salmonella spp	No cultivado
53	Giardia intestinalis	Negativo	Giardia intestinalis	
54	Giardia intestinalis	Giardia	Giardia intestinalis	

Todas las muestras resaltadas pertenecen a mismo paciente.

5 La tabla 2 muestra los resultados de una comparación directa del microscopio estándar, una prueba comercial de parásitos (Ausdiagnostic Easy-Plex Gastrointestinal parasite 5) y el método HGS. Como se puede observar a partir de los resultados, el método comercial no puede someter a lisis a muchas de las pruebas que contienen quistes de Giardia. Esto contrasta con el método HGS que detectan fácilmente todas las muestras de Giardia y también algunas muestras que se pierden mediante microscopio convencional. Adicionalmente, el método HGS parece ser universal para la lisis de bacterias y parásitos igual que un número de muestras contenidas en los parásitos y bacterias, resultados que posteriormente fueron confirmaron por el hospital.

10 La tabla 3 muestra los resultados del método HGS vs métodos de cultivo convencionales para la detección de microbios. Como se puede observar, el método de cultivo no pudo detectar una muestra que contenía *A Campylobacter spp* que el método molecular detectado. Adicionalmente, no se detectó ninguna reactividad cruzada con las muestras que contenían *C. difficile*. Todos los resultados de cultivo positivos estuvieron de acuerdo con el método HGS que indicaba la sensibilidad mejorada de los métodos moleculares en comparación con el cultivo convencional. Por otra parte, los resultados del método HGS están disponibles en tan solo 3 horas en comparación con cultivos durante la noche requeridos para los métodos de cultivo convencionales.

15 20 Tabla 3. Resultados de los métodos de cultivo convencionales para la detección de bacterias contra el método HGS.

Muestra	Cultivo	Campy	Salmon	Muestra	Cultivo	Campy	Salmon
A01	Salmon	N/A	23.77	A23	Campy	32.57	N/A
A02	NPI	N/A	N/A	A24	Salmon	N/A	30.98
A03	Salmon	N/A	29.7	A25	Campy	31.18	N/A
A04	Salmon	N/A	26.06	A26	Salmon	N/A	45.32
A05	Campy	39.18	N/A	A27	Campy	41.49	N/A
A06	Campy	44.37	N/A	A28	Campy	38.69	N/A
A07	Campy	39.88	N/A	A29	Campy	38.36	N/A
A08	Salmon	N/A	39.83	A30	Salmon	N/A	38.3
A09	CD	N/A	N/A	A31	CD	N/A	N/A
A10	Campy	35.39	N/A	A32	Salmon	N/A	35.76
A11	NPI	36.09	N/A	A33	Campy	35.61	N/A
A12	Campy	35.72	N/A	A34	CD	N/A	N/A
A13	Salmon	N/A	30.21	A35	Campy	36.12	N/A
A14	Salmon	N/A	30.24	A36	Campy	39.96	N/A
A15	Campy	40.05	N/A	A37	Salmon	N/A	37.53
A16	Salmon	N/A	27.06	A38	Campy	46.2	N/A
A17	Campy	36.26	N/A	A39	Campy	35.96	N/A
A18	Campy	44.81	N/A	A40	Campy	47.31	N/A
A19	Campy	26.57	N/A	A41	Salmon	N/A	30.3
A20	Campy	29.8	N/A	A42	Salmon	N/A	37.14
A21	Salmon	N/A	26.58	A43	CD	N/A	N/A
A22	Campy	34.78	N/A				

Condiciones de tratamiento

25 Se evaluaron cuatro muestras de heces, 3 positivas para *C. difficile* y 1 negativa para *C. difficile* para determinar el efecto de la temperatura y el tiempo en la eficiencia de extracción. También se incluye un control de extracción (16s gen ADNr) para determinar el efecto de las condiciones en la flora mezclada que está presente dentro de las muestras de heces. El canal Fam es específico para los genes *tcdA/B* de *C. difficile* mientras que el canal Cy5 es específico para el control de extracción. Los resultados se muestran en las figuras 1 y en la tabla 4.

