

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 352**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01L 3/02** (2006.01)

**B01D 15/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013 PCT/GB2013/050846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144654**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013 E 13715412 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2831230**

54 Título: **Métodos para la preparación de muestras para la amplificación del ácido nucleico**

30 Prioridad:

**30.03.2012 GB 201205769**

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

**06.07.2017**

73 Titular/es:

**LUMORA LTD (100.0%)  
Staffords Chartered Accounts CPC1 Capital Park  
Fulbourne  
Cambridge CB21 5XE, GB**

72 Inventor/es:

**PEREIRA, CLINT;  
MCELGUNN, CATHAL JOSEPH y  
TISI, LAURENCE, CARLO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 622 352 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).

**Métodos para la preparación de muestras para la amplificación del ácido nucleico****Descripción**

5

**Campo de la invención**

10 **[0001]** La presente invención se sitúa en el campo de la preparación de la muestra. En particular, se refiere a métodos para preparar muestras antes de realizar la amplificación de ácido nucleico, como se define en las reivindicaciones.

**Fondo**

15

Nucleic Acid Amplification Technologies, "NAATs"

20 **[0002]** Los NAAT permiten la detección y cuantificación de un ácido nucleico en una muestra con alta sensibilidad y especificidad. Los NAAT pueden usarse para determinar la presencia de un ácido nucleico de molde particular en una muestra, como se indica por la presencia de un producto de amplificación después de la implementación de una NAAT particular. A la inversa, la ausencia de cualquier producto de amplificación indica la ausencia de ácido nucleico molde en la muestra. Tales técnicas son de gran importancia en aplicaciones clínicas, industriales y de investigación. Ejemplos de la aplicación de NAAT incluyen, pero no se limitan a: determinar si un patógeno está presente en una muestra, cuantificar la cantidad de virus en una muestra, comparar los niveles relativos de dos o más genes en una muestra o determinar el nivel de expresión de un marcador específico en una muestra.

25 **[0003]** La técnica anterior ha descrito una variedad de técnicas de termociclado y isotérmicas para la amplificación de ácidos nucleicos. Las técnicas de termociclado, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usan ciclos de temperatura para impulsar ciclos repetidos de síntesis de ADN, lo que conduce a la síntesis de grandes cantidades de nuevo ADN en proporción a la cantidad original de ADN molde. También se han desarrollado varias técnicas isotérmicas que no dependen del termociclado para impulsar la reacción de amplificación. Se han desarrollado técnicas isotérmicas, que utilizan polimerasas de ADN con actividad de desplazamiento de cadena, para reacciones de amplificación que no implican una etapa de síntesis de ARN. De manera similar, para reacciones de amplificación que implican una etapa de síntesis de ARN, se han desarrollado técnicas isotérmicas que pueden usar transcriptasa inversa, ARNasa H y/o una ARN polimerasa dependiente de ADN (véase, por ejemplo, Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies - A Review. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Volumen 27, Edición 3 marzo 2008, páginas 224 - 243).

35

La preparación de la muestra es un requisito común para los NAAT.

40 **[0004]** Cuando se desea determinar la presencia y/o nivel de un ácido nucleico en una muestra particular usando una NAAT, se requiere comúnmente que antes de realizar la NAAT, la muestra se somete a un cierto grado de pre-procesamiento (denominado en la presente memoria «preparación de muestras») para hacer que los ácidos nucleicos presentes en la muestra estén disponibles para la NAAT en una condición que permita que un ensayo basado en NAAT funcione eficazmente.

45 En la práctica, la preparación de muestras puede ser un proceso laborioso y de múltiples etapas que requiere personal cualificado e infraestructura, consumibles caros, una amplia gama de reactivos y disolventes (a menudo peligrosos o dañinos) y varios equipos tales como centrifugadoras y colectores de vacío. La naturaleza complicada del proceso ofrece múltiples oportunidades para errores del operador (incluidos la contaminación de la muestra) y como resultado la preparación de la muestra es difícil de realizar fuera de los laboratorios especializados sin la ayuda de costosos dispositivos de preparación de muestras robóticas/semi-robóticas.

50

55 **[0005]** Los métodos que pueden simplificar y reducir el costo de preparación de muestras, por tanto, son altamente deseables y permitir la aplicación de las tecnologías basadas en AEAC lejos de laboratorios especializados en el entorno más difícil y ajustes económicos. Por ejemplo, los métodos mejorados de preparación de muestras podrían permitir que los NAAT se utilicen en aldeas de África para la detección del VIH si el costo de la preparación efectiva de la muestra es bajo y el método de preparación de la muestra es lo suficientemente simple como para ser confiablemente realizado por un no experto en tal situación.

Principios de preparación de la muestra

60

**[0006]** Hay tres principios generales que pueden estar asociados con la muestra de preparación de:

- i) Hacer que el ácido nucleico esté físicamente disponible para una NAAT (lisis de la muestra)
- ii) Eliminación/reducción de inhibidores de NAAT
- iii) Concentración de ácidos nucleicos

65

Para que una NAAT funcione, los ácidos nucleicos de una muestra deben estar en contacto físico directo con los reactivos de NAAT. Dado que los ácidos nucleicos se encuentran generalmente dentro de las células o cápsidas de virus y puesto que tales células/virus pueden incorporarse adicionalmente dentro de una matriz complicada, el proceso de preparación de muestras debe ser capaz de interrumpir suficientemente tanto las cápsidas de células/virus como cualquier matriz de muestra asociada para poner ácido nucleico a disposición de la NAAT.

**[0007]** Además, la matriz en la que el ácido nucleico de interés reside pueden contener sustancias capaces de inhibir una NAAT, por lo tanto, puede ser necesario eliminar o reducir tales inhibidores para que la NAAT funcione adecuadamente.

**[0008]** Más aún, en un número de casos, la abundancia de ácido nucleico de interés en una muestra puede ser muy baja por unidad de volumen. En tales casos, son ventajosos los métodos que pueden concentrar ácidos nucleicos de un gran volumen en un volumen más pequeño; A menudo tal concentración de ácido nucleico puede, en sí misma, facilitar la purificación del ácido nucleico a partir de inhibidores.

#### Lisis de la muestra

**[0009]** El lisis de muestra, para hacer disponibles ácidos nucleicos, se puede lograr por medios mecánicos (revisado en J. Brent (1998) Breaking Up Isn't Hard To Do: A cacophony of sonicators, cell bombs and grinders" The Scientist 12(22):23) y técnicas no mecánicas. Las técnicas mecánicas simples incluyen el uso de un mezclador y la homogeneización forzando a las células a través de aberturas restrictivas. La sonicación se basa en la exposición de una muestra a ondas sonoras de alta frecuencia, y los enfoques de perlas se basan en exponer las células a mezclas violentas en presencia de diversas perlas.

**[0010]** La interrupción química de muestras es una alternativa a la disrupción mecánica. Los detergentes son agentes líticos químicos importantes que actúan interrumpiendo las bicapas lipídicas y las proteínas solubilizantes/desnaturalizantes. El dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente iónico, se utiliza comúnmente en protocolos de extracción de ADN forenses debido en parte a su capacidad para solubilizar macromoléculas y desnaturalizar proteínas dentro de la célula (JL Haines et al. (2005) Current Protocols in Human Genetics Vol. 2, (2005 John Wiley and Sons, Inc. Pub.). La proteinasa K se usa a menudo en combinación con protocolos a base de detergentes (por ejemplo, SDS, Tween-20, Triton X-100) para facilitar la lisis celular. Otra forma de lisis de detergente se basa en papel de FTA (Patente de EE.UU. N° 6.958.392), que es un filtro de celulosa impregnado con una base débil, un detergente aniónico, un agente quelante y conservantes.

**[0011]** Los agentes caotrópicos, tales como hidrocloreuro de guanidinio también pueden actuar como agentes de lisis de muestra eficaz, convenientemente, estos también prevén un medio para la purificación de ácidos nucleicos del modo que se discute más adelante.

**[0012]** Todavía otro enfoque a la lisis es el uso de calor para abrir células/virus. Este enfoque físico tiene el beneficio de requerir hardware muy simple (sólo un bloque de calentamiento o un baño de agua). El calor puede usarse junto con otros reactivos de lisis química para mejorar la eficacia de lisis de las células difíciles de lisar, tales como ciertas bacterias Gram positivas y esporas. El beneficio de los métodos de lisis química y de calor es que son especialmente eficaces en inactivar nucleasas que pueden degradar el ácido nucleico de interés. Además, inactivan proteasas que pueden dañar las enzimas utilizadas en los NAAT.

#### Inhibidores de NAAT

**[0013]** La explotación y la utilidad de NAAT son significativamente y adversamente afectadas por una amplia gama de sustancias que actúan para afectar negativamente al rendimiento de una NAAT (véase, por ejemplo, "Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples, Appl. Environ. Microbiol. October 1998 vol. 64 no. 10 3748-3753" para una revisión de varios problemas de inhibidores. Ejemplos de inhibidores son el hemo de la sangre, el ácido húmico que se encuentra en las plantas y el suelo, los polifenoles, ciertos metales divalentes y el colágeno. Dado que casi todas las muestras biológicas contienen inhibidores de la NAAT, es claramente necesario procesar las muestras antes de realizar una NAAT para eliminar o reducir los inhibidores de nivel. Esto es especialmente cierto con ciertas matrices complicadas y heterogéneas tales como heces que tienen una carga muy alta de sustancias inhibitorias.

#### Eliminación del inhibidor

**[0014]** La eliminación o reducción de los inhibidores de NAAT pueden alcanzarse por i) la separación activa del ácido nucleico a partir de inhibidores usando alguna propiedad del ácido nucleico y/o inhibidor, respectivamente, ii) dilución de la muestra para llevar la concentración de inhibidores por debajo de la que afecta negativamente la NAAT empleada o iii) la adición de un aditivo en fase líquida que neutraliza el efecto inhibitorio del inhibidor.

**[0015]** Por ejemplo, Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, CA) es una resina modificada que une de manera eficiente cationes metálicas multivalentes que pueden inhibir NAAT (Walsh P. S. et al., Chelex 100 as a medium for simple

extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4):506-13).

**[0016]** La polivinilpirrolidona (PVPP) es una modificación insoluble altamente reticulada de polivinilpirrolidona (PVP) que se ha utilizado para la eliminación de polifenoles, tales como el ácido húmico, durante la extracción de ADN (Holben WE, Jansson JK, Chelm BK, Tiedje JM (1988) ADN Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (3): 703-711).

**[0017]** Se ha identificado una gama de resinas de intercambio iónico útiles para la eliminación de inhibidor fecal. Éstos incluyen pero no se limitan a: Optipore SD-2 (Dowex), una resina de estireno-divinilbenceno aminada usada para la decoloración y Diaion WA30 (Mitsubishi Chemical), una resina de intercambio aniónico altamente porosa y débilmente básica. Hemos encontrado que estas resinas pueden sustituirse para PVPP en la eliminación de inhibidores de NAAT de lisados fecales. El carbón activado es otro material que puede usarse para eliminar los inhibidores de NAAT. Preferiblemente, el carbón activado estará en una forma en la que no puede pasar a través de fritas o filtros usados para retenerlo, por ejemplo, el carbón activado puede estar en forma de partículas grandes o perlas. En general, se pueden seleccionar combinaciones de resinas y fritas o filtros de tal manera que las fritas o filtros no queden bloqueados por las resinas mientras se retiene la resina u otro material en fase sólida usada.

**[0018]** Un enfoque alternativo consiste en utilizar la cromatografía de exclusión por tamaño para separar ácido nucleico de alto peso molecular de inhibidores de bajo peso molecular NAAT. Por ejemplo, las columnas de giro *Illustra MicroSpin™ G-25* de GE Healthcare se pueden utilizar para este efecto.

**[0019]** Mientras que el método más sencillo para los inhibidores de NAAT es quizás simplemente diluir una muestra hasta el punto de que concentraciones de inhibidor sean demasiado bajas para afectar negativamente a una NAAT particular, esto tiene la desventaja de también diluir cualquier ácido nucleico en la muestra. Por lo tanto, cuando el ácido nucleico puede ser limitante (tal como en la detección de patógenos), el enfoque de dilución puede resultar en falsos resultados negativos que se obtienen en los ensayos basados en NAAT. En cierta medida, el enfoque de dilución puede mejorarse añadiendo reactivos en fase líquida que neutralizan ciertos inhibidores. Por ejemplo, EDTA puede añadirse a una muestra para unirse a y hacer indisponible para la NAAT, ciertos metales divalentes inhibitorios (*por ejemplo*,  $\text{Ca}^{2+}$ ) y, de este modo, reducir la cantidad de dilución de la muestra necesaria para permitir que la NAAT se emplee. De hecho, para algunas aplicaciones clínicas en las que el número de organismos a detectar por una NAAT está en un nivel muy alto, las muestras pueden diluirse en tampones que contienen EDTA por un factor en el que la concentración del inhibidor es demasiado baja para inhibir la amplificación pero donde la cantidad de objetivo presente en la reacción es suficiente para la detección reproducible. Sin embargo, en tipos de muestras muy inhibitorias (por ejemplo, heces humanas), a menudo se requiere un factor de dilución del orden de 500 veces incluso con EDTA para reducir los niveles de inhibidor hasta un punto en el que se puede emplear una NAAT; por lo que claramente este enfoque no es ideal ya que tal dilución sin duda afectaría la sensibilidad de una prueba basada en NAAT. Además, cantidades excesivas de EDTA pueden por sí mismas ser inhibitorias a NAAT si se transmiten al ensayo basado en NAAT, ya que EDTA puede quelar el  $\text{Mg}^{2+}$  requerido como un cofactor de polimerasas ADN/ARN.

#### Purificación de ácidos nucleicos

**[0020]** Cuando la muestra-preparación implica la purificación específica de ácidos nucleicos, esto elimina inhibidores NAAT, pero también puede concentrar el ácido nucleico de la muestra.

**[0021]** En este enfoque, una propiedad única de los ácidos nucleicos se usa para separarlos de otros constituyentes de la muestra (incluyendo inhibidores) y permitir que los ácidos nucleicos se concentren en un tampón de elección. Esto tiene la ventaja significativa de aumentar la sensibilidad de las pruebas basadas en NAAT. Por ejemplo, si el ácido nucleico del VIH contenido en 1 ml de sangre se puede concentrar en apenas 20  $\mu\text{l}$ , entonces esto podría ofrecer un aumento de hasta 50 veces en la concentración de ácido nucleico del VIH, preparación post-muestra: esto podría hacer la diferencia entre una NAAT específica que detecta o no el VIH.

**[0022]** Uno de los métodos de purificación de ácido nucleico más tempranos era el uso de extracción con fenol/cloroformo (D.M. Wallace (1987) Large and small scale phenol extractions. *Methods Enzymol.* 152:33-41; Maniatis, T. et al., "Purification of Nucleic Acids" in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). En este método, la mayoría de la proteína se desplaza a la fase orgánica o a la interfase orgánico-acuosa, y el ADN solubilizado permanece en la fase acuosa. La fase que contiene ADN puede someterse a precipitación con etanol y ADN aislado después de una serie de etapas de centrifugación y lavado. La ventaja del método de extracción orgánica es que produce preparaciones de ADN de alta calidad (con cantidades relativamente bajas de proteína y relativamente baja degradación) y sigue siendo uno de los métodos más confiables disponibles hoy en día. Las principales desventajas son que el procedimiento es intensivo en tiempo y mano de obra, utiliza disolventes y reactivos peligrosos, requiere equipo engorroso y es relativamente difícil de adaptar a configuraciones de alto rendimiento y ciertamente no es adecuado para pruebas cercanas al paciente, o para su uso por un operador no cualificado.

**[0023]** Un enfoque alternativo para la purificación de ácido nucleico es el uso de sílice en combinación con un

agente caotrópico (Boom, R. et al., (1990) "Rapid and Simple method for purification of nucleic acids," J Clin Microbiol. 28(3):495-503). El agente caotrópico actúa tanto para lisar células/virus como para actuar también para que los ácidos nucleicos se unan a las partículas de sílice. El ácido nucleico puede eluirse posteriormente a partir de la sílice usando un tampón de baja fuerza iónica (o agua). El método de Boom forma la base de un número de enfoques de lisis/purificación (*por ejemplo*, DNAIQ Systems, Promega, Madison, WI). Una alternativa a las perlas de sílice es el uso de membranas de sílice (QIAamp, Qiagen Hilden, DE). Además, las propias perlas de sílice pueden modificarse para mejorar adicionalmente la unión al ADN.

**[0024]** Un enfoque basado en la carga alternativa es el uso de resinas de intercambio iónico. Una solución que contiene ADN y otras macromoléculas se expone a la resina de intercambio iónico. El ADN cargado negativamente (debido a su esqueleto de fosfato) se une relativamente fuertemente a la resina a una concentración o pH de sal dado. Proteína, hidrocarburo, y otras impurezas se unen relativamente débilmente (si lo hacen) y se lavan de las perlas (*por ejemplo*, en un formato de columna o por centrifugación). El ADN purificado puede entonces eluirse en un tampón de alta fuerza iónica. Una resina de intercambio aniónico comercialmente disponible que se utiliza actualmente se basa en perlas de sílice modificadas con DEAE (Genomic-tip, Qiagen).

**[0025]** Un enfoque relacionado con el de resinas de intercambio iónico consiste en utilizar matrices sólidas que tienen una carga positiva neta a un pH dado y son capaces de unión a ADN (Baker, MJ, patente de EE.UU. nº 6.914.137). La modificación contiene un grupo ionizable, tal que el enlace del ADN se invierte a un pH más alto (cuando el grupo ionizable es neutro o cargado negativamente). Un enfoque ampliamente utilizado de este tipo se basa en la perla ChargeSwitch (Life Technologies, Inc. Carlsbad, CA).

#### Captura de oligonucleótidos

**[0026]** Los ácidos nucleicos diana pueden aislarse también mediante el uso de oligonucleótidos de captura. En esta muestra de método, el ácido nucleico se incubaba con un oligonucleótido de captura que hibrida con la secuencia diana complementaria en el blanco. Los complejos de oligonucleótido de captura diana hibridado se extraen de la solución y se lavan para eliminar las impurezas. Esto puede lograrse mediante la interacción ligando-receptor, tal como estreptavidina de biotina donde está biotinilado el oligonucleótido de captura oligo, y se puede utilizar en un número de formatos, incluyendo perlas magnéticas, tubos recubiertos, etc. La diana capturada puede entonces añadirse directamente a la reacción de amplificación. Un ejemplo del uso de captura de oligonucleótidos es el ensayo APTIMA HIV (Gen-Probe).

#### Reparación inmunomagnética (IMS)

**[0027]** Tipos celulares específicos también se pueden aislar usando anticuerpos unidos a partículas paramagnéticas dirigidas hacia sus epítopos de superficie específicos. Las células diana/virus se eliminan de la muestra mediante la aplicación de un campo magnético y se añaden a un ensayo de detección para el organismo. Un ejemplo de la utilización de IMS es la detección de *Salmonella* por el sistema Pathatrix (Matrix Micro-Science Ltd). (Odumeru JA, y Carlos G. Leon-Velarde CG (2012) Salmonella Detection Methods for Food and Food Ingredients. in Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen, Ed. Barakat S. M. Mahmoud. InTech, Rijeka, Croatia.)

#### Perlas magnéticas

**[0028]** Un experto en la técnica reconocerá que las perlas magnéticas o partículas pueden utilizarse para ChargeSwitch, captura de oligonucleótido y separación inmunomagnética. El método Boom también se puede implementar usando partículas magnéticas o perlas que contienen tanto sílice como óxido de hierro magnético (Berensmeier S. (2006) Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73(3):495-504). Un ejemplo de extracción Boom de partícula magnética es el sistema Nucli-SENS (bioMérieux).

#### Problemas del protocolo de preparación de muestras

**[0029]** Los tres aspectos discutidos de de preparación de muestras, extracción, eliminación de inhibidor, purificación/concentración de ácido nucleico, resultan inevitablemente en procedimientos de múltiples pasos. Cada paso en el procedimiento agrega tiempo y esfuerzo e introduce complejidad, coste y errores de operador. Incluso para los laboratorios especializados con operadores altamente capacitados, la naturaleza complicada de los actuales métodos de preparación de muestras significa que los métodos manuales son simplemente demasiado engorrosos, y se requiere, por lo tanto, alguna forma de automatización.

**[0030]** Lejos de laboratorios especializados, puede no haber la infraestructura ni los operadores cualificados para realizar la preparación de muestras. Para abordar esta necesidad, se han introducido tecnologías que permiten la automatización discreta de la preparación de muestras para que los ensayos NAAT puedan realizarse por usuarios no expertos. Sin embargo, tales enfoques requieren consumibles complicados y costosos que pueden excluir su uso para ciertos ambientes en los que hay limitaciones económicas en la compra de costosos métodos de preparación de muestras.

**[0031]** Una variedad de instrumentos robóticos de laboratorio se han desarrollado para la purificación parcialmente automatizada de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el instrumento Maxwell 16 (Promega) instrumento iPrep (Life Technologies), Nucli-SENS easyMAG (bioMérieux) y Qiagen EZ1, sistemas BioRobot M48 y Qiacube (Qiagen) están diseñados para purificar los ácidos nucleicos de una gama de tipos de muestras clínicas y forenses. Algunos de estos sistemas requieren algún procesamiento previo manual antes de cargar las muestras en el instrumento. Los sistemas de extracción de Innuprep (analytikJena, Itzehoe, DE), LabTurbo (Taigen, Taipei, TW), Xiril 150 (Xiril AG, Hombrechtikon, CH) y Quickgene (FujiFilm Corp., Tokyo, JP) requieren más gestión manual que los sistemas completamente robotizados antes mencionados.

**[0032]** Los sistemas más completamente automatizados se han utilizado para la detección tanto clínica como forense. Lo más notable es el sistema Cepheid (Sunnyvale, CA) GeneXpert que para *C. difficile* realiza la extracción de ADN y PCR a tiempo real procedente de una muestra de torunda fecal. Sin embargo, el costo tanto del equipo como de una sola prueba puede ser prohibitivamente alto para muchas organizaciones.

#### Uso de presión para preparar muestras

**[0033]** Existe un número de métodos que la presión del uso o de las diferencias de presión para mover líquidos entre compartimentos como parte del proceso de preparación de la muestra. Por ejemplo, los siguientes documentos describen métodos que utilizan la presión como parte del proceso de preparación de la muestra:

- GB2337261 discute la purificación de ácidos nucleicos de células enteras usando un filtro de membrana porosa bajo presión.
- El documento JP 2005095003 enseña un cartucho para separar y purificar ácidos nucleicos haciendo pasar la solución de muestra a través de una diferencia de presión.
- El documento JP 2005118020 muestra un cartucho que contiene un material poroso adsorbente de ácido nucleico que tiene al menos dos aberturas y un aparato para generar una diferencia de presión entre al menos dos aberturas.
- El documento US 20070269829 describe un instrumento de aislamiento de ácido nucleico que incluye un dispositivo de presurización y comprende porciones de recipiente primera y segunda que están conectadas a través de una fase sólida.
- El documento US 2009/0023904 muestra un cartucho que incluye un recipiente que tiene al menos dos aberturas y que contiene una fase sólida adsorbente de ácido nucleico. La diferencia de presión se aplica a través de la fase sólida.
- El documento US 5804684 describe el contacto de una muestra biológica con una matriz de unión a ácido nucleico (partículas de agarosa en suspensión líquida) que hace que el ácido nucleico se precipite; y se eluye desde la matriz.
- El documento US 2008/0275228 enseña la inyección de líquido en el cartucho para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos y pasar el líquido a través de una fase sólida adsorbente de ácido nucleico mediante una diferencia de presión.
- El documento US 2009/0023201 describe un casete de detección de ácido nucleico y compuestos orgánicos resistentes a la aglomeración solubles en agua.
- Los documentos WO 2004/005553 y WO 03/033740 ambos se refieren a bombas mecánicas para dirigir fluido a través de un soporte posible.

**[0034]** Una ventaja de tales métodos es que pueden evitar el uso de equipos tales como centrifugadoras en el proceso de preparación de la muestra. Por ejemplo, se puede usar presión para mover líquidos alrededor de un dispositivo para facilitar la preparación de la muestra. Sin embargo, una desventaja de tales métodos es que se requieren aún consumibles o bombas complicadas para procesar la muestra.

#### Resumen

**[0035]** La preparación de muestra representa un componente esencial de ensayos basados en NAAT. Dependiendo del tipo de muestra, el nivel de inhibidores y cualquier requerimiento para concentrar los ácidos nucleicos en la muestra, la preparación de la muestra puede representar la parte más onerosa y costosa de realizar un ensayo basado en NAAT.

Para que los beneficios de los ensayos basados en NAAT sean disfrutados por aquellos que no tienen acceso a equipo o personal especializado o a aquellos que no pueden costear sistemas automáticos costosos, existe la necesidad de métodos más sencillos que no sean costosos, puedan realizarse por usuarios no expertos, y que no requieran hardware sofisticado. Aunque existen métodos que eliminan la necesidad de equipos tales como robots, centrifugas o colectores de vacío para preparar muestras mediante el uso de presión para mover líquidos dentro de un dispositivo, tales métodos todavía están obstruidos con consumibles complicados o hardware para generar diferencias de presión. Además, los métodos que aprovechan los métodos físicos de bajo coste y de fácil acceso para efectuar la preparación de la muestra (en particular el calor) aún no se han aprovechado plenamente. Al ser la generación de calor moderado extremadamente fácil, un método de preparación de muestras que puede conducirse

por calor aun combinando químicas más sofisticadas asociadas con la preparación de muestras podría hacer que la preparación de muestras para ensayos basados en NAAT se logre más fácilmente a un menor coste y con hardware mucho menos complicado. Tal método de preparación de muestras podría permitir que los ensayos basados en NAAT se realicen en entornos más desafiantes, por ejemplo en clínicas pequeñas en contextos de bajos recursos.

5

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

[0036] Los inventores han descubierto que es posible eluir un líquido de un recipiente sellado mediante el calentamiento del recipiente a una temperatura que crea suficiente presión para eluir el líquido desde el recipiente. La invención proporciona así un método para hacer pasar una muestra líquida a través de una matriz sólida porosa, que comprende las etapas de sellar la muestra líquida dentro de un recipiente que comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente y elevar la temperatura para aumentar la presión dentro del recipiente, para hacer que el líquido pase a través de la matriz sólida porosa. Al pasar el líquido a través de la matriz sólida porosa, al menos parte del líquido puede retirarse del recipiente. Los métodos de la invención también permiten que el líquido sea transferido desde el recipiente a un segundo recipiente o a un recipiente.

10

15

[0037] El proceso de usar calor para pasar una muestra líquida a través de la matriz sólida porosa se denomina aquí como "elución de calor".

20

25

[0038] Se encontró ventajosamente que la presión suficiente se podría generar para pasar un líquido a través de una matriz sólida porosa de un recipiente a temperaturas de menos de 110°C, incluso con una variedad de diferentes tamaños de recipientes. Esto podría lograrse utilizando consumibles de plástico estándar a pesar de la presencia de una matriz sólida porosa en el recipiente que bloquea el flujo de líquido fuera del recipiente a temperatura ambiente. El hecho de que se utilicen tales condiciones de temperatura y presión suaves significa que los ácidos nucleicos no se dañan en el proceso ni existe peligro significativo de que el recipiente reciba suficiente presión para fallar o incluso explotar, ni se requieren dispositivos de calentamiento extremadamente calientes (>110°C). Por consiguiente, la invención proporciona métodos mejorados de preparación de muestras como se reivindica, en particular antes de realizar un ensayo basado en NAAT.

30

[0039] Una ventaja adicional de los métodos de la intervención es que el número de pasos (en particular las medidas de transferencia de líquido) que se requieren para llevar a cabo la muestra-preparación es mucho más reducida en comparación con otros métodos. Por ejemplo, en realizaciones que utilizan matrices sólidas porosas que unen a los inhibidores de NAAT más fuertemente que los ácidos nucleicos, el operador debe simplemente

35

- 1) transferir la muestra al primer recipiente,
- 2) realizar la elución por calor, y
- 3) utilizar los ácidos nucleicos eluidos en un ensayo de NAAT.

40

[0040] No se requieren transferencias líquidas adicionales. Además, esto se puede conseguir con sólo el uso del propio recipiente y un bloque de calentamiento. No se requieren centrifugadoras, bombas o sistemas de vacío adicionales. Esto reduce en gran medida la infraestructura de hardware necesaria para realizar la preparación de la muestra, así como la reducción de la complejidad del proceso de preparación de la muestra de tal manera que pueda ser fácilmente realizada por un operador no experto.

45

50

55

[0041] La temperatura se puede aumentar a temperaturas de hasta 110°C. Los inventores han encontrado que el calentamiento del recipiente sellado hasta 110°C crea presión suficiente para pasar la muestra líquida a través de la matriz sólida porosa, independientemente del tamaño del recipiente. La temperatura también puede aumentarse a temperaturas que están por debajo de 110°C, por ejemplo a una temperatura por debajo de 100°C, por debajo de 90°C, por debajo de 80°C o por debajo de 70°C. La temperatura mínima para pasar la muestra líquida a través de la matriz sólida porosa puede diferir entre diferentes recipientes y puede ser, por ejemplo, al menos 40°C, al menos 50°C o al menos 60°C. En general, la temperatura se incrementará a temperaturas por encima de la temperatura ambiente. La temperatura precisa puede determinarse fácilmente experimentalmente sometiendo un recipiente a temperaturas crecientes y estableciendo la temperatura a la cual la muestra líquida se hace pasar a través de la matriz sólida porosa. Cuando el calor empleado se utilizará también para lisar células o cápsidas virales, entonces la temperatura que es suficiente para lisar dichas células o cápsidas virales puede determinarse fácilmente experimentalmente. Sin embargo, en general sería necesaria una temperatura de al menos 90°C.

60

65

[0042] De acuerdo con la invención, la totalidad de la muestra líquida que se añadió al recipiente puede pasar a través de la matriz sólida porosa. 6. Los métodos como se reivindica, en los que al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% del volumen original de la muestra líquida se hace pasar a través de la matriz sólida porosa están también dentro del alcance de la invención. La muestra líquida que se hace pasar a través de la matriz sólida porosa puede tener una composición diferente en comparación con la composición de la muestra líquida que se añade al recipiente. Por ejemplo, la muestra eluida puede tener un contenido más bajo de inhibidores de NAAT en comparación con la muestra líquida que se añadió al recipiente.

[0043] La elución de calor puede ser practicada mediante la exposición del recipiente a un dispositivo de calentamiento que tiene la temperatura a la que se ha de calentar el recipiente. Alternativamente, también es posible aumentar gradualmente el calor en el recipiente hasta alcanzar la temperatura deseada. Además, el recipiente podría someterse a radiación tal como microondas o infrarrojo.

[0044] Al pasarse el líquido a través de la matriz sólida porosa por la presión creada por el calentamiento del recipiente, se entiende que la elución de calor de acuerdo con la invención puede realizarse en ausencia de otras fuerzas externas, tal como centrifugación o la aplicación de un vacío (por ejemplo a través de una bomba de vacío).

[0045] De acuerdo con la invención, se selló el recipiente. Las formas de sellar un recipiente son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el recipiente se puede sellar usando una tapa, o un tapón. Alternativamente, también es posible sellar el recipiente por fusión de los bordes de una abertura en el recipiente, por ejemplo calentando la abertura y presionando los bordes juntos. Esto puede ser particularmente relevante cuando el recipiente está hecho de plástico u otros materiales termoplásticos, ya que sería fácilmente posible calentar la abertura y fundir los bordes de la abertura mediante la aplicación de presión. Esto se puede lograr, por ejemplo, usando mandíbulas calentadas. Al requerir los métodos de elución por calor de la invención que el líquido pase a través de la matriz sólida porosa, se entiende que al menos parte o la totalidad de la matriz sólida porosa no será sellada, ya que de otro modo el líquido no podría pasar.

[0046] Los métodos de la invención pueden comprender una etapa adicional de añadir la muestra de líquido al recipiente.

#### El recipiente

[0047] En el contexto de esta memoria descriptiva, un "recipiente" es un recipiente que es adecuado para elución de calor.

[0048] En general, el recipiente comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente. La matriz sólida porosa puede disponerse de tal manera que está en comunicación con tanto el interior como el exterior del recipiente. Esto permite que la muestra de líquido se transfiera del interior hacia el exterior del recipiente cuando la muestra de líquido se hace pasar a través de la matriz sólida porosa.

[0049] La matriz sólida porosa puede ser una parte integral del recipiente y puede formar, por ejemplo, al menos parte de una pared del recipiente. También es posible que la matriz sólida porosa no forme una parte integral del recipiente. En estas realizaciones, el recipiente comprenderá una abertura y la matriz sólida porosa será posicionado respecto a la abertura de manera que la matriz sólida porosa esté en comunicación con el interior y el exterior del recipiente.

[0050] Un recipiente puede comprender una o más aberturas que son adecuadas para la adición de la muestra de líquido al recipiente. De acuerdo con los métodos de la invención, estas una o más aberturas deben sellarse con el fin de sellar la muestra de líquido dentro del recipiente.

[0051] Un "recipiente" es cualquier recipiente que es adecuado para contener un líquido, pero que no es adecuado para la elución de calor.

#### Matriz sólida porosa

[0052] El recipiente comprenderá por lo menos una matriz sólida porosa que puede retener el líquido dentro del recipiente a temperatura ambiente (*por ejemplo* a 18-22°C) pero permite que el líquido pase cuando la presión aumente en el envase debido al aumento de la temperatura.

[0053] En algunas realizaciones, el recipiente comprende un solo tipo de matriz porosa sólida. Los métodos de la invención también se pueden practicar con los envases que comprenden dos o más matrices sólidas porosas diferentes. Por ejemplo, el recipiente puede comprender una primera matriz sólida porosa y una segunda matriz sólida porosa. La primera matriz sólida porosa retiene preferiblemente el líquido en el recipiente antes de que se calienta el recipiente. La primera matriz sólida porosa puede ser un filtro. La segunda matriz sólida porosa puede ser una matriz que une inhibidores NAAT más fuertemente que los ácidos nucleicos, o que une ácidos nucleicos más fuertemente que los inhibidores de NAAT. La segunda matriz sólida porosa puede añadirse al recipiente antes de añadir el líquido y/o se puede mezclar previamente con el líquido y se añade al recipiente junto con la muestra de líquido. La segunda matriz sólida porosa puede estar en forma de perlas, por ejemplo perlas magnéticas.

[0054] La matriz sólida porosa puede ser un filtro. La matriz sólida porosa (en particular, la segunda matriz porosa sólida donde se utiliza más de un tipo de matriz) puede ser una matriz que une inhibidores NAAT más fuertemente que los ácidos nucleicos, o que une ácidos nucleicos más fuertemente que los inhibidores de NAAT. Se prefieren tales matrices sólidas porosas ya que los métodos de la invención pueden entonces o bien actuar para eliminar los inhibidores de amplificación de ácido nucleico a partir de ácidos nucleicos o bien, a la inversa, pueden actuar para

purificar y/o concentrar los ácidos nucleicos de una muestra.