Como se puede observar a partir de los resultados en la tabla 4, la temperatura y los tiempos preferidos para la lisis de estas muestras son entre 85° C y 95° C durante 15 minutos. Todas las muestras positivas y la flora fecal se detectaron fácilmente.

5

Tabla 4. El efecto del tiempo y la temperatura en la eficiencia del método de lisis/conversión HGS utilizando muestras de heces.

	10 min/85° C		15 min/85° C		20 min/85° C	
	TcdA/B	ExCon	TcdA/B	ExCon	TcdA/B	ExCon
Muestra 1	44.73	34.54	40.46	31.91	39.1	31.08
Muestra 2	41.57	35.09	41.59	30.31	40.23	29.09
Muestra 3	N/A	32.76	N/A	28.15	N/A	27.25
Muestra 4	42.6	30.19	N/A	30.26	46.22	28.91
	10 min/90° C		15 min/90° C		20 min/90° C	
	TcdA/B	ExCon	TcdA/B	ExCon	TcdA/B	ExCon
Muestra 1	41.66	32.17	39.63	30.39	39.88	30.73
Muestra 2	41.19	29.05	41.25	27.53	41.33	25.17
Muestra 3	N/A	N/A	N/A	27.31	N/A	26.6
Muestra 4	42.63	28.69	43.88	27.27	N/A	27.86
	10 min/95° C		15 min/95° C		20 min/95° C	
	TcdA/B	ExCon	TcdA/B	ExCon	TcdA/B	ExCon
Muestra 1	40.48	30.82	39.53	31.52	39.52	29.74
Muestra 2	40.38	26.41	40.3	26.31	42.21	30.52
Muestra 3	N/A	27.08	N/A	27.47	N/A	37.35
Muestra 4	41.93	27.64	40.31	27.76	42.2	26.66

10

Tabla 5. El efecto del pH del regulador de elución en la capacidad del método para detectar de manera eficiente HCV directamente de muestras de suero

	70° C			75° C			80° C			90° C		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
PCR-A-pH 11.5	N/A	N/A	N/A									
PCR-A-pH 12.5	N/A	36.83	36.01	N/A	33.27	34.8	36.88	33.02	N/A	34.45	34.22	33.14
PCR-B-pH 11.5	N/A	N/A	N/A									
PCR-B-pH 12.5	N/A	39.34	37.17	N/A	35.76	36.2	40.98	35.05	N/A	36.21	36.48	35.51

15

Se agregaron 10 µl de HCV (Acrometrix) a 200 µl de bisulfito de sodio 3M y se calentó a 75° C, 75° C, 80° C y 90° C durante 5, 10 o 15 minutos. Se eliminó el bisulfito utilizando un método de MethylEasy™ modificado y las muestras se resuspendieron en 20 µl de regulador de elución, se transcribieron inversamente 12 µl y se amplificaron 2 µl utilizando condiciones estándar.

20

Como se puede observar a partir de los resultados de la tabla 5 ARN de HCV puede soportar fácilmente la conversión de lisis a 90° C, la mayor temperatura evaluada. Aún más sorprendente, el ensayo funcionó para la detección de virus de ARN en presencia de regulador con pH alto, lo cual es contrario a las publicaciones que indican que las especies de ARN necesitan ser mantenidas alrededor de pH neutral.

25

Estos resultados combinados con los resultados de la tabla 4 sugieren que una temperatura de aproximadamente 90° C durante 15 minutos podría ser un método de procesamiento de muestra universal para los organismos con presencia de ADN de cadena doble como C. difficile y los virus de ARN de cadena sencilla como el HCV. Adicionalmente, como C. difficile es un organismo que contiene esporas, los resultados indican que el método es lo suficientemente duro como para abrir las esporas resistentes, pero lo suficientemente suave como para que los virus que contienen ARN no se degraden. Una vez más, estos datos no han sido predichos por la técnica anterior.