**[0055]** A este respecto, las matrices sólidas porosas necesitan unir al menos un inhibidor de amplificación de ácido nucleico más fuertemente que los ácidos nucleicos o *viceversa* con el fin de ser adecuadas para su uso en los métodos de la invención. La cuestión de si una matriz sólida porosa particular une inhibidores de amplificación de ácido nucleico más (o menos) fuertemente que los ácidos nucleicos, se puede determinar mediante la puesta en contacto de una muestra que comprende inhibidores de la amplificación de ácidos nucleicos y ácidos nucleicos con la matriz y separando el líquido de la matriz. Si la disminución relativa de los inhibidores en comparación con la disminución relativa de los ácidos nucleicos en el líquido separado es más alta, la matriz une los inhibidores más fuertemente.

**[0056]** La matriz sólida porosa puede estar en la forma de una resina o en forma de perlas, por ejemplo perlas magnéticas.

#### Eliminación de los inhibidores de NAAT

**[0057]** Cuando la matriz sólida porosa une inhibidores NAAT más fuertemente que los ácidos nucleicos, los ácidos nucleicos deseados se eluyeron preferentemente de la matriz. Los inventores han descubierto sorprendentemente que pueden eliminar los inhibidores NAAT más eficientemente si

- i. la matriz sólida porosa se calienta con la muestra líquida en lugar de mezclarse a temperatura ambiente solo, y
- ii. la muestra líquida comprende ácidos nucleicos no unidos que están separadas de la matriz sólida porosa, mientras que la matriz y el líquido son todavía calientes.

La capacidad mejorada para eliminar los inhibidores NAAT sólo requiere calentamiento como se describe anteriormente y no se basa en la elución debido a la presión generada por el calor.

**[0058]** Por lo tanto, la invención proporciona un método para purificar ácidos nucleicos a partir de una muestra líquida que comprende ácidos nucleicos y los inhibidores de amplificación de ácido nucleico, en el que el método comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una matriz sólida porosa que une Inhibidores de amplificación de ácido nucleico más fuertemente que los ácidos nucleicos, en el que se aplica calor a la matriz sólida porosa y la muestra de líquido; y (b) separar la muestra líquida que comprende ácidos nucleicos no unidos de la matriz sólida porosa; donde la muestra de líquido se hace pasar a través de la matriz sólida porosa por un método que comprende las etapas de sellado de la muestra de líquido dentro de un recipiente que comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente y elevando la temperatura para aumentar la presión dentro del recipiente, de este modo para hacer que el líquido pase a través de la matriz sólida porosa.

**[0059]** En los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención, se entiende que el método se realizará bajo condiciones en las que al menos algunos de los inhibidores de NAAT se unen a la matriz sólida porosa mientras que al menos algunos de los ácidos nucleicos no se unirán a la matriz sólida porosa. Las condiciones adecuadas serán conocidas por expertos en la técnica.

**[0060]** Se puede aplicar calor en la etapa (b).

**[0061]** Se ha demostrado que la presión suave generada por elución de calor, en comparación con la centrifugación, significa que un menor número de inhibidores se retiran del material de fase matriz sólida porosa. De hecho, si la centrifugación se utiliza para pasar un líquido a través de la matriz sólida porosa, la muestra de ácido nucleico que se encuentra en el segundo recipiente contienen más inhibidores de amplificación de ácido nucleico que cuando se usa calor de elución. Además, la eliminación mejorada de inhibidores significa que el factor general de dilución de la muestra-preparación puede reducirse. Como tales, los métodos de la invención no requieren la dilución de la muestra original tanto como los métodos que no emplean principios i) y ii) anteriores.

**[0062]** La fuerza de la elución de presión es suficientemente alta como para causar cizallamiento significativo de ADN genómico que se ve con métodos columnas centrífugas. En consecuencia, es poco probable que la región diana en las moléculas de ADN de muestra pertinentes se interrumpirá por el cizallamiento y, por lo tanto, dificultará la detección. Preferiblemente, la muestra líquida se separa de la matriz sólida porosa, mientras que la muestra de líquido todavía tiene una temperatura de más de 60°C, más preferiblemente la temperatura es de más de 70°C, incluso más preferiblemente la temperatura es de más de 80°C, y lo más preferiblemente la temperatura es de más de 90°C. La muestra y la matriz en el paso (a) se pueden calentar durante 1 a 10 minutos.

**[0063]** Existen varios tipos de matrices sólidas porosas, incluyendo resinas de intercambio iónico, que se han demostrado funcionar como la matriz sólida porosa de acuerdo con este aspecto de la invención. Estas resinas son capaces de secuestrar uno o más inhibidores NAAT. Estas matrices sólidas porosas incluyen, pero no se limitan a copolímeros de estireno-divinilbenceno que contienen ácido iminodiacético (tal como Chelex 100-Bio-Rad), PVPP (polivinilpirrolidona), resinas a base de dimetilamina de poliestireno-base (Diaion WA30-Mitsubishi Chemical), copolímeros de divinilbenceno de estireno macroporosos con grupos funcionalizados de amina terciaria (Optipore

SD2, Dowex) y resinas de intercambio aniónico débil de base altamente porosa que consisten en una matriz de estireno-divinilbenceno con grupos funcionalizados de amina terciaria (familia de resinas SDVB). El carbón activado también puede utilizarse. Tales matrices se pueden utilizar individualmente o en combinación unos con otros. Se entiende que una persona experta en la técnica sería capaz de examinar matrices o mezclas de matrices que darán la mejor eliminación de los inhibidores de NAAT a partir de una matriz de muestra particular usando los métodos de la presente invención.

**[0064]** Ciertas matrices tales como Chelex 100, se conocen para quelar iones metálicos divalentes, se sabe que otros, tales como PVPP, se unen a compuestos de polifenol inhibidores. Se entiende que una persona experta en la técnica intentaría detectar matrices que tienen una mayor afinidad por inhibidores NAAT que para los ácidos nucleicos de tal manera que, tras la elución de calor, ácidos nucleicos se separan de los inhibidores de NAAT. Por ejemplo, para la detección de ADN *Clostridium difficile* a partir de heces humanas, los presentes inventores han encontrado que la siguiente combinación de resinas es particularmente eficaz para la eliminación de inhibidores de NAAT sin unirse a ADN *Clostridium difficile* de manera que este ADN se encuentra convenientemente en el segundo recipiente tras la elución de calor es 10% v/v Chelex 100, 25% v/v Optipore SD-2 y 25% v/v Diaion WA30 en 1,9 mL de tampón de reacción.

**[0065]** Los inhibidores de NAAT son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, hemo de la sangre, el ácido húmico se encuentra en plantas y el suelo, polifenoles, y ciertos metales divalentes, tales como calcio o colágeno.

**[0066]** Los ácidos nucleicos purificados de acuerdo con este aspecto de la invención se pueden añadir directamente a los reactivos NAAT para llevar a cabo un ensayo de NAAT. Los ácidos nucleicos eluidos también pueden procesarse adicionalmente antes de realizar un ensayo de NAAT. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden concentrarse y/o transferirse a un tampón diferente. Métodos de concentración adecuados son bien conocidos en la técnica.

#### Estrategias de captura de ácido nucleico

**[0067]** Cuando la matriz sólida porosa une a los ácidos nucleicos con más fuerza que los inhibidores de NAAT, los ácidos nucleicos son retenidos preferentemente en la matriz en el recipiente tras elución de calor y los inhibidores NAAT se pasan preferentemente a través de la matriz sólida porosa con la muestra de líquido. Por lo tanto la invención proporciona un método de purificación de ácidos nucleicos a partir de una muestra líquida usando un recipiente que comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente, en el que el método comprende las etapas de sellado de la muestra de líquido dentro del recipiente y elevar la temperatura para aumentar la presión dentro del recipiente, para causar de ese modo que el líquido pase a través de la matriz sólida porosa, en el que la matriz sólida porosa une a los ácidos nucleicos con más fuerza que los inhibidores de amplificación de ácido nucleico

**[0068]** Se entiende que, mediante el uso de tales matrices sólidas porosas, al menos algunos de los ácidos nucleicos serán retenidos por la matriz sólida porosa, mientras que la fase líquida, incluyendo al menos algunos de los inhibidores de NAAT, será en gran parte o completamente eluidos. Posteriormente, puede ser necesario procesar aún más los ácidos nucleicos que fueron retenidos por la matriz sólida porosa para hacerlos disponibles para una NAAT. Esto puede hacerse, por ejemplo, mediante la apertura del recipiente y adición de un tampón para eluir los ácidos nucleicos unidos de la matriz sólida porosa y la realización de elución de calor para eluir al menos algunos o la totalidad de los ácidos nucleicos unidos a partir del sólido poroso matriz en un recipiente. El recipiente contiene ácidos nucleicos eluidos que se pueden utilizar en un ensayo de NAAT.

**[0069]** Ejemplos de materiales de fase sólida que se pueden utilizar para este aspecto de la invención incluyen sílice (mediante el proceso de extracción a base de Boom descrito), perlas de carga-interruptor, perlas de oligo-captura y resinas/perlas de intercambio iónico.

**[0070]** Cuando se usan matrices sólidas porosas para capturar y/o concentrar los ácidos nucleicos, la invención reduce la complejidad del proceso de preparación de muestras. El hecho de que, tras la elución de calor, toda la muestra de líquido puede ser transferida a un segundo recipiente o un contenedor significa que los ácidos nucleicos pueden eluirse o eliminarse del recipiente con una contaminación mínima de la fase líquida original (que contiene inhibidores) que hace que más fácil el tratamiento posterior de la muestra. En algunos casos, un tampón de elución se puede añadir directamente a la matriz sólida porosa después de la etapa inicial de elución de calor con el fin de eluir los ácidos nucleicos unidos de la matriz de modo que los ácidos nucleicos se puedan añadir inmediatamente a reactivos NAAT. Se entiende que para algunos NAAT (en particular donde sistemas de informador bioluminiscentes se utilizan tal como se describe en el documento WO 2004/062338) la matriz sólida porosa con los ácidos nucleicos unidos se pueden transferir directamente en reactivos NAAT al ser tales métodos tolerantes a tal material en fase sólida.

**[0071]** Alternativamente, es posible llevar a cabo una segunda etapa de elución de calor para eluir al menos algunos de los ácidos nucleicos o la totalidad de los ácidos nucleicos a partir de la matriz sólida porosa. Esto permite convenientemente el posterior procesamiento de la muestra usando el mismo principio.

Muestra líquida

5 [0072] La muestra que se hace pasar a través de la matriz sólida porosa de acuerdo con la invención es una muestra líquida. El término "muestra de líquido" no excluye que la muestra pueda comprender algunos de los componentes sólidos, pero se entiende que la mayoría del volumen de la muestra (por ejemplo al menos 70%, al menos 85%, al menos 95% o al menos 99%) es líquido.

10 [0073] La muestra líquida puede derivarse de una muestra de partida que es una muestra líquida, tal como por ejemplo plasma u orina. La muestra de partida en la que NAAT puede llevarse a cabo y de la que la muestra líquida puede derivarse puede ser también una muestra sólida o semi-sólida. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra fecal, muestra de alimento o muestra de tejido. Para este tipo de muestras, la muestra sólida o semi-sólida se puede mezclar con un tampón adecuado antes de introducirse en el recipiente para proporcionar la muestra líquida. Alternativamente, la muestra sólida o semi-sólida se puede añadir a un recipiente que ha sido pre-cargado con un tampón adecuado que resulta en una muestra líquida. La muestra sólida o semi-sólida también se puede mezclar con un tampón adecuado antes de la introducción en el recipiente y después se mezcla posteriormente con un segundo tampón adecuado (o el mismo tampón) pre-cargado en el recipiente.

20 [0074] El material de partida puede ser también una muestra líquida que se puede añadir directamente al recipiente. La muestra líquida se puede mezclar con un tampón adecuado antes de introducirse en un recipiente de acuerdo con los métodos de la invención. Alternativamente, la muestra de líquido se puede añadir a un recipiente que ha sido pre-cargado con un tampón adecuado. La muestra líquida también se puede mezclar con un tampón adecuado antes de la introducción en el recipiente y después se mezcla posteriormente con un segundo tampón adecuado (o el mismo tampón), que fue pre-cargado en el recipiente.

25 [0075] En los métodos de la invención, la matriz sólida porosa puede ser pre-cargada en el recipiente o se introducen en el recipiente junto con o después de la muestra. La matriz sólida porosa puede estar en la forma de una resina o perlas, tales como perlas magnéticas.

30 [0076] La muestra de líquido puede comprender un tampón que maximiza la eficacia de la preparación de la muestra y/o la purificación de ácido nucleico. Los tampones adecuados pueden comprender componentes que pueden, por ejemplo, proteger los ácidos nucleicos de la degradación, facilitar la preparación de la muestra y/o hacer que la preparación de muestras sea compatible con los reactivos NAAT que se utilizan posteriormente. Por ejemplo, el tampón puede comprender EDTA o albúmina de suero bovino que son agentes de eliminación de inhibidor. También puede comprender uno o más de las proteasas que pueden facilitar la lisis de la muestra y que pueden inactivar las enzimas, tales como las nucleasas. También puede contener detergentes o sales (tales como KCl) que facilitan tanto la muestra-preparación como amplificación de ácido nucleico posterior. El tampón también puede estar configurado para mantener el pH de la muestra líquida a un pH que es útil para la preparación de la muestra, por ejemplo a un pH de 4,5 a 9,5, o un pH de aproximadamente 8.

40 Lisis de la muestra

45 [0077] El calor empleado en los métodos de la presente invención también puede funcionar para lisar muestras en el recipiente y así hacer disponibles los ácidos nucleicos para un ensayo basado en NAAT posterior. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden incluir una etapa de lisis de la muestra. Una etapa de lisis se prefiere particularmente cuando la muestra líquida comprende bacterias (tales como bacterias formadoras de esporas) y/o virus porque la lisis de bacterias o virus también pueden hacer que dichas bacterias o virus no infecciosas y por lo tanto representa una característica de seguridad conveniente de la presente invención. La eficacia de calor para lisar muestras puede aumentarse significativamente por la adición de otros reactivos y/o por ciertos materiales en fase sólida. Por ejemplo, EDTA y Chelex se han demostrado para facilitar la lisis de la membrana celular mediante el secuestro de los iones divalentes que estabilizan bicapas lipídicas (Brown, TA (1995) Gel cloning: an introduction 3<sup>a</sup> Ed. Chapman & Hall).

55 [0078] Los métodos de la invención también se pueden utilizar con muestras líquidas que han sido lisadas antes de añadir la muestra de líquido al recipiente. Esto es particularmente ventajoso para las muestras que son difíciles de lisar solo por calor. Por ejemplo, para ciertas bacterias formadoras de esporas, puede ser ventajoso utilizar primero un método mecánico para romper las esporas. Los medios para lisar muestras son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, sonificación, homogeneización mecánica (por ejemplo, mediante el uso de mezcladores, forzando a las células por aberturas restrictivas, o de mezcla violenta en presencia de diversas perlas), y la alteración química, por ejemplo, mediante el uso de detergentes (tales como sulfato de dodecilo sódico (SDS), opcionalmente en combinación con proteinasas tales como Proteinasa K) o agentes caotrópicos (tales como hidrocloreuro de guanidinio).

65 [0079] Cuando se añade el eluato del proceso de elución de calor directamente a los reactivos NAAT, puede ser importante que el líquido eluido se enfríe lo suficiente para que no afecte adversamente a los reactivos NAAT. Esto es especialmente importante cuando se utiliza NAAT isotérmicas en las que algunas de las enzimas utilizadas no

pueden tolerar temperaturas más altas. Por ejemplo, para algunos NAAT, tal como amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) y la amplificación por círculo rodante (RCA), la temperatura de la muestra debe estar por debajo de 50°C, o incluso por debajo de 40°C para que trabajen las NAAT. Para NAAT utilizando polimerasas de hebra desplazada tales como Bst polimerasa o polimerasas relacionadas, por ejemplo, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) o amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la temperatura de la muestra debe estar por debajo de 90°C, 80°C, 70°C o incluso 60°C para que trabajen las NAAT. Así, en algunos aspectos de la invención la muestra de líquido se enfría a temperaturas por debajo de 90°C, por debajo de 80°C, por debajo de 70°C, por debajo de 60°C, por debajo de 50°C o incluso por debajo de 40°C antes de que la muestra eluida se mezcle con reactivos de NAAT.

**[0080]** Después de elución de calor, la muestra líquida se puede eluir en un segundo recipiente o un contenedor, en el que el recipiente o contenedor están a sustancialmente la misma temperatura que el recipiente que se utilizó para elución de calor, tal que el líquido eluido sigue calentado después de elución de calor. El segundo recipiente o el contenedor también pueden estar a una temperatura más baja que el primer recipiente. Por ejemplo, la temperatura puede diferir hasta en 100°C, por ejemplo, cuando un recipiente se mantiene a 4°C para ayudar a preservar los ácidos nucleicos eluidos de la degradación.

**[0081]** El recipiente o el contenedor también puede enfriarse activamente tras la elución de calor.

#### Control de la elución

**[0082]** Cuando los métodos implican la lisis de la muestra en el recipiente, es importante que la muestra se caliente a una temperatura suficiente durante un tiempo suficiente para el proceso físico de la lisis de la muestra que se produzca. Del mismo modo, debe haber tiempo suficiente para que la muestra lisada interactúe con el material de fase sólida proporcionada antes de que ocurra la elución.