30

PCR A y B difieren en la mezcla de reacción utilizada (JumpStart (Sigma) y FastStart (Roche) respectivamente).

Suero

## ES 2 613 743 T3

Se prepararon diluciones de HCV (Zeptoometrix), se agregaron 10 µl de cada dilución a 200 µl de bisulfito de sodio 3M y se calentó a 75° C durante 10 minutos.

5 Se eliminó el bisulfito utilizando el método de MethylEasy™ y las muestras se resuspendieron en 20 µl de regulador de elución, se transcribieron inversamente 12 µl y se amplificaron 2 µl utilizando condiciones estándar.

Tabla 6. Detección sensible de virus HCV directamente desde el suero.

	HCV/PCR 200	UI/PCR 32.54	Positivo 34.41
1\10			
1\100	20	37.07	38.32
1\1000	2	37.54	38.63
1\10000	0.2	N/A	N/A
1/100000	0.02	N/A	N/A
Proceso		N/A	N/A

10 Como se puede observar a partir de la tabla 6, cuando se utiliza el método HGS para procesar el suero directamente, solo se pueden someter a lisis y convertir de manera eficiente 2 UI de HCV simultáneamente. Estos resultados demuestran la excelente sensibilidad que se puede generar utilizando los virus de ARN como objetivo para el proceso.

Tabla 7. Lisis/conversión simultanea de virus de ARN y virus de ADN en condiciones idénticas de extracción.

15

La figura 2 muestra la amplificación de los tres virus de la misma muestra.

A. Fam=Norovirus (virus de ARN de cadena sencilla).

20

B. Hex=Adenovirus (virus de ADN de cadena doble).

C. Cy5=Rotavirus (virus de ARN de cadena sencilla).

25

Se obtuvieron muestras cualitativas de Norovirus, Adenovirus y Rotavirus de Zeptomatrix. Se agregaron las muestras de cada virus (10 µl) a bisulfito de sodio 3M y se calentaron las muestras a 90° C durante 10, 15 y 20 minutos. Se eliminó el bisulfito utilizando un método de MethylEasy™ modificado y se resuspendieron las muestras en 20 µl de regulador de elución, se transcribieron inversamente 12 µl y se amplificaron 2 µl utilizando condiciones estándar.

30

Como se puede observar a partir de la tabla 7, después de calentamiento durante 15° C a 90° C, se sometieron a lisis y se convirtieron de manera eficiente los virus de ARN y de ADN. Se purificaron ambos tipos de virus en condiciones idénticas. Estos resultados demuestran adicionalmente la utilidad del método HGS como un método de preparación de muestras universal para la lisis y conversión eficiente de los virus de ADN y de ARN de la misma muestra. Nuevamente, de forma sorprendente, los virus de ARN pueden soportar fácilmente el tratamiento de la muestra a 90° C y regulador con pH alto.

35

Tabla 7. Lisis/conversión simultanea de virus de ARN y virus de ADN en condiciones idénticas de extracción.

	Fam Norovirus			Hex Adenovirus					Cy5 Rotavirus			
	10 min	15 min	20 min	PC	10 min	15 min	20 min	PC	10 min	15 min	20 min	PC
Puro	31.75	29.67	30.09	N/A	36.32	32.36	36.37	N/A	34.5	32.13	37.35	N/A
1\10	35.61	33.25	31.96	N/A	N/A	36.45	N/A	N/A	40.04	34.5	38.6	N/A
1\100	40.51	38.87	35.84	N/A	N/A	44.67	N/A	N/A	39.32	38.57	N/A	N/A

40

Se agregaron muestras cualitativas de Norovirus, Adenovirus y Rotavirus obtenidas de Zeptomatrix a muestras fecales. Se agregaron muestras de los virus (10 µl) a materia fecal y se mezcló la muestra. Se colocó un hisopo en materia fecal y luego se transfirió a un tubo que contenía 200 µl de bisulfito de sodio 3M de pH 5.0 y luego se calentó a 90° C durante 15 minutos.

45

Se eliminó el bisulfito utilizando un método de MethylEasy™ modificado y se resuspendieron las muestras en 20 µl de regulador de elución, se transcribieron inversamente 12 µl y se amplificaron 2 µl utilizando condiciones estándar.

Tabla 8. Efecto de agregar virus a las muestras fecales.

	Norovirus	Adenovirus	Rotavirus	Proceso
Adición de Adenovirus	N/A	41.1	N/A	N/A
Adición de Norovirus	39.45	N/A	N/A	N/A
Adición de Rotavirus	N/A	N/A	39.62	N/A

5 Los resultados de la tabla 8 muestran que incluso cuando se agregaron partículas virales a las muestras fecales y se aplicó la condición universal, los virus de ADN y de ARN se sometieron a lisis y se convirtieron de manera eficiente. Por lo tanto, el método debería ser aplicable a cualquier tipo de muestra para cualquier microorganismo de interés.

Células humanas

10

Para determinar si la presente invención también es adecuada para detectar enfermedades humanas como el cáncer, se incubaron 5 µl, 10 µl y 20 µl de células humanas diluidas durante 10 minutos o 15 minutos a 70° C, 80° C, 90° C y 95° C en 200 µl de bisulfito 3M. Se procesaron las muestras para extraer la solución de bisulfito y se resuspendieron en 50 µl de regulador pH 12.3. Se amplificó el material (2 µl) utilizando cebadores y sondas específicos para el gen humano de β-globina. Los resultados se muestran en la tabla 9 y en la figura 3.

15

Tabla 9. Optimización de tiempo/temperatura utilizando células MRC5 humanas.

	70°C		80°C		90°C		95°C	
	10 min	15 min						
5 células ul	N/A	N/A	42.15	43.63	38.62	33.19	ND	ND
10 células ul	N/A	N/A	40.72	36.45	35.04	33.31	37.11	33.8
20 células ul	N/A	N/A	45.08	37.03	36.38	32.49	ND	ND
ND=no hecho.								

20 Como se puede observar a partir de la tabla 9, el tiempo y la temperatura preferidos para la lisis y conversión simultánea de células humanas sin pretratamiento es entre 90° C a 95° C durante 15 minutos.

La figura 3 muestra el efecto de agregar células humanas en materia fecal. La figura 3A muestra las células MRC5 humanas calentadas durante 15 minutos en reactivo de bisulfito 3M a 95° C, luego resuspendidas en regulador de pH alto (12.3) y amplificadas para el gen humano de β-globina. La figura 3B muestra las mismas células adicionadas en materia fecal calentadas durante 15 minutos en 3M de reactivo de bisulfito a 95° C, luego resuspendidas en regulador de pH alto (12,3) y amplificadas para el gen de β-globina humano. Como se puede observar a partir de los resultados, se pueden someter a lisis y convertir de manera eficiente las células humanas en materia fecal humana primaria sin ninguna necesidad de preprocesamiento de la muestra o aislamiento de ADN.

25

30

Los resultados indican que el perfilado por metilación de las células humanas se puede llevar a cabo directamente en muestras fecales obtenidas de un paciente sin la necesidad de un pretratamiento o una purificación de la muestra antes del bisulfito. Por lo tanto, el método sería ideal como un método no invasivo y simple para el diagnóstico del cáncer colorrectal directamente a partir de la materia primaria del paciente.

35

Kits de pruebas de diagnóstico

La presente invención se puede proporcionar en forma de kits de diagnóstico para permitir la facilidad de uso en un laboratorio de diagnóstico o similar. La tabla 10 y la tabla 11, por ejemplo, muestran los reactivos proporcionados en un kit de prueba típico para un microorganismo. El kit incluye instrucciones de uso. Se apreciará que es posible que los tubos, los hisopos y otros equipos de laboratorio no se proporcionen en un kit ya que estos materiales, generalmente, están fácilmente disponibles en un laboratorio de diagnóstico.