**[0083]** Como tal, los inventores se han dado cuenta de que puede ser necesario controlar la velocidad de elución de la muestra de líquido desde el recipiente de tal manera que la muestra de líquido pase una cantidad de tiempo suficiente en el recipiente a la temperatura requerida. Esto puede lograrse mediante la restricción del flujo de líquido desde el recipiente, que se puede hacer por una variedad de medios. Así, en algunos aspectos de la invención, el recipiente comprenderá un limitador de flujo que está configurado para reducir el flujo de líquido desde el recipiente a través de la matriz sólida porosa en comparación con un recipiente que no tiene el reductor de flujo. En particular, tales limitadores de flujo pueden reducir el flujo de líquido desde el recipiente a través de la matriz sólida porosa en comparación con un recipiente que no tiene el restrictor de flujo cuando el recipiente se calienta a una temperatura por encima de la temperatura ambiente (por ejemplo por encima de 40°C o por encima de 50°C). Los restrictores de flujo pueden actuar ya sea permitiendo el flujo constante pero limitada de flujo de líquido a través de la matriz sólida porosa cuando se aplica calor al recipiente. Ejemplos adecuados de dichos limitadores de flujo son filtros y fritas. El restrictor de flujo también puede sellar de forma reversible la matriz sólida porosa. En este aspecto de la invención, el sello se retirará antes de que la muestra de líquido se pueda eluir del recipiente. Esto puede lograrse, por ejemplo, por medio de válvulas que pueden ser accionadas por un sistema de control mecánico, magnético o eléctrico. El restrictor de flujo puede ser también una capa de material que se funde a una temperatura superior a la temperatura ambiente pero por debajo de 110°C, por ejemplo a una temperatura entre 45°C y 110°C., Entre 55°C y 110°C o entre 65°C y 110°C. Los materiales adecuados son polímeros termoplásticos o ceras (*es decir*, compuestos que se funden por encima de 45°C para dar un líquido de baja viscosidad), por ejemplo, cera de parafina.

#### Técnicas de amplificación de ácido nucleico

**[0084]** Los métodos de la invención se pueden usar para preparar las muestras para cualquier NAAT. Así, aunque la invención ha sido particularmente ejemplificada usando el método conocido como amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP);. Notomi et al. Nucleic Acid Research, 2000, 28; E63) en conjunción con un sistema informador bioluminiscente conocido como BART (Gandelman et al. Public Library of Science, noviembre de 2010, Volumen 5, número 11, e14155) es de entenderse que los procedimientos no están limitados a estas NAAT. Por ejemplo, los inventores han demostrado que las muestras de ácidos nucleicos preparados de acuerdo con la invención también se pueden utilizar en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es conocida por ser más sensible a los inhibidores que la lámpara. Los métodos de la invención también se pueden utilizar para preparar las muestras para otras NAAT, como Template Re-priming Amplification (TRA), Self Extending Amplification (SEA), Nucleic acid sequence based amplification (NASBA), strand displacement amplification (SDA) y S<sup>M</sup>art Amplification Process (SMAP).

#### Otros pasos de elución de calor

**[0085]** La elución de calor de acuerdo con la invención se puede repetir más de una vez, por ejemplo dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, etc. Cuando la elución de calor se realiza más de una vez, esto se puede hacer por aplicación del líquido al mismo recipiente que se usó en el primer paso de calor de elución. Esto puede ser necesario, por ejemplo, cuando el volumen total de la muestra de líquido supere el volumen del recipiente con el fin de purificar todos los ácidos nucleicos en la muestra líquida. También puede ser necesario cuando se desee lavar la

matriz sólida porosa después de que los ácidos nucleicos se han unido a la misma, o puede ser necesario aplicar un tampón de elución con el fin de eluir los ácidos nucleicos unidos de la matriz. En estos métodos contenedores o recipientes adicionales pueden ser utilizados cuando sean necesarios para recoger el líquido eluido.

5 **[0086]** Cuando la elución de calor se realice más de una vez, también puede ponerse en práctica utilizando más de un recipiente. Por ejemplo, el líquido desde un primer recipiente puede eluirse en un segundo recipiente. El segundo recipiente puede entonces sellarse y la temperatura se puede elevar para aumentar la presión dentro del recipiente, de ese modo para hacer que el líquido pase a través de la matriz sólida porosa. El líquido eluido del segundo  
10 recipiente puede entonces desecharse, recogerse en un recipiente o transferirse a un tercer recipiente. Cuando se utilizan dos, tres o más recipientes que se pueden calentar o bien simultáneamente, en tándem o en secuencia para mover la muestra de líquido de un recipiente a fin de automatizar una serie de procesos de preparación de muestras dentro de un solo consumible. Cuando los recipientes se calientan simultáneamente, es posible utilizar recipientes con diferente pared de espesor de manera que la muestra y las matrices en los recipientes alcancen la temperatura deseada en diferentes puntos temporales.

15 **[0087]** En algunos aspectos, la muestra de líquido eluido por elución de calor desde el recipiente (si esto es la primera, segunda, tercera o más elución de calor de un particular proceso de muestra-preparación) se pueden combinar directamente con reactivos NAAT dentro de una recipiente suministrado de tal manera que ningún paso de tratamiento de líquidos adicional (*por ejemplo*, se requiere una etapa de pipeteo) para transferir la muestra procesada a reactivos de NAAT.  
20

**[0088]** De esta manera, un solo aparato puede contemplarse que contiene dos para más recipientes mediante el cual un operador sólo tiene que introducir una muestra en un recipiente para llevar a cabo todo el proceso de preparación de muestras incluyendo la mezcla de la muestra procesada con reactivos de NAAT. Tal aparato tendría la ventaja significativa de que no requiere bombas complicadas y centrifugas para mover líquido desde un recipiente a otro: un sistema de calentamiento simple podría utilizarse.  
25

#### Aparatos

30 **[0089]** Como se ha discutido anteriormente, la invención es particularmente adecuada para la purificación de ácidos nucleicos en un ajuste automatizado utilizando los métodos de la invención. Por lo tanto, la invención proporciona aparatos como se reivindica que son adecuados para la purificación de ácidos nucleicos de acuerdo con los métodos de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un aparato para purificar ácidos nucleicos según los métodos de la invención, que comprende (a) un recipiente que comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente y medios para sellar el recipiente, y (b) un elemento de calentamiento configurado para calentar el recipiente a una temperatura de hasta 110°C, en el que el aparato está configurado para pasar líquido a través de la matriz sólida porosa por el calor. El aparato puede comprender además un segundo recipiente para recibir el líquido pasado a través de la matriz sólida porosa. Además, o alternativamente, también puede comprender un recipiente que comprende reactivos para la amplificación de ácido nucleico.  
35

40 **[0090]** Los aparatos de la invención permiten la purificación automatizada de ácidos nucleicos a partir de muestras que pueden facilitar en gran medida la preparación de muestras. En particular, en realizaciones en las que el aparato también contiene un recipiente que comprende reactivos para la amplificación de ácido nucleico, los aparatos de la invención tienen la ventaja de que el operador sólo tiene que añadir la muestra al aparato porque todas las etapas posteriores se pueden realizar automáticamente. Por lo tanto, una muestra se puede procesar y amplificar sin intervenciones manuales entre la adición de la muestra al recipiente y el registro de la salida de la amplificación en sí.  
45

**[0091]** El recipiente en el aparato puede comprender una matriz sólida porosa que une a los ácidos nucleicos con más fuerza que los inhibidores de amplificación de ácido nucleico, o que une inhibidores de amplificación de ácido nucleico con más fuerza que los ácidos nucleicos como se discutió en detalle anteriormente.  
50

**[0092]** El aparato puede comprender dos o más (dos, tres, cuatro, cinco, seis o más, por ejemplo) recipientes. Las matrices sólidas porosas pueden ser el mismo en todos los recipientes en el aparato. También pueden ser diferentes, lo cual puede ser ventajoso en realizaciones en las que la matriz captura inhibidores de NAAT porque entonces sería posible tener matrices que unen los inhibidores diferentes con diferentes puntos fuertes, que pueden mejorar la eliminación de los inhibidores. Cuando más de un recipiente esté presente en los aparatos de la invención, se prefiere que cada uno de los recipientes se pueda calentar a temperaturas de hasta 110°C por un elemento de calentamiento, porque entonces el líquido en estos otros recipientes puede transferirse por calor solo. El aparato puede comprender un elemento de calentamiento o más de un elemento de calentamiento. Los dos o más recipientes en el aparato pueden ser calentados a diferentes velocidades y/o a diferentes temperaturas. Cuando el aparato comprende más de un recipiente, o uno o más recipientes y un recipiente, los recipientes pueden estar colocados dentro del aparato de manera que el líquido eluido a partir de un recipiente gotee directamente en una abertura de un recipiente adicional o un vaso. También es posible transformar el líquido por una vía, tal como un tubo. Si el recipiente adicional se ha de utilizar para elución de calor de acuerdo con la invención, el tubo puede contener, por ejemplo, una válvula que permite que el recipiente se selle antes de que se calienta.  
55  
60  
65

[0093] De acuerdo con la invención, el líquido desde el recipiente se pasará a través de las matrices sólidas porosas de uno o más recipientes por el calor. De acuerdo con esto, se prefiere que los aparatos de la invención no comprendan una centrífuga o una bomba requerida para pasar el líquido a través de la matriz sólida porosa del recipiente.

[0094] Se prefiere que los aparatos de la invención comprendan un recipiente que comprende al menos algunos de los reactivos, o preferiblemente todos los reactivos, que son necesarios para NAAT. El recipiente se puede colocar dentro del aparato de tal manera que se añade el líquido eluido a partir de un recipiente directamente al recipiente que comprende la NAAT. Los aparatos de la invención son adecuados para el uso con todos NAAT, incluyendo, pero no limitado a PCR y LAMP. Los reactivos que son necesarios para la NAAT son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, uno o más cebadores, un tampón, una polimerasa y nucleótidos (tales como dNTPs).

#### General

[0095] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico  $x$  es opcional y significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ejemplo X + Y.

El término "un" o "una" significa "uno o más".

[0096] A menos que se indique específicamente, un proceso que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. De este modo los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Donde hay tres componentes a continuación, dos componentes se pueden combinar entre sí, y entonces la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

[0097] BART se refiere a un método para determinar la cantidad de ácido polinucleico de molde presente en una muestra en la que la presencia de fosfato inorgánico que se deriva de la reacción de amplificación se detecta y es indicativo de la cantidad de ácido polinucleico molde en la muestra.

[0098] A continuación se describirán diversos aspectos y realizaciones de la presente invención en más detalle a modo de ejemplo. Se apreciará que la modificación de detalle se puede hacer sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

#### Descripción de las figuras

##### [0099]

##### Figura 1

La Figura 1a muestra el principio de añadir una muestra líquida a un recipiente que contiene otra abertura sellada; sellando la abertura en el recipiente en el que se introduce el líquido; abriendo una salida al recipiente en el otro lado de algún tipo de filtro que resistirá el flujo de líquido fuera de este primer recipiente; colocando el primer recipiente dentro de un recipiente de recogida que puede recoger el eluato del recipiente; colocando el recipiente y el contenedor en un bloque de calentamiento y, posteriormente, teniendo líquido transferido desde el recipiente al contenedor.

La Figura 1b, como para 1a, pero con el recipiente que contiene un material en fase sólida que se une preferentemente a inhibidores NAAT en lugar de ácido nucleico. La solución de ácido nucleico se encuentra en el recipiente tras elución de calor.

La Figura 1c, como para 1b pero el material en fase sólida y la muestra se mezclan antes de añadirse al recipiente.

La Figura 1d, como para 1a, pero con el recipiente que contiene un material en fase sólida que se une preferentemente a los ácidos nucleicos en lugar de inhibidores NAAT. El ácido nucleico se puede inmovilizar sobre el material tras elución de calor de fase sólida dentro de la primera embarcación.

La Figura 1e, como para 1d, pero el material en fase sólida y la muestra se mezclan antes de añadirse al primer recipiente.

La Figura 1f, como por 1b o 1c, pero el ácido nucleico eluido posteriormente se concentra, utilizando un material de fase sólida diferente que se une preferentemente a un ácido. En este caso, el material en fase sólida consta de perlas paramagnéticas que se pueden sedimentar de una muestra usando un imán. Los ácidos nucleicos pueden liberarse a partir del material con un tampón de elución adecuado, de lo contrario, las perlas se pueden añadir directamente a un ensayo a base de NAAT.

##### Figura 2

Los datos que muestran elución de calor entre dos vasos más y menos un material en fase sólida en el primer recipiente como se describe en el Ejemplo 1.

**Figura 3**

Mostrando salidas BART-LAMP típicas para una serie de dilución de ácido nucleico diana. Usando la tecnología de BART, las muestras positivas dan un aumento y luego disminuyen en intensidad la luz con el tiempo. El tiempo para alcanzar el pico de luz es inversamente proporcional a la cantidad del ácido nucleico presente diana en la reacción de amplificación.

**Figura 4**

Comparación de IM-SDVB calentada y no calentada para la eliminación de inhibidor de enriquecimiento de chocolate ISO.

**Figura 5**

Utilización de 4°SDVB y 3°SDVB para eliminar inhibición NAAT del enriquecimiento de café. En comparación con el uso sin resina o con la resina IM-SDVB (a), las resinas de 4°SDVB (b) y 3°SDVB (c) se muestran extremadamente eficaces en la eliminación de la inhibición causada por café.

**Figura 6**

Eliminación de inhibición del ácido húmico por la mezcla de resina con el tiempo de calentamiento en el bloque caliente a 100°C (a); Perfil de temperatura con el tiempo de la mezcla de resina calentada en el bloque caliente a 100°C (b).

**Figura 7**

Perfil de temperatura con el tiempo de eluato de elución de calor a partir de un bloque caliente a 100°C.

**Figura 8**

Eliminación de la inhibición Xylan por elución de calor vs. dilución sólo en el tampón.

**Figura 9**

Modulación de tiempos de elución mediante el uso de diferentes fritas y el uso de cera.

**Figura 10**

Perfil de amplificación para reacciones *C. difficile* LAMP-BART que muestran una comparación entre muestra fecal positiva *C. difficile* extraída por A) elución de calor de una mezcla IM SDVB-tampón fecal a través de una columna de PVPP, B) elución hilada de una columna PVPP cargada con mezcla IM SDVB-tampón fecal hervida y C) clarificación hilada de una mezcla IM SDVB-tampón fecal hervida

**Figura 11** Perfil de intensidad de 1% de agarosa manchada por intercalador de UV visualizada que muestra un extracto fecal de elución de calor y un extracto fecal centrifugamente eluido.

**Figura 12** Perfil de amplificación para reacciones *C. difficile* LAMP-BART que muestran tras la extracción de una muestra fecal positiva *C. difficile* y una muestra negativa *C. difficile* usando elución de calor de una mezcla de resina patentada en una columna 8 ml Pierce y un tubo de recogida.

**Figura 13**

- (a) Detección *C. difficile* LAMP BART desde muestras de heces clínica positivas *C. difficile* por elución de calor contra los métodos dilutivos;
- (b) Perfil de control inhibidor LAMP BART desde muestras de heces clínica positivas *C. difficile* por elución de calor contra los métodos dilutivos.

**Figura 14**

Comparación de detección de ADN genómica *C. difficile* pre y post concentración por un método de perla magnética simplificada ChargeSwitch®.

**Figura 15**

Integración de la preparación y amplificación de muestras de múltiples vasos usando elución de calor

**Figura 16**

Comparación de detección de ADN genómica *C. difficil* con y sin realizar elución de calor con perlas magnéticas ChargeSwitch® incorporadas en el primer recipiente.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: El calor es suficiente para conducir eluato de recipiente contra una fuerza de resistencia utilizando consumibles de plástico estándar y matrices en fase sólida demostrando el principio de elución de calor.**

**[0100]** El calor dentro de la columna de la preparación de la muestra permite una acumulación de presión que permite la autoelución del lisado de la muestra a través de la base de la columna, y no requiere la asistencia de una centrífuga o jeringa para lograrlo (Figura 1). Esta característica se ejemplifica en una (a) pequeña escala de columna de 0,8 ml, así como (b) una columna más grande 8 ml.

(a) una columna de 0,8 ml (Pierce nº 89688) se llenó con una mezcla de resina patentada en tampón de reacción a un volumen final de 600  $\mu$ l, cuando el volumen de tampón excluido era 327,5  $\mu$ l. La tapa se cerró herméticamente y la pestaña de giro se rompió. La columna se colocó en un tubo de recogida de 2 ml y toda la columna y el tubo se colocó sobre un bloque de calentamiento a 95°C durante 10 min. Durante este tiempo la presión se había acumulado dentro de la columna y la mayoría del líquido gradualmente se condujo a través de la base de la columna en el tubo de recogida.

(b) una columna de 8 ml (Pierce # 89897) se llenó con una mezcla de resina patentada en tampón de reacción a un volumen final de 3,4 ml en el que el volumen de tampón excluido era de 1,96 mL. La tapa se cerró herméticamente y la pestaña de giro se rompió. La columna se colocó en un tubo de recogida de diámetro interno de 13,5 mm (Fisher nº FB51579) y toda la columna y el tubo se colocó sobre un bloque de calentamiento a medida que tiene una profundidad de inserción de 80 mm. Esto se calentó a 100°C durante 10 minutos. Durante este tiempo la presión se había acumulado dentro de la columna y todo el material eluido se condujo gradualmente a través de la base de la columna en el tubo de recogida.