40

Tabla 10. Caja 1 de 2 (almacenamiento a temperatura ambiente)

45

Nombre del componente	Contenidos
Reactivo 1 (Agua alcalina)	5 x 5 mL

ES 2 613 743 T3

Reactivo 2 (Bisulfito)	5 x 3.5 g
Reactivo 3 (Reactivo de unión)	5 x 5.8 mL
Reactivo 4 (Regulador de lavado)	5 x 3ML
Reactivo 5 (Regulador de elución)	5 x 3ML
Hisopos Hinchados	100
Tubos de reacción (1.5 mL)	100
Tubos de lavado	100
Tubos de recolección (1.5 mL)	100
Columnas de purificación	100
Guía detallada de usuario	1

Tabla 11. Caja 2 de 2 (almacenamiento a -20° C luego de recepción)

PCR mezcla de reacción	x 5 frascos
PCR componentes	x 5 frascos

- 5 La caja 2 se debe almacenar a -20° C en una "habitación libre de" ADN en una ubicación diferente del lugar donde se procesarán las muestras.

Los kits para microorganismos específicos o pruebas genéticas incluyen cebadores de PCR para permitir la amplificación de la molécula de ácido nucleico objetivo.

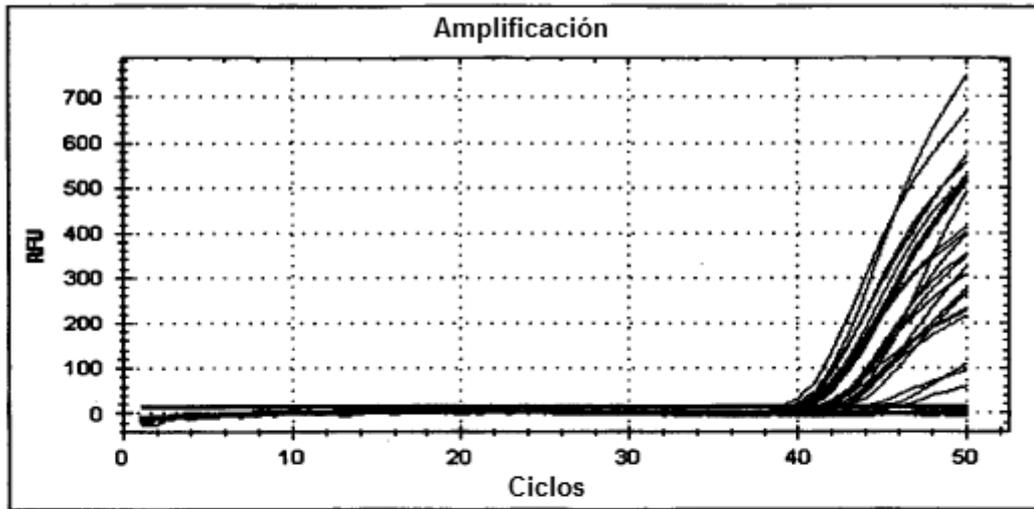
10

Reivindicaciones

Un ensayo de detección molecular que comprende:

- 5 tratar una muestra biológica directamente con un agente de bisulfito en una concentración de 2.5M a 3.5M y un rango de pH de 4.5 a 5.5 y calentar entre 75° C a 95° C por 1 a 30 minutos para permitir la interrupción celular y el tratamiento con ácido nucleico;
- 10 retirar el agente bisulfito de la muestra tratada; y
- 10 detectar un ácido nucleico objetivo en la muestra tratada;
- En el que el ensayo se lleva a cabo sin pretratamiento de la muestra biológica antes de tratar con agente bisulfito.
- 15 2. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual la muestra biológica se selecciona de una muestra fecal, nasal, sanguínea, plasma, suero, células bucales, pus, herida, filtrados concentrados, líquido cefalorraquídeo, semen, citología de base líquida (LBC), tejido, FFPE, células capturadas por láser, células cultivadas, células sedimentadas, cultivos bacterianos, colonias bacterianas, suspensión viral, aspirados, lavado bronquial, muestra de esputo, muestra ambiental, concentrado ambiental, productos alimenticios, materia prima, muestra de agua o concentrado de agua.
- 20 3. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para detectar una enfermedad infecciosa, enfermedad genética o rasgo genético en un animal.
- 25 4. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 3 en el cual la enfermedad infecciosa es provocada por un microorganismo; preferiblemente el microorganismo es una bacteria, virus, viroides, levadura, hongos, parásitos o amebas.
- 30 5. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 2 en el cual la enfermedad genética es cáncer, una enfermedad asociada con variación en el número de copias, trastorno hereditario, enfermedad inducida por el ambiente, enfermedad provocada por la exposición a carcinógenos, enfermedad caracterizada por la expansión o reducción en una longitud de repetición de nucleótidos.
- 35 6. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el cual el agente de bisulfito es bisulfito de sodio o metabisulfito de sodio.
- 40 7. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 6, en el que el agente bisulfito se utiliza en una concentración de 3M en un pH de 5.0.
- 40 8. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 7 en el que la muestra biológica se calienta durante 10 a 20 minutos a una temperatura de entre 80° C y 95° C.
- 45 9. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 8 en el que el bisulfito se elimina mediante purificación basada en columna, purificación basada en perlas o precipitación.
- 50 10. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9 en el que después del retiro del bisulfito, la muestra tratada se resuspende en regulador de elución que tiene un pH de por lo menos 10; preferiblemente el regulador de elución tiene un pH de entre 11.5 y 12.5.
- 55 11. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el regulador de elución tiene un pH de por lo menos 12.
12. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11 que incluye adicionalmente proporcionar sondas o cebadores de ácido nucleico a la muestra tratada.
13. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 12 en que la molécula de ácido nucleico objetivo se detecta mediante amplificación.
- 60 14. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la amplificación es PCR, qPCR, PCR de transcripción inversa, PCR digital, amplificación isotérmica O amplificación de señal.
15. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el cual el ácido nucleico objetivo se detecta mediante secuenciación de la muestra tratada.

A.



B.

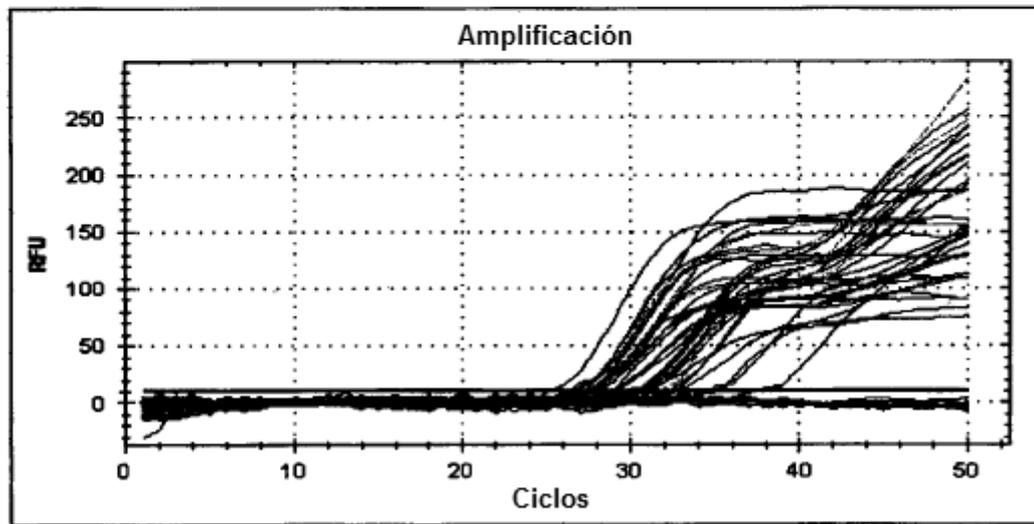


Figura 1

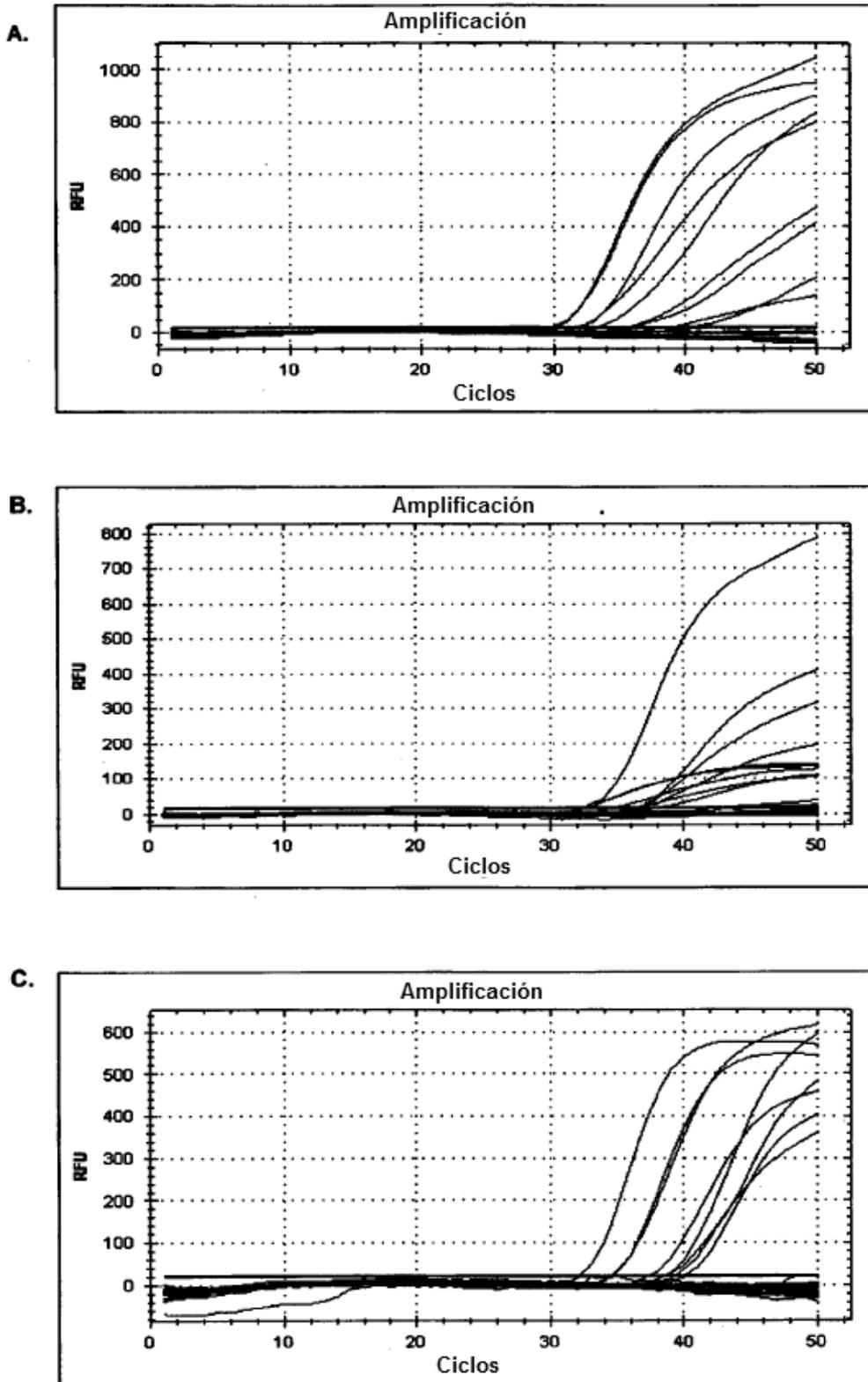
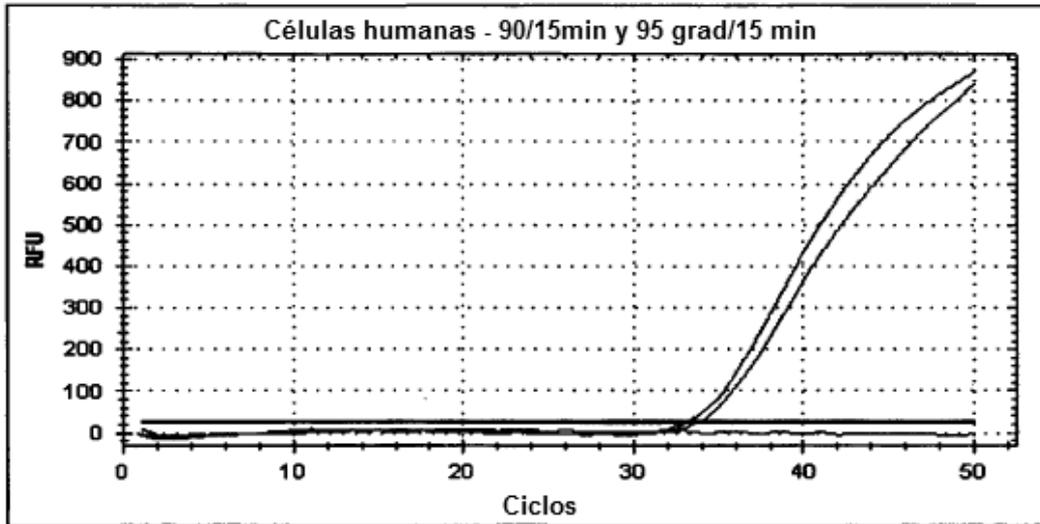