**[0101]** Para confirmar que el calor moderado pueda eluir fase líquida a través del método de elución de calor en la presencia de una fase sólida y filtro de fase sólida que crea elución que resiste contrapresión, una solución se eluyó en la presencia de Chelex 100 (Bio-Rad). Específicamente, una suspensión al 10% de Chelex 100 en agua de calidad molecular se preparó de la siguiente manera: 1,096 g de Chelex se colocó en un vaso de precipitados de 50 ml y se añadió 10,96 ml de agua de grado molecular (Sigma). Esto se agitó en un agitador magnético tras adición de una pequeña pulga. 800  $\mu$ l se añadió a dos columnas Pierce 89868 pesadas previamente tras la retirada de sus pestañas de giro. Estas columnas se colocaron en un tubo de recogida de 2 ml y se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 minuto para eliminar el agua de la resina Chelex en la columna. 250  $\mu$ l de agua de grado molecular se añadió a estas dos columnas y otras dos columnas previamente pesadas. Éstas se colocaron en tubos con pestañas de giro pesadas previamente de 2 ml y se colocan en un bloque de calor de 100°C o se mantienen a temperatura ambiente durante 5 minutos. Al final de los 5 minutos, columnas y tubos de eluato se pesaron para determinar el volumen de eluido y el volumen de agua que queda en la columna. Ninguna de las columnas mantenidas solamente a temperatura ambiente eluyeron agua, mientras que las dos columnas con calefacción habían eluido con 198,5  $\mu$ l eluido de la columna calentada Chelex y 226,4  $\mu$ l de la columna sólo de agua (Figura 2).

### **Ejemplo 2: El sistema informador de BART**

**[0102]** El sistema informador de BART se ha explicado en detalle en el documento WO 2004/062338 y WO2006/010948. BART es un ejemplo de un sistema informador diseñado para NAAT isotérmica que da un único tipo de señal de una muestra, una señal bioluminiscente. BART utiliza la detección dependiente de luciferasa de la luciérnaga de pirofosfato inorgánico. Esto se produce en grandes cantidades cuando las secuencias diana "se detectan usando una NAAT. Como tales, diagnósticos moleculares se pueden lograr con BART mediante la simple medición de la luz emitida desde tubos cerrados, en un ensayo de fase homogénea (Figura 3). BART se demuestra con varios diferentes NAAT, que operan entre 50-63°C. El informador de BART es un medio particularmente eficaz para seguir la tasa de amplificación de una NAAT ya que la salida de luz representa una medición de la velocidad instantánea de amplificación (mientras que, *por ejemplo*, salidas fluorescentes muestran la acumulación de una señal y por lo tanto las mediciones tienen que ser diferenciadas para obtener las velocidades de amplificación).

**Ejemplo 3: Materiales de fase sólida que eliminan inhibidores NAAT se realizan mejor cuando se eluyen a temperatura más alta (que se realiza de forma natural con elución de calor).**

*i) Capacidad de la resina en fase sólida "3°SDVB" para eliminar inhibidores NAAT a diferentes temperaturas*

**[0103]** 20  $\mu$ l de una solución madre ácida húmica de 187,5  $\mu$ g/ml se añadió a tampón de reacción BART-LAMP (190mm bicina, pH 8,0) en dos conjuntos que contienen o bien 580  $\mu$ l de tampón sin resina 3°SDVB o bien 580  $\mu$ l de tampón con 3°SDVB a 20%. Un conjunto se mezcló en vórtice, después se calentó a 95°C durante 5 minutos, seguido de un segundo vórtice. El conjunto de control se sometió a vórtice y se dejó a temperatura ambiente durante este tiempo, entonces se agitó de nuevo con vórtice. 20  $\mu$ l de cada sobrenadante se utilizó para reconstituir una reacción de BART-LAMP liofilizada que contiene un número fijo ( $10^4$ ) de una molécula de ADN diana particular (denominada en este documento como 'control Inhibidor'). Los tiempos de los picos de reacciones duplicadas se compararon posteriormente. La presencia de inhibidores pueden ralentizar o abolir la amplificación, en cuyo caso las horas punta (el tiempo que tarda el sistema reportero de BART para dar el pico de luz característico) aumentarán o desaparecerán por completo respectivamente. Esto demostró que sin calor y sin resina los tiempos de reacción con ácido húmico eran  $59,7 \pm 0$  min. Estos mejoraron a  $57,0 \pm 0,5$  min en presencia de resina y mejoraron aún más significativamente con la resina calentada a  $38,4 \pm 2,1$  min.

ii) *Capacidad de la resina en fase sólida "IM-SDVB" para eliminar los complejos de inhibidores NAAT a diferentes temperaturas.*

5 [0104] El proceso de prueba de chocolate para los patógenos de alimentación implica la incubación de 25 g de  
 10 chocolate en 250 ml de un caldo de enriquecimiento que contiene agua de peptona tamponada con leche en polvo y  
 el colorante verde brillante. Después de la incubación se había encontrado que este caldo de enriquecimiento era  
 altamente inhibidor a NAAT; este caldo se denomina aquí como enriquecimiento de chocolate ISO. La identidad del  
 15 inhibidor es desconocida. Dos conjuntos de muestras de 20 µl de un enriquecimiento de chocolate ISO se añadieron  
 a 580 µl de tampón Tris 20 mM de pH 8,8 que contiene sulfato de amonio 10 mM, 0,15% de Triton X-100, 0,4 mg/ml  
 polivinilpirrolidona y 0,09% de azida de sodio con 10% (p/v) IM-SDVB (una resina de intercambio catiónico que  
 20 consiste en un copolímero de divinilbenceno de estireno con grupos funcionalizados de iminodiacetato.) en tubos de  
 centrífuga de 1,5 ml. Estos se sometieron a vórtice de pulso. Un conjunto de tubos de muestra de chocolate se  
 calentaron a 110°C en un bloque de calentamiento durante 5 minutos. El otro conjunto se mantuvo a temperatura  
 ambiente durante el mismo tiempo. Después de 5 minutos ambos conjuntos de tubos se agitaron en vórtice de  
 pulso, se dejaron enfriar y 20 µl de cada tubo utilizado para reconstituir reacciones BART-LAMP de control inhibidor  
 liofilizadas en triplicado en 200 µl de tiras de PCR. La Figura 4 muestra que el enriquecimiento de chocolate  
 calentado dio un tiempo pico medio de  $24,7 \pm 1,15$  min, que es 8,1 min más rápido que el tiempo pico medio de  
 $32,8 \pm 1,61$  min. El control de inhibidor en blanco se ejecutó simultáneamente y dio un tiempo pico de  $18,9 \pm 1,00$  min.  
 Por lo tanto, la calefacción del chocolate en IM-SDVB resultó en una reducción de la inhibición de BART-LAMP en  
 comparación con la no calefacción.

iii) *Capacidad de la resina en fase sólida "PVPP" para eliminar el ácido húmico NAAT-inhibidor a diferentes temperaturas.*

25 [0105] 200 µl de la suspensión de PVPP se pipeteó a tubos 200 µl que se centrifugaron para dar un lecho PVPP  
 denso y 100 µl del líquido exceso se eliminó. 100 µl de  $1,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ácido húmico se añadió a la parte superior del  
 lecho PVPP. La adición se mezcló en vórtice en todo el PVPP. Tres tubos se calentaron a 95°C durante 15 minutos  
 y tres tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Todos los tubos se agitaron con vórtice después  
 30 de 5 minutos y volvieron a la temperatura. 20 µl se llevó a tubos de PCR separados y las partículas se centrifugaron.  
 Parte del ácido húmico de temperatura ambiente sobre sobrenadante PVPP también se calentó a 95°C durante 15  
 min. 5 µl de cada uno se añadió a 15 µl reacciones de control de inhibidor BART-LAMP. Tiempo pico de control de  
 inhibidor para el ácido húmico en PVPP se calentó a 95°C, el ácido húmico en PVPP a temperatura ambiente y el  
 sobrenadante de esta última se calentó a 95°C fueron  $32,85 \pm 7,20$  minutos,  $47,63 \pm 8,17$  minutos y  $59,16 \pm 14,92$   
 35 minutos, respectivamente. Esto mostró que PVPP calentada eliminó más ácido húmico de PVPP a temperatura  
 ambiente y que el calentamiento del sobrenadante de ácido húmico a partir del extracto de PVPP a temperatura  
 ambiente no dio ningún alivio de inhibición adicional. En este estudio picos no inhibidos con agua estaban en  
 $23,11 \pm 3,31$  mins.

40 iv) *Capacidad de las resinas en fase sólida "4°SDVB" y "3°SDVB" para eliminar inhibidores NAAT complejos a diferentes temperaturas.*

[0106] Se puede demostrar que el café instantáneo contiene inhibidores de NAAT potentes, por lo que tanto el café  
 instantáneo representa un modelo inhibidor útil. Se añadió café instantáneo (1 g) a 10 ml de agua de peptona  
 45 tamponada y se incubó a 37°C durante 18 horas. 20 µl del enriquecimiento se añadió a tubos de 580 µl de tampón  
 de amplificación de BART-LAMP que no contiene resina, 10% IM-SDVB, 300 µl de 4°SDVB (una resina de  
 intercambio aniónico de base fuerte macroporosa de una matriz de estireno-divinilbenceno con grupos  
 funcionalizados de amina cuaternaria) o 300 µl de 3°SDVB (un copolímero de estireno-divinilbenceno macroporoso  
 50 con grupos funcionalizados de amina terciaria). Todos los tubos se agitaron con vórtice y se calentaron a 110°C  
 durante 5 min. Tubos calentados se agitaron en vórtice de pulso y se dejaron enfriar. 20 µl se añadió por duplicado  
 para cada condición para reconstituir reacciones BART-LAMP de control inhibidor liofilizado en triplicado en tiras de  
 PCR de 200 µl de PCR. El enriquecimiento de café en tampón sin resina, con IM-SDVB (figura 5a), 4°SDVB (figura  
 5b) y 3°SDVB (figura 5c) dio un tiempo promedio de pico de  $45,3 \pm 8,3$  min,  $37,8 \pm 3,8$  min,  $19,7 \pm 0,8$  min y  $22,4 \pm 1,5$   
 55 min, respectivamente. Así, tanto 4°SDVB como 3°SDVB han eliminado inhibidores del enriquecimiento de café, lo  
 que permite el control inhibidor de máximo de no más de 6 min más lento que un tiempo pico de control de  
 inhibidor de agua de  $17,1 \pm 0,0$  min, comparado con un retardo de 28 min para el enriquecimiento de café en tampón  
 solo.

v) *Dependencia de la temperatura de eliminación de inhibidor*

60 [0107] Nueve tubos de 2 ml se llenaron con una mezcla de resina particular (10% v/v Chelex 100, 25% v/v Optipore  
 SD-2 y 25% v/v Diaion WA30) en el tampón de reacción de BART-LAMP donde el volumen de tampón excluido era  
 633,2 µl. En cada uno de estos 21,8 µl de un  $187,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  madre de ácido húmico se añadieron y se mezcló en  
 vórtice. Cada tubo se colocó en un bloque de calentamiento a 100°C para los puntos de tiempo 0, 1,2, 3,4, 5, 8 y 10  
 65 min, tras lo cual fueron eliminados del bloque de calentamiento, y a continuación se sometieron a vórtice  
 inmediatamente y 200 µl del sobrenadante se retiró de las resinas. La temperatura en otro tubo también se controló  
 cada 30 seg con un termopar en toda la calefacción de 10 min. Dos controles adicionales eran de configuración de

655 µl de tampón solamente (control sin inhibidor) y 21,8 µl de ácido húmico en 633,3 µl (control inhibido). Estos se calentaron en el bloque de calentamiento durante 10 min. Los sobrenadantes de cada uno se utilizaron para reconstituir mezclas de reacción de control inhibidor liofilizado LAMP-BART por duplicado. Estos se realizaron a 60°C y los tiempos pico de las reacciones se compararon durante el curso del tiempo. Los datos en la figura 6a mostraron que hubo una tendencia de aumento de la eliminación inhibidora con el aumento de tiempo de calentamiento, y con la figura 6b esto se correlacionó con el aumento de la temperatura. Tras 5 min de calentamiento se demostró que se logró alivio de inhibición máximo, donde la temperatura registrada de la formulación de resina alcanzó 93,4°C. El tiempo máximo de control inhibidor se redujo de 43,2±0,5 min a 0 min de incubación a 19,7±0,5 min después de 10 min de calentamiento.

**[0108]** Un conjunto de tubos con la mezcla de resina patentada y ácido húmico se preparó también como controles sin calefacción y se incubó a temperatura ambiente. Después de los puntos de tiempo 0, 1, 2, 3,4, 5, 8 y 10 min, cada uno inmediatamente se agitaron con vórtice y 200 µl de sobrenadante se retiró de las resinas. Los sobrenadantes de cada uno se utilizaron para reconstituir mezclas de reacción de inhibidor de control de LAMP-BART liofilizado por duplicado. Estos se realizaron a 60°C y los tiempos pico de las reacciones se compararon durante el curso del tiempo. La temperatura medida de las resinas por un termopar era 22,7°C. En estos tubos el tiempo pico de control de inhibidor a 0 min de incubación era de 49,0±1,0 min. Incluso después de 10 min de incubación, el tiempo pico era de 44,2±2,7 min no mostrando ninguna reducción significativa en la inhibición con resinas no calentadas, y confirmando que las resinas calentadas fueron más eficaces en la eliminación de inhibidor.

*vi) Cinética de temperatura de elución de calor*

**[0109]** Una columna de 8 ml (Pierce nº 89897) se llenó con una mezcla de resina en particular ((10% v/v Chelex 100, 25% v/v Optipore SD-2 y 25% v/v Diaion WA30) en tampón de reacción BART-LAMP en el que el volumen de tampón excluido era 1,965 ml. La pestaña de giro se desprendió y el termopar se colocó en la punta de elución. La columna se coloca en un tubo de recogida de diámetro interno de 13,5 mm (Fisher nº FB51579) y toda la columna y el tubo se colocaron sobre un bloque de calentamiento a medida que tiene una profundidad de inserción de 80 mm. Esto se calentó a 100°C y la temperatura del eluato se controló después de 3 min, momento en el que comienza la elución, cada 30 segundos durante 10 min. Se confirmó que la temperatura óptima en correlación con eliminación inhibidora máxima (figuras 6a y 6b) se logró fácilmente durante el período de tiempo de calentamiento. La Figura 7 muestra que un tiempo de calentamiento de 8 min permitió un aumento de temperatura de eluato a > 93°C. De hecho, al estar la temperatura relacionada con la eliminación inhibidora, eliminación significativa inhibidora se estaría dando por 76°C que se traduce en al menos 3 min de calentamiento en este formato.

*vii) La eliminación del eluato de muestra a partir de resina caliente mostró mejor eliminación inhibidora que de estudio frío, en un calor y de mezcla.*

**[0110]** Una dilución de 1 en 5 de un extracto de una muestra de heces, que había sido caracterizado por contener una gran cantidad de inhibidores de NAAT, se realizó en tampón de reacción LAMP-BART. 50 µl (10 mg) se mezcló con tampón de 655 µl sólo como un control 'sin resina'. Otras cantidades de 50 µl se añadieron a seis tubos que contienen un cóctel de resina patentada del que el volumen excluido de tampón también era 655 µl. Cada uno se calentó a 95°C durante 10 min. Los tubos o bien (a) se mezclaron antes y después del calentamiento; (b) no se mezclaron; (c) se mezclaron antes del calentamiento; (d) se mezclaron después del calentamiento; (e) se mezclaron antes y después del calentamiento y el sobrenadante caliente se retiró antes de enfriarse; (f) se mezclaron antes del calentamiento y se dejaron enfriar después de calentarse y luego se mezclaron. 20 µl de cada sobrenadante se utilizó para reconstituir mezclas de reacción LAMP-BART de control inhibidor liofilizado por duplicado y se ejecutó a 60°C. Se compararon los tiempos pico de las reacciones. Sin resinas, la detección no era posible en el tiempo de ejecución 120 min. Con (b) y (c) no hubo tampoco detección que indica la mezcla inicial con la resina fría no tenía efecto de unión del inhibidor. Las reacciones de (a), (d) y (e) mostraron detección dentro de 22,4 a 28,8 min donde la eliminación de inhibidor eficaz se produjo mostrando la mezcla inmediata tras calentamiento con resina caliente era esencial para la eliminación de inhibidor. Si la muestra y las resinas se enfriaron a temperatura ambiente y se mezclaron, (f) la detección también falló dentro de 120 min.

#### **Ejemplo 4: Uso del método de elución de calor para eliminar los inhibidores de las muestras**

*i) La elución de calor se puede utilizar para eliminar el inhibidor NAAT Xylan*

**[0111]** 27,3 µl de un 60 µg/µl Xylan se añadió a 655 µl de tampón de reacción y se calentó en un bloque de calentamiento a 100°C durante 6 min. 81,8 µl de un 60 µg/µl Xylan madre se añadió a una columna que contiene una mezcla de resina patentada con un volumen excluido de 1,965 ml. La tapa se cerró herméticamente y la pestaña de giro se rompió. La columna se colocó en un tubo de recogida de diámetro interno 13,5 mm (Fisher nº FB51579) y la columna y el tubo se colocaron en un matraz cónico de agua hirviendo durante 6 min.

**[0112]** Los eluatos de cada uno fueron utilizados para reconstituir mezclas de reacción BART-LAMP de control inhibidor liofilizado por duplicado. Estos se realizaron a 60°C y los tiempos pico de las reacciones se compararon. La Figura 8 muestra que sin tratamiento con resina los tiempos de detección eran 39,5±2,1 min en presencia de xilano.

Sin embargo, los eluatos de columna dieron tiempos de detección de  $18,7 \pm 0,6$  min indicando la eliminación de inhibidor de xilano por las resinas en el mismo factor de dilución.

### Ejemplo 5: Control de elución

*i) Pequeñas fritas de tamaño de poro y alta temperatura de fusión de cera de parafina utilizada para modular elución*

**[0113]** Para la eliminación de inhibidor de muestra eficiente era necesario que la muestra se expusiera a las resinas de calefacción para una suficiencia de tiempo antes de la elución de la fase líquida. Como tal, es necesario controlar la velocidad de elución por algún medio.

**[0114]** La velocidad de elución se modula mediante el uso de una pequeña frita de polietileno de tamaño de poro y una alta temperatura de fusión de cera debajo de las resinas para constreñir el flujo de material eluido de la columna. El inicio de la elución durante el calentamiento se retrasó durante 3 min y se completó antes de los 10 min para asegurar una exposición suficiente de muestra a las resinas con calefacción, (Figura 9).

### Ejemplo 6: Calidad de ácidos nucleicos eluidos con elución de calor

*i) Elución de calor puede ser mejor que la centrifugación para la eliminación inhibidora: comparación entre elución hilada y la elución de presión en caliente de un extracto fecal por BART-LAMP*

**[0115]** 20% de IM-SDVB en 27 mM ditiotretol y 13,3 mM BICINE pH 5 se añadió a 250  $\mu$ l de un muestra diarreaica positiva *C. difficile* y se mezcló en vórtice. Volúmenes de 200  $\mu$ l de esta mezcla homogénea de vórtice se añadieron a una columna hilada de 800  $\mu$ l que contiene un lecho compacto de PVPP o a dos tubos de 1,5 mL. La columna PVPP que contiene la mezcla fecal IM SDVB-TDT-BICINE se tapó herméticamente, la pestaña de plástico en la parte inferior de la columna se eliminó para abrir la base de la columna, se colocó en un tubo de recogida de 1,5 ml y se calentó en un bloque caliente durante 15 min a 105°C (A). Esto resultó en eluato siendo elución de calor en el tubo de recogida. Los tubos de 1,5 ml que contienen muestras se calentaron simultáneamente durante 15 min a 105°C. Cuando se enfría, los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante de uno de los tubos se transfirió a una columna de centrifugación abierta en la parte inferior de 800  $\mu$ l que contiene un lecho compacto de PVPP en un tubo de recogida de 1,5 ml. Esta columna PVPP se eluyó mediante centrifugación a 8000 rpm durante 2 min en una microcentrífuga (B). El extracto del otro tubo de 1,5 ml se usó sin columna de PVPP (C). Volúmenes de 5 ml de cada extracto se añadieron por duplicado a volúmenes de reacción 15  $\mu$ l de reactivos de LAMP-BART *C. difficile* en los tubos de una placa de PCR. Estos se cubrieron con aceite y se colocaron en el instrumento de detección de amplificación de BART a 60°C. La Figura 10 muestra los tiempos pico para la muestra fecal lisada directamente en la columna de la PVPP era de  $28,28 \pm 0,75$  min, la lisis de calor en el tubo y se hace girar en la columna PVPP era  $28,28 \pm 2,26$  min y la lisis de calor de de la muestra fecal en tampón y centrifugación de los sólidos dio  $61,39 \pm 3,78$  min. Por lo tanto, para esta muestra fecal en particular, el calor de lisis de la muestra y el calor de elución de presión dentro de una columna PVPP era tan bueno como la lisis de la muestra en un tubo y la elución centrifugada del lisado en una columna de PVPP. El lisado centrifugado dio detección más lenta debido a los inhibidores todavía presentes en el lisado.

*ii) La elución de calor facilita la elución de ADN de alto peso molecular*

**[0116]** Una columna de 0,8 ml (Pierce nº 89688) se llenó con una resina patentada a un volumen seco final de 555  $\mu$ l abierto para la elución en un tubo de 1,5 mL. 333  $\mu$ l de una muestra fecal se añadió a otro tubo que contiene 20% IM-SDVB en tampón y se mezcla mediante agitación con vórtice. 200  $\mu$ l de esta mezcla se añadió a la columna de 0,8 mL, se tapó herméticamente y se eluyó a calor sentado en su tubo de 1,5 ml en un bloque caliente de 95°C durante 15 minutos. Después de la elución, el tubo se dejó enfriar y la columna se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 8000 x g durante 3 min. 15  $\mu$ l de eluatos tanto de calor como de centrifugación se ejecutó en un gel de agarosa al 1% que contenía una mancha intercalante después de la mezcla con 3  $\mu$ l de tampón de carga, e imagen de gel capturada en un transiluminador (figura 11). El perfil de intensidad de eluato de calor muestra que el ADN manchada es el peso molecular sustancialmente alto que permanece en el pozo del gel. La elución centrífuga posterior de la misma columna muestra la tinción de bajo peso molecular adicional. La centrifugación es conocida por causar el cizallamiento del ADN de alto peso molecular que resulta en fragmentos de bajo peso molecular y puede afectar a la detección de bajo número de copias a través de la rotura en el sitio diana para amplificación. La ausencia de cizallamiento de ADN es la ventaja de elución de extracción a presión de calor.

### Ejemplo 7: Demostración del principio de elución de calor

*i) Uso para la detección de *C. difficile* después de la extracción de muestras de heces*

**[0117]** Columnas de 8 ml (Pierce # 89897) se llenaron con una mezcla de resina patentada en tampón de reacción a un volumen final de 3,4 ml en el que el volumen de tampón excluido era 1,965 ml. Una muestra de cada una muestra fecal positiva y negativa *C. difficile* se muestreó utilizando una torunda flocada estéril micro ultrafina (Puritan nº 25-3318 1PN 50). El extremo de torunda se mezcló dentro de la mezcla de resina, el vástago de la torunda se rompió

de la columna y se cerró herméticamente. La pestaña de centrifugación se rompió y la columna se colocó en un tubo de recogida de diámetro interno 13,5 mm (Fisher nº FB51579) y toda la columna y el tubo se colocó sobre un bloque de calentamiento que tiene una profundidad de inserción de 80 mm. Esto se calentó a 100°C durante 10 min. Durante este tiempo la presión se había acumulado dentro de la columna y todo el material eluido es impulsado gradualmente a través de la base de la columna en el tubo de recogida. Los eluatos de cada uno se utilizaron para reconstituir mezclas de reacción LAMP-BART de control inhibidor liofilizado por duplicado. Estos se realizaron a 60°C y los tiempos pico de las reacciones comparadas. Esto dio un tiempo de detección para la muestra positiva *C. difficile* de 24,04±0,75 min mientras que la muestra negativa *C. difficile* no llegaron al pico (Figura 12), mostrando con ello que el método permite la detección exitosa de *C. difficile* a partir de las heces.

ii) *La elución de calor elimina inhibición fecal sin comprometer la detección, evitando la necesidad de dilución excesiva.*

**[0118]** Columnas de 6 x 8 ml (Pierce nº 89897) se llenaron con una mezcla de resina patentada en tampón de reacción, donde los volúmenes de tampón excluidos eran 1,965 ml. Seis muestras de heces clínicas positivas *C. difficile* confirmadas se examinaron mediante el método de presión de la columna de elución. 150 µl de una dilución de 1 en 5 de cada muestra clínica en tampón de reacción (30 mg) se añadieron a cada columna y se mezclaron. Las pestañas de giro se rompieron. Las columnas se colocaron entonces en tubos de recogida de diámetro interno de 13,5 mm (Fisher nº FB51579) y las columnas y tubos se colocaron en un bloque de calentamiento a medida que tenía una profundidad de inserción de 80 mm. Estos se calentaron a 100°C durante 10 minutos y los eluatos se enfriaron a temperatura ambiente. 20 µl de los eluatos se utilizaron para reconstituir *C. difficile* liofilizado y el reactivo LAMP-BART de inhibidor de control.

**[0119]** Las seis muestras de heces también se diluyeron a los niveles en el orden de los utilizados en otras pruebas comerciales disponibles de *C. difficile*. Estos se prepararon en tampón de reacción a 1 en 200, 1 en 500 y 1 en 700 en volúmenes finales de 600 µl, se mezcló en vórtice y se calentó en tubos de 2 ml en un bloque de calentamiento fijado a 100°C durante 10 min. Los tubos se mezclan y después 20 µl de los lisados se utilizaron para reconstituir *C. difficile* liofilizado y el reactivo inhibidor de control LAMP-BART. Las reacciones se realizaron a 60°C durante 90 min en el hardware de detección BART. Las muestras A001 y A004 tenían una baja carga de *C. difficile*, confirmada por valores altos de Ct en el método de PCR utilizado por el Laboratorio de Salud Pública. La extracción por la columna de presión había permitido la detección de todas las repeticiones, incluyendo estas dos muestras difíciles donde los métodos dilutivos entre dilución de 200x y 700x mostraron un compromiso en la detección. Tiempos pico *C. difficile* LAMP-BART para los métodos se compararon en la figura 13a. El método de elución de calor requiere dilución de no más de 1 en 70 en la mezcla de resina para eliminar suficientemente la inhibición fecal.

**[0120]** La muestra de A001 eran heces sólidas con una alta carga inhibitoria y con el nivel más bajo *C. difficile* en el conjunto. Esta muestra se detecta con éxito por el método de elución de calor, donde la detección en 1 en 200 se comprometió y 1 en 500 y 1 en 700 completamente fracasaron debido a la dilución excesiva. La Figura 13b muestra para esta muestra, el control inhibidor a 1 en 200 mostró más inhibición que el eluato de la columna (diluido a 1 en 70). De hecho, era necesario diluir la muestra 1 en 500 para aliviar la inhibición. En términos de eliminación de la inhibición, la columna de elución de calor con las resinas era más eficaz que una dilución de 200 veces, como se ve por las tendencias de las muestras más inhibitorias A001 y A005.

iii) *Detección de norovirus tras extracción de presión de calor*

**[0121]** 50 µl de una muestra diarreica positiva Norovirus GII-4 se añadió a 150 µl de 20% de IM-SDVB en 20 mM MES, 40 mM DTT en un tubo con tapón de giro 1,5 ml. Esto se mezcló, se tapó y se colocó en un bloque caliente a 95°C durante 10 min y después se aplicó a hielo durante 2 min y luego se centrifugó a 17.000 g durante 5 min. 100 µl del sobrenadante se añadió a un lecho PVPP compactado en un tubo 800 µl y se centrifugó a elución a 8000 x g durante 2 min. Volúmenes de 5 µl se añadió a partir del extracto por duplicado a volúmenes de reacción de 15 µl de reactivo de transcriptasa inversa LAMP-BART norovirus GII-4 en los tubos de una placa de PCR junto con 1 µl de la misma muestra fecal extraída previamente usando tecnología de pluma. Estos se cubrieron con aceite y se colocaron en instrumento de detección de amplificación BART a 60°C. Los tiempos de pico para la muestra fecal se extrae por lisis de calor IM SDVB-MES-TDT seguido por purificación de columna del PVPP era 50,44±7,59 min. Esto se comparó a 43,46±0,76 min para 1 µl de la muestra previamente extraída por método Boom. Esto demostró que la ARN de Norovirus podría extraerse con un método que sería compatible con elución de calor.

#### **Ejemplo 8: Concentración de ácido nucleico del segundo recipiente tras la elución de calor**

i) *Elución post-calor, los ácidos nucleicos pueden concentrarse adicionalmente.*

**[0122]** Para aplicaciones de bajo número de copias, se demostró que la concentración de niveles de ADN genómicos *C. difficile* eran posibles cuando se enriqueció en tampón de reacción es decir, la misma composición de reactivo como el eluato. Las diluciones de ADN genómico *C. difficile* se prepararon a 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10 y 0 copias por 20 µl en tampón de reacción. 20 µl de cada dilución se utilizó para reconstituir mezclas de reacción LAMP-BART *C. difficile* liofilizadas por duplicado y funcionar a 60°C.

[0123] Cada dilución también se concentró mediante la adopción de 800 µl de los picos y la mezcla con 5 µl de perlas magnéticas ChargeSwitch® y 160 µl del tampón de unión kit (Invitrogen) durante 1 min. El sobrenadante se eliminó por decantación de las perlas en una rejilla magnética. Las perlas fueron re suspendidas en 80 µl de tampón de reacción y 20 µl de la suspensión cruda, incluyendo perlas que se utilizaron para reconstruir mezclas de reacción *C. difficile* BART-LAMP liofilizadas por duplicado y funcionan a 60°C.

[0124] La Figura 14 muestra que la concentración mejoraron los tiempos de detección de las copias  $10^3$  y  $10^2/20$  µl niveles de 3,2 a 4,8 min, y se permitieron de forma reproducible en la detección de las dos repeticiones en las 10 copias/20 µl nivel antes de 52,3 min, donde se detectaron solamente 1 de 2 repeticiones sin concentración.

ii) *Concentración de C. difficile a partir de heces positivas con un método de perla magnética simplificada ChargeSwitch® tras elución de calor*

[0125] Heces positivas *C. difficile* (1 en 5 en tampón de reacción) se diluyó 1 en 10 con heces negativas (preparadas 1 en 5 en tampón de reacción). 150 µl (30 mg de heces) de la dilución se aplicó a una columna de 8 ml (Pierce nº 89897) que contiene una mezcla de resina particular (10% v/v Chelex 100, 25% v/v Optipore SD-2 y 25% v/v Diaion WA30) en tampón de reacción BART-LAMP y se mezclaron a mano. El volumen de tampón excluido era 1,965 ml. La tapa se cerró herméticamente y la pestaña de giro se rompió. La columna se colocó en un tubo de 13,5 mm de diámetro interno de recogida (Fisher nº FB51579) y toda la columna y el tubo se colocaron sobre un bloque de calentamiento a medida. Esto se calentó a 100°C durante 10 min. 20 µl del eluato recogido se utilizó para volver a constituir reacciones LAMP-BART *C. difficile* liofilizadas en duplicado.

[0126] 800 µl del eluato también se concentró por mezcla con 5 µl de perlas magnéticas ChargeSwitch® y 160 µl del tampón de unión kit (Invitrogen) durante 1 min. El sobrenadante se eliminó por decantación de las perlas en una rejilla magnética. Las perlas se resuspendieron en 80 µl de tampón de reacción y 20 µl de la suspensión en bruto, incluyendo perlas que se utilizaron para reconstituir mezclas de reacción LAMP-BART *C. Difficile* liofilizadas por duplicado.

[0127] Las reacciones LAMP-BART se realizaron a 60°C en el instrumento de detección de BART. La concentración del eluato mejoró el tiempo de detección de  $27,2 \pm 0,5$  min (no concentrado) a  $19,2 \pm 0$  min (tras concentración).

iii) *Comparación de detección de ADN genómico C. difficile con y sin realizar elución de calor con perlas magnéticas ChargeSwitch® incorporadas en el primer recipiente.*

[0128] 20µl de ADN genómico *C. difficile* (103 copias por 20 µl) madre fue añadido a 1,98ml de tampón de bicina. 200 µl de esto se utiliza para hacer diluciones en serie con tampón de 1,8 ml de tampón de BICINE en 102 y 101 copias por 20 µl. Las diluciones ADN<sub>g</sub> se trataron de la siguiente manera:

Conjunto 1: No hay tratamiento. 20 µl se utilizó para reconstituir directamente ensayos de LAMP BART *C difficile*.  
 Conjunto 2: 400 µl de dilución ADN<sub>g</sub> *C. difficile* se añadió a una columna de 1,5 ml elución de calor con una frita de 2,7 mm con filtro de vidrio adicional (G/FD FD nº 1823-025 papel, Whatman) con 5 µl de perlas Charge Switch y 80 µl de tampón de unión. Esto se mezcló mediante pipeteo. La tapa columna fue asegurada herméticamente y se colocó en el bloque de calentamiento (con un tubo de recogida de 2 mL) a 100°C para 6min. Después de la elución, el material GF/D con las perlas capturadas se transfiere directamente a 40 µl de ensayo de LAMP BART *C difficile* reconstituido. Las condiciones con concentración de elución de calor y perla magnética ayudaron para detectar 1 log menor en serie de dilución en comparación con ninguna elución de calor, por lo que demuestra que la elución de calor se puede utilizar en conjunción con los métodos de perlas de captura para concentrar los ácidos nucleicos en el recipiente de elución de calor (Figura 16).

#### **Ejemplo 9: Integración de preparación de muestra de recipientes múltiples y amplificación usando elución de calor**

[0129] El principio de elución de calor se puede aplicar para combinar dos o más recipientes asociados que realizan una función diferente para la preparación de la muestra. Un sólo bloque de calentamiento podría utilizarse para alojar tal asociación de recipientes, o un número de bloques de calentamiento podría utilizarse cuando la sincronización y la velocidad de calentamiento y la temperatura final del bloque de calentamiento está diseñada para conducir la muestra de una manera coherente a través de los recipientes.

[0130] Además, un recipiente podría contener reactivos NAAT tal que la combinación de los recipientes y el recipiente permite la adición directa de muestra procesada a reactivos NAAT. Como tal, diseño adecuado de bloques de calor, una vez que se añade la muestra al primer recipiente, el método de elución de calor podría realizar todas las etapas de preparación de la muestra y permitir la adición de muestra para reactivos NAAT y permitiendo que continuara una amplificación adicional (Figura 15).

#### **Ejemplo 10: Elución de calor puede proporcionar muestras para PCR**

*Uso de lisado en la detección de PCR*

5 **[0131]** Una columna de 8 ml (Pierce nº 89897) se llenó con una mezcla de resina patentada en tampón de reacción a un volumen final de 3,4 ml en el que el volumen de tampón excluido era 1,965 ml. Una muestra fecal *C. difficile* se muestreó utilizando una torunda ultrafina micro estéril flocada (Puritan nº 25-3318 1PN 50). El extremo de la torunda se mezcló dentro de la mezcla de resina, el vástago de la torunda se partió y la columna se cerró. La columna se mezcló a mano y se colocó sobre un bloque de calentamiento a medida que tiene una profundidad de inserción de 80 mm. Esta se calentó a 100°C durante 10 min. La columna se dejó enfriar y el lisado se retiró de la parte superior de la columna. Una mezcla de reacción *C. difficile* en tiempo real de la de PCR se preparó usando el IQ Supermix (Bio-Rad nº 170 8862). 4,5 µl de lisado se añadió a las reacciones de PCR por duplicado y se ejecutó en ABI PRISM-7000 junto con una serie de dilución de ADN genómica *C. difficile* y se amplificó después de una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min por 50 ciclos de 94°C, 57°C y 72°C con cada uno en 30 segundos. El lisado dio un valor Ct de 29, lo que correspondía a un número de copias de  $1,18 \times 10^4$  cuando se calculó a partir de la curva de calibración, indicando que el lisado de la columna también se puede utilizar para detección PCR en tiempo real.