Figura 2

A.



B.

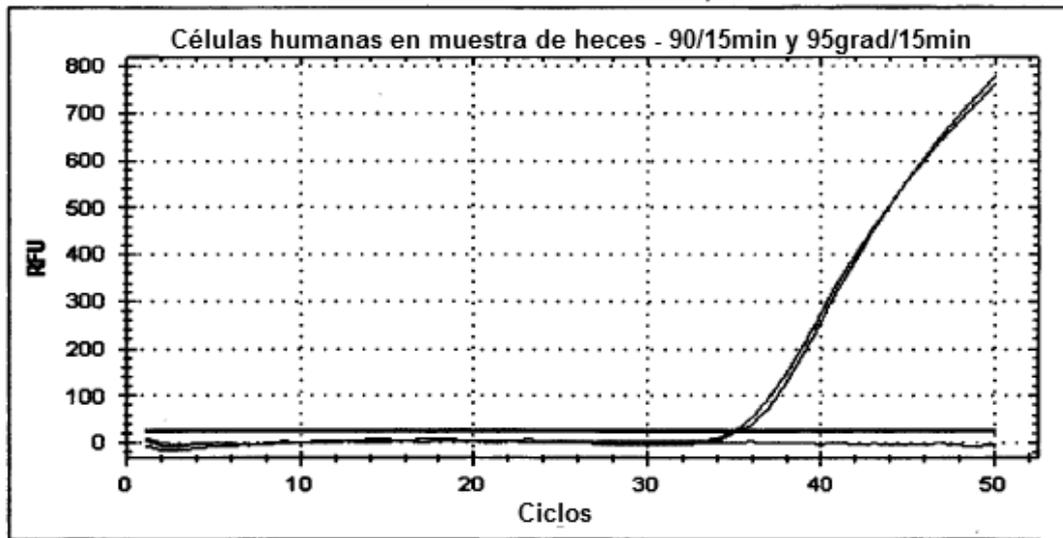


Figura 3