20

25

30

35

40

45

50

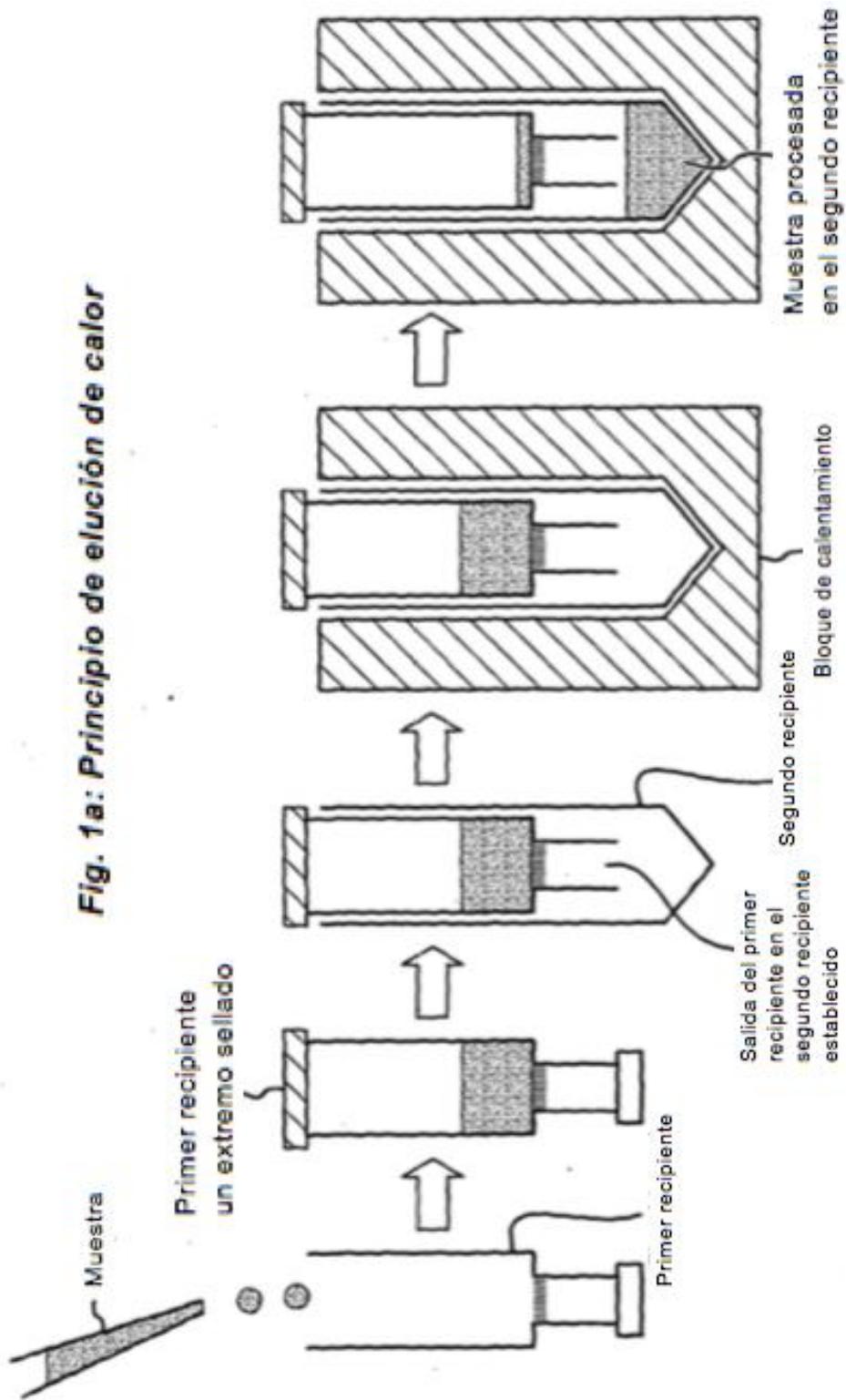
55

60

65

**Reivindicaciones**

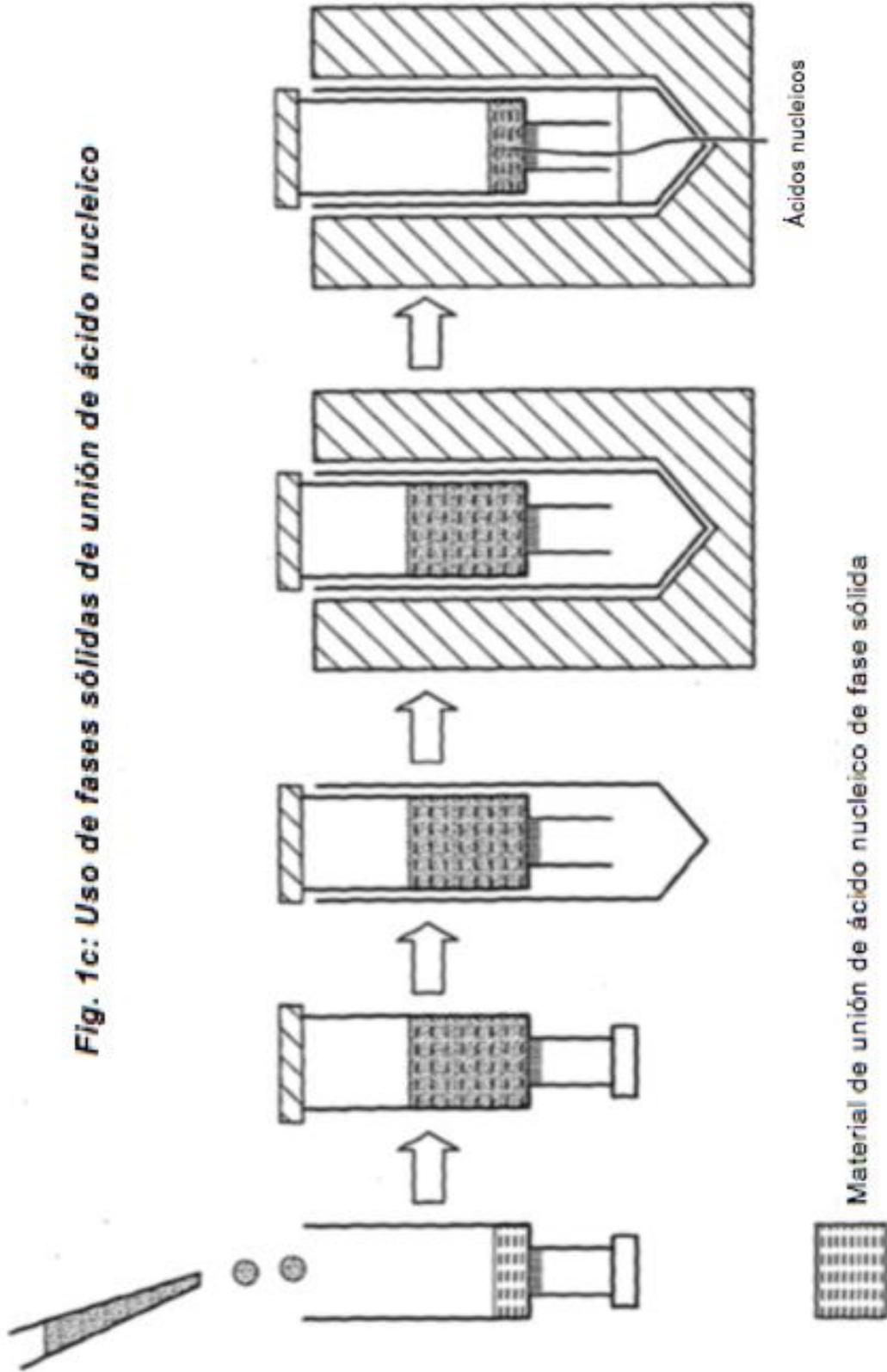
- 5      **1.** Un método para hacer pasar una muestra de líquido a través de una matriz sólida porosa, que comprende las etapas de sellado de la muestra de líquido dentro de un recipiente que comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente y elevando la temperatura para aumentar la presión dentro del recipiente, causando con ello que el líquido pase a través de la matriz sólida porosa.
- 10     **2.** El método de la reivindicación 1, en el que el recipiente comprende dos o más diferentes matrices porosas sólidas.
- 3.** El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra de líquido comprende ácidos nucleicos e inhibidores de amplificación de ácido nucleico.
- 15     **4.** El método de la reivindicación 3, caracterizado porque el recipiente comprende una matriz sólida porosa que une ácidos nucleicos más fuertemente que los inhibidores de amplificación de ácido nucleico.
- 5.** El método de la reivindicación 3, caracterizado porque el recipiente comprende una matriz sólida porosa que une inhibidores de amplificación de ácido nucleico más fuertemente que los ácidos nucleicos.
- 20     **6.** Un método para la purificación de ácidos nucleicos a partir de una muestra líquida que comprende ácidos nucleicos e inhibidores de amplificación de ácido nucleico, en el que el método comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con una matriz sólida porosa que une inhibidores de amplificación de ácido nucleico más fuertemente que ácidos nucleicos, aplicándose calor a la matriz sólida porosa y la muestra de líquido; y (b) separar la muestra líquida que comprende ácidos nucleicos no unidos de la matriz sólida porosa; haciéndose pasar la muestra de líquido a través de la matriz sólida porosa por un método que comprende las etapas de sellado de la muestra de líquido dentro de un recipiente que comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente y elevando la temperatura para aumentar la presión dentro del recipiente, causando con ello que el líquido pase a través de la matriz sólida porosa.
- 25     **7.** El método de la reivindicación 6, en el que se aplica calor a la muestra en la etapa (b).
- 8.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el recipiente comprende un restrictor de flujo que se configura para reducir el flujo de líquido desde el recipiente a través de la matriz sólida porosa en comparación con un recipiente que no tiene el restrictor de caudal.
- 30     **9.** El método de la reivindicación 8, en el que el restrictor de flujo es
- 40         a) un filtro, una frita, o una válvula; o  
           b) una capa de material que se funde a una temperatura entre 45°C y 110°C.
- 10.** El método de la reivindicación 9 (b) en el que la capa de material es una cera.
- 45     **11.** El método de cualquier reivindicación anterior, comprendiendo además un paso de lisis de la muestra.
- 12.** Un aparato para la purificación de ácidos nucleicos de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-11, que comprende
- 50         a) un recipiente que comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente y medios para sellar el recipiente, y  
           b) un elemento de calentamiento configurado para calentar el recipiente a una temperatura de hasta 110°C; en el que el aparato está configurado para pasar líquido a través de la matriz sólida porosa por el calor.
- 55     **13.** El aparato de la reivindicación 12, en el que el aparato comprende además un segundo recipiente para recibir líquido pasado a través de la matriz sólida porosa.
- 14.** El aparato de la reivindicación 12 o 13, en el que el aparato comprende además un recipiente que comprende recipientes para la amplificación de ácido nucleico.
- 60     **15.** El uso de un aparato para purificar los ácidos nucleicos de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-11, en el que el aparato comprende:
- 65         a) un recipiente que comprende una matriz sólida porosa como al menos una parte del recipiente y medios para sellar el recipiente, y  
           b) un elemento de calentamiento configurado para calentar el recipiente a una temperatura de hasta 110°C.

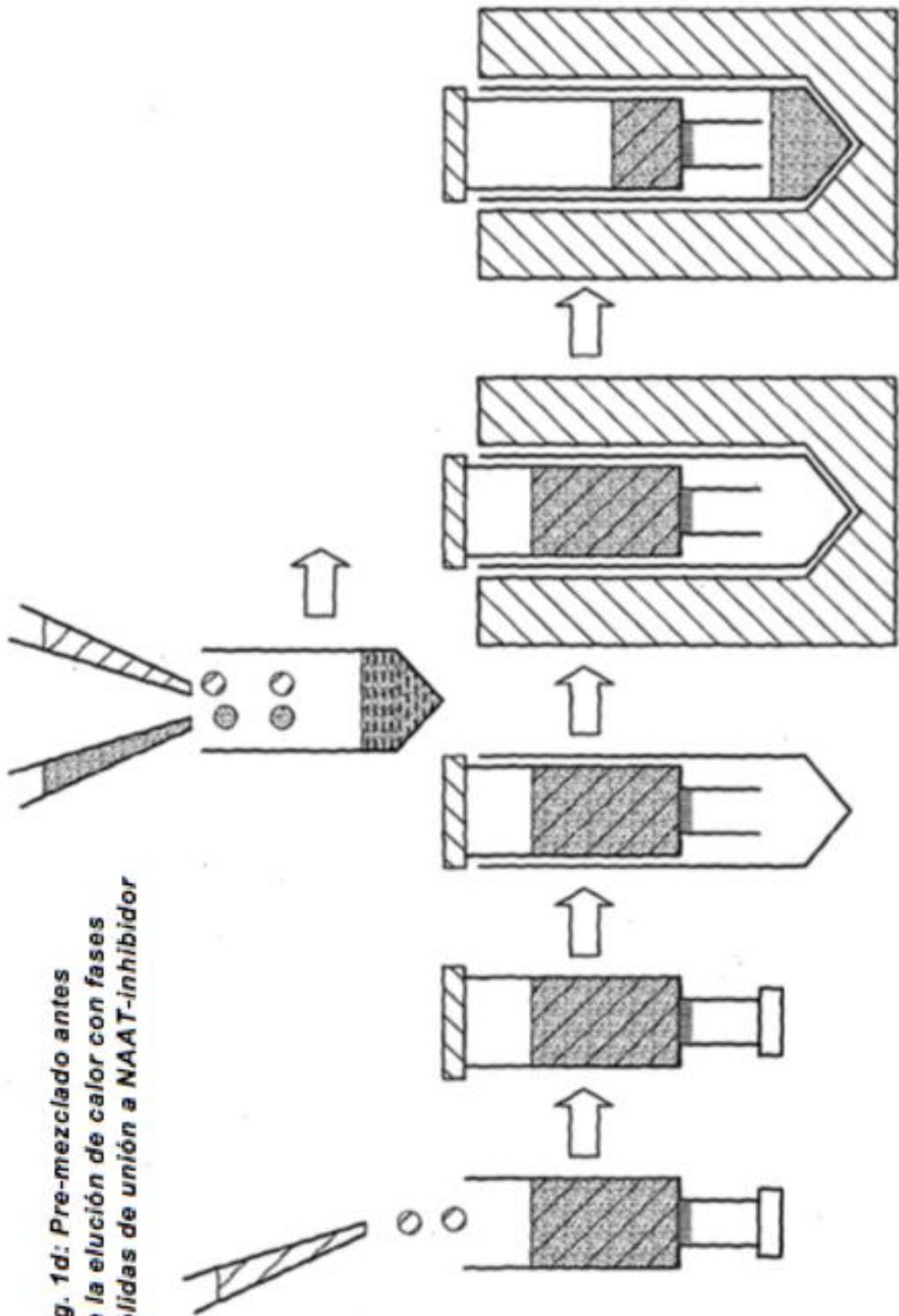


**Fig. 1a: Principio de elución de calor**



*Fig. 1c: Uso de fases sólidas de unión de ácido nucleico*





**Fig. 1d: Pre-mezclado antes de la elución de calor con fases sólidas de unión a NAAAT-inhibidor**

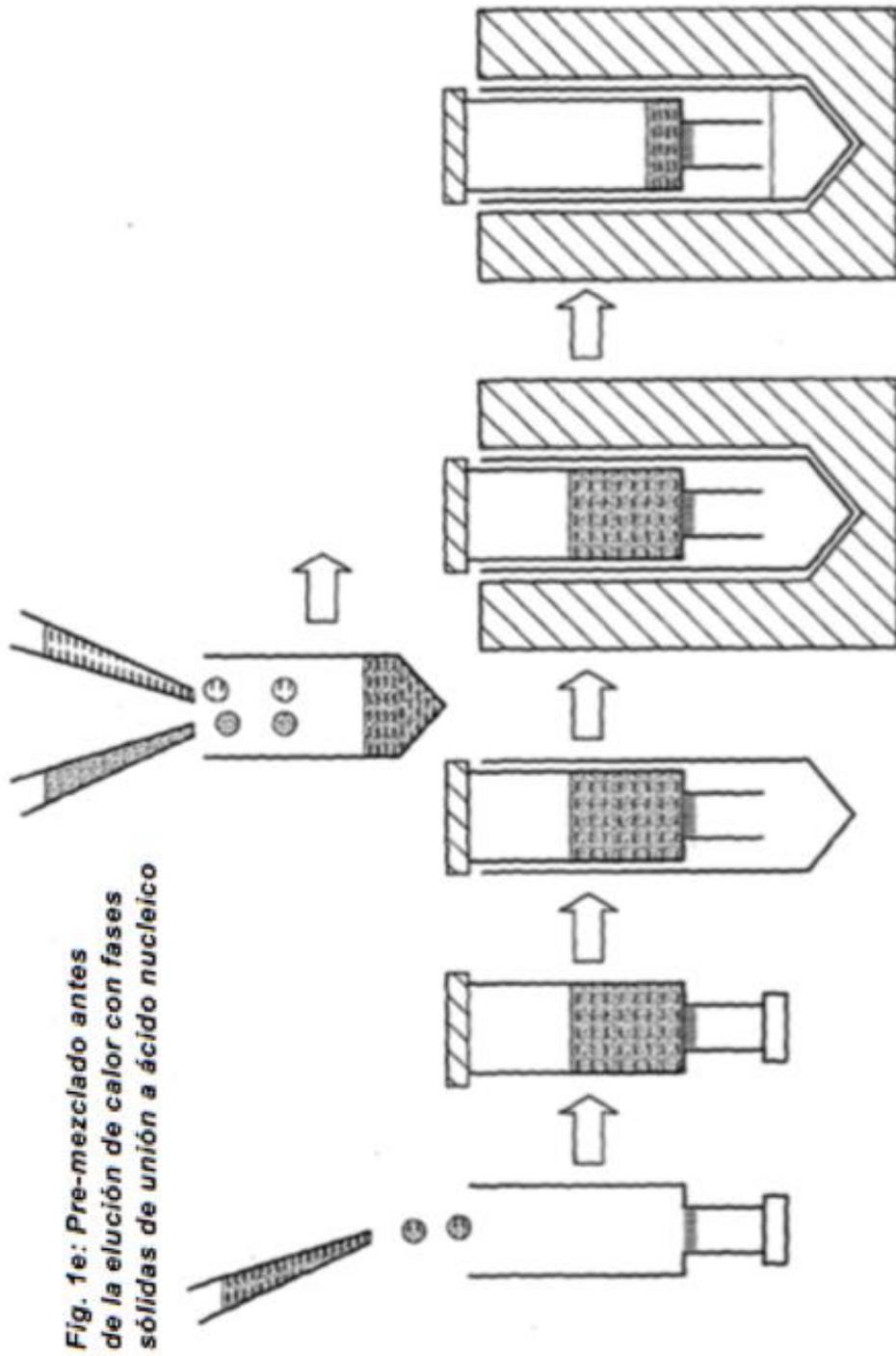
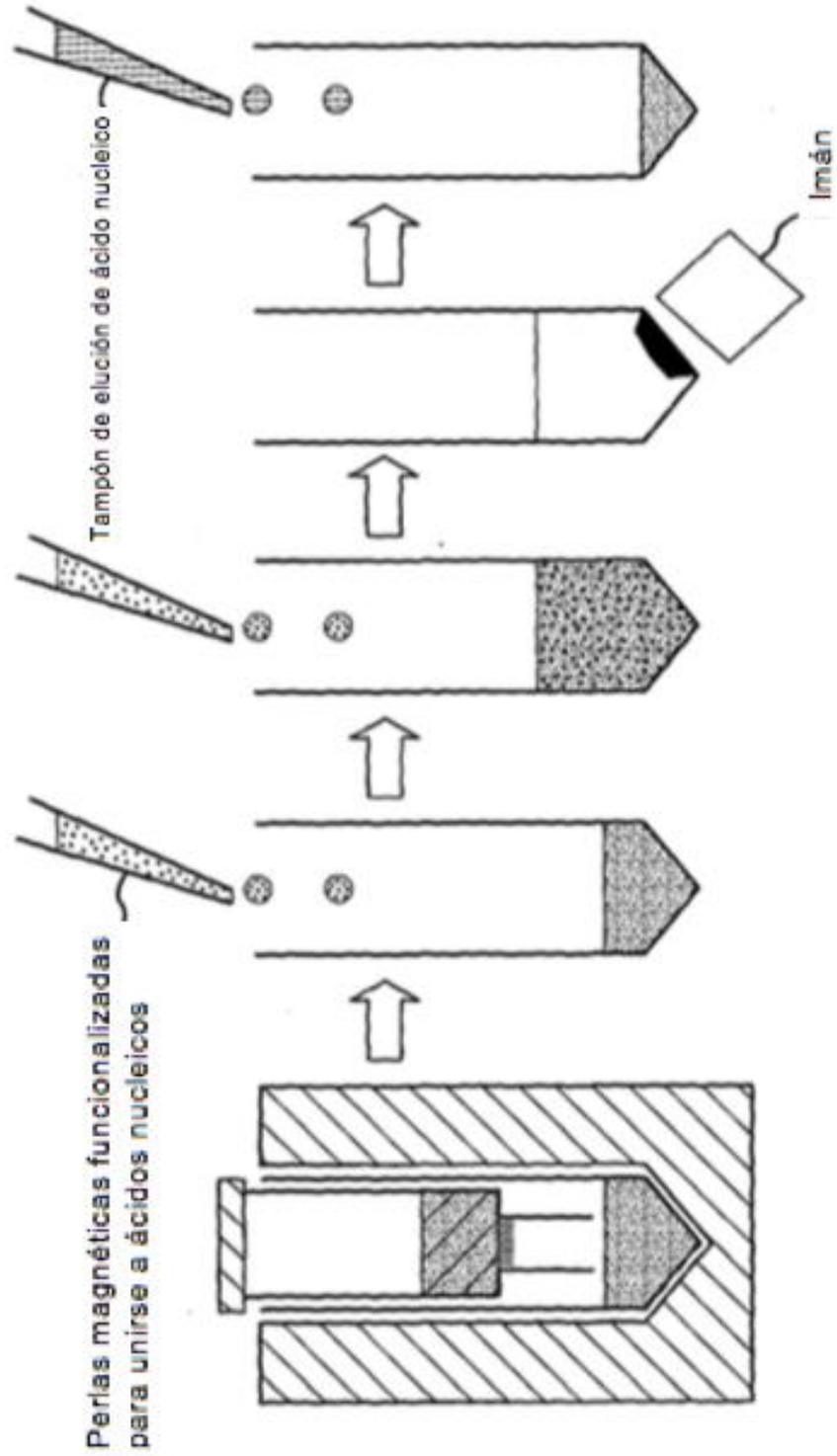


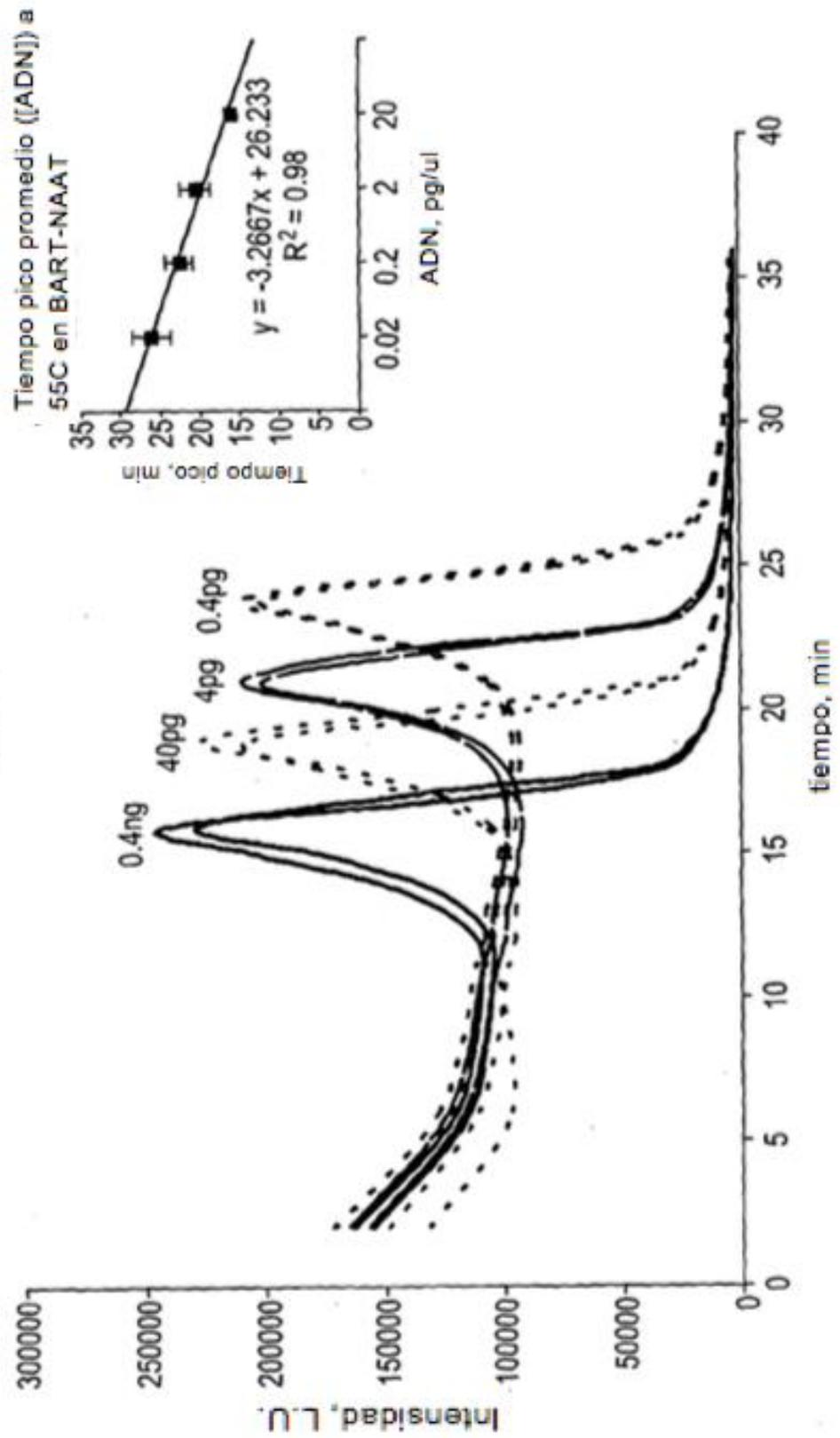
FIG. 1f: Concentración tras elución de calor



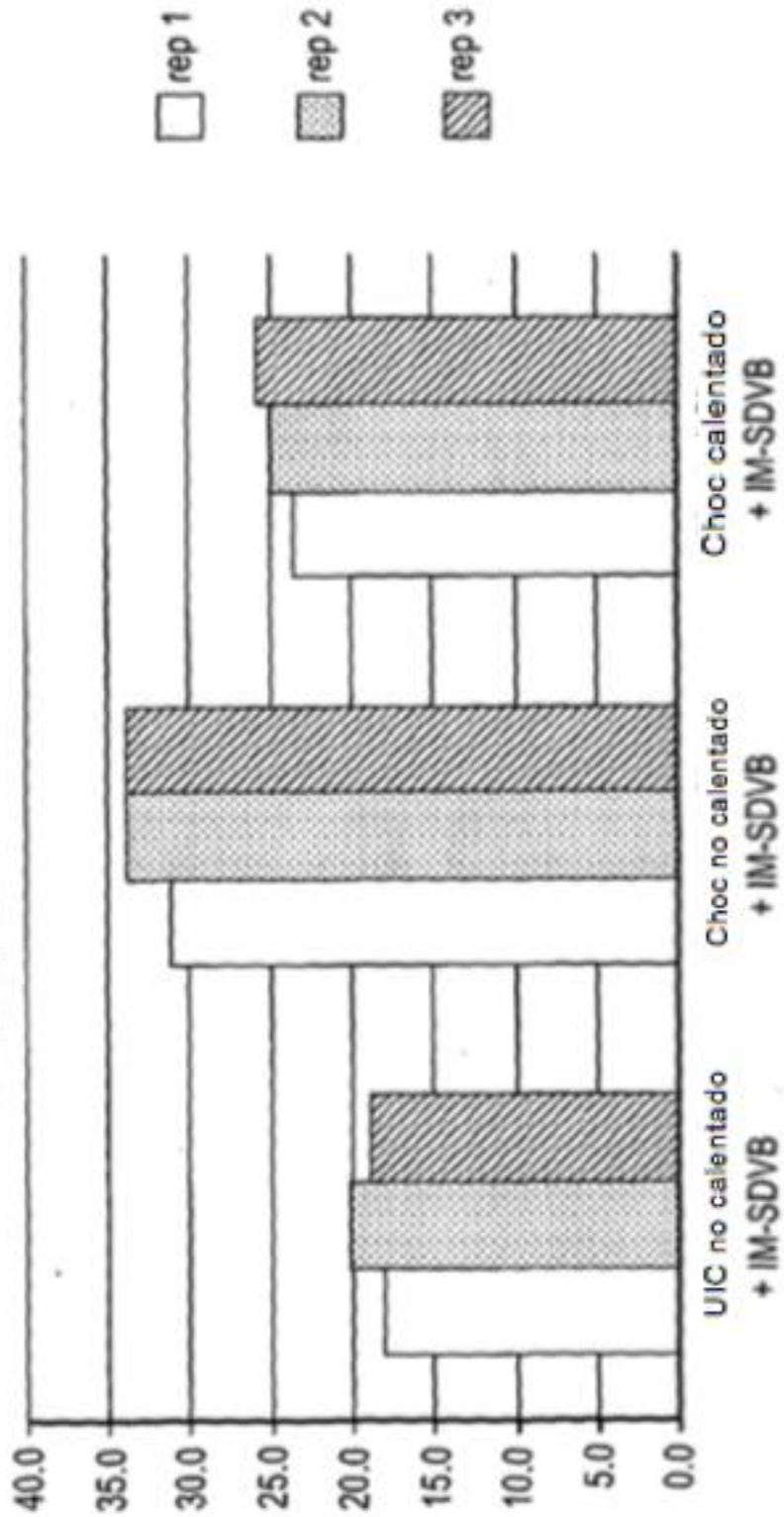
**FIG. 2**

#	Columna vacía (g)	Columna con Chelex (g)	Peso de Chelex (g)	Tubo de colección (g)	MGW añadida	Tratamiento	Tubo de colección tras elución	Vol. de elución (µl)	Peso de columna tras elución (g)	Peso de MGW en la columna (g)	Peso de columna y tubo de colección	Peso combinado pre MGW	Peso de MGW
1	0.8695	0.9525	0.0830	1.2103	250µl	100°C 5 mins	1.4088	198.5	0.9991	0.0466			
2	0.8647	0.9498	0.0851	1.2029	250µl	RT 5 min	1.2029	0	1.1957	0.2459			
3	0.8673			1.2101	250µl	100°C 5 mins	1.4365	226.4	0.8860	0.0187	2.3227	2.0774	0.2453
4	0.8682			1.2100	250µl	RT 5 min	1.2100	0	0.1186	0.2504	2.3287	2.0782	0.2505

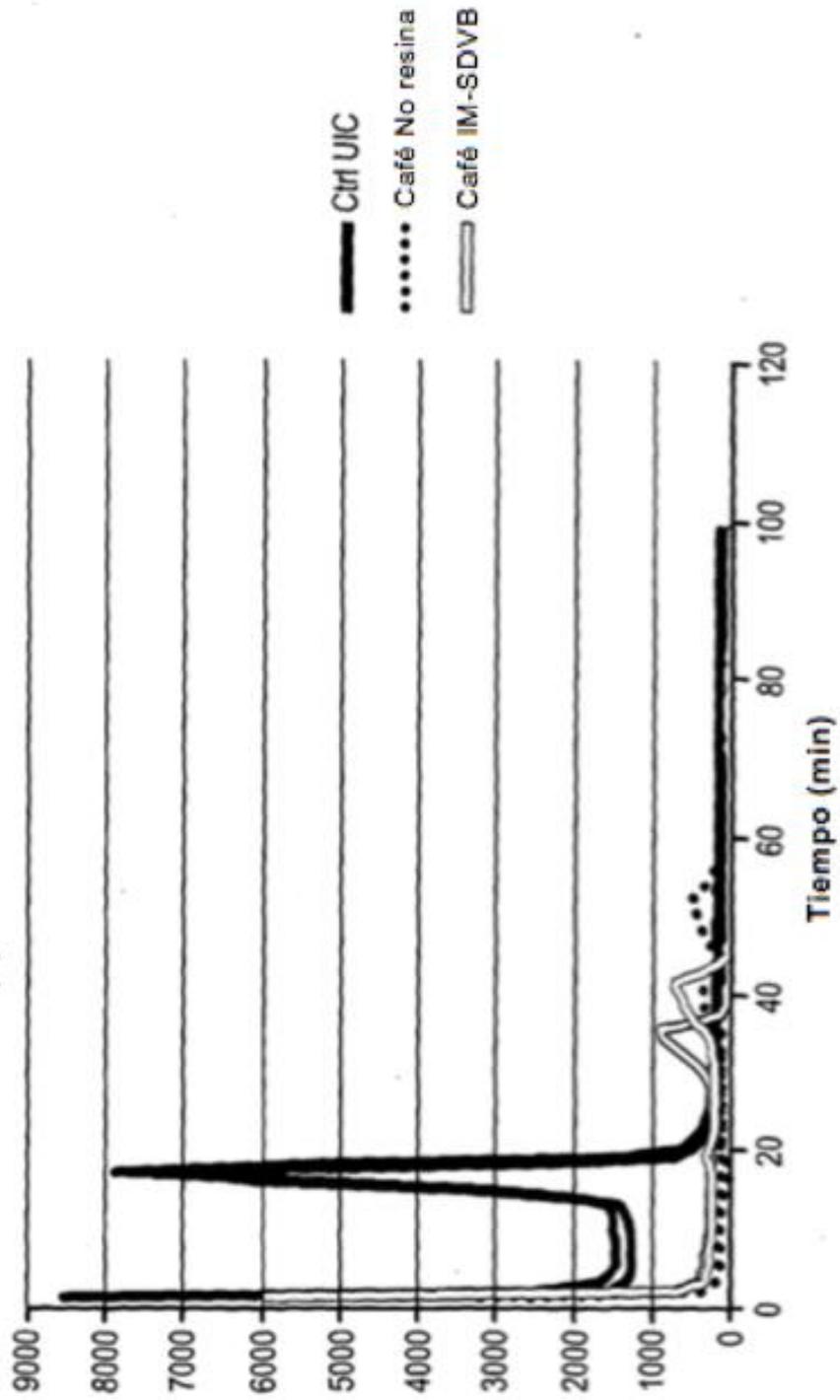
FIG. 3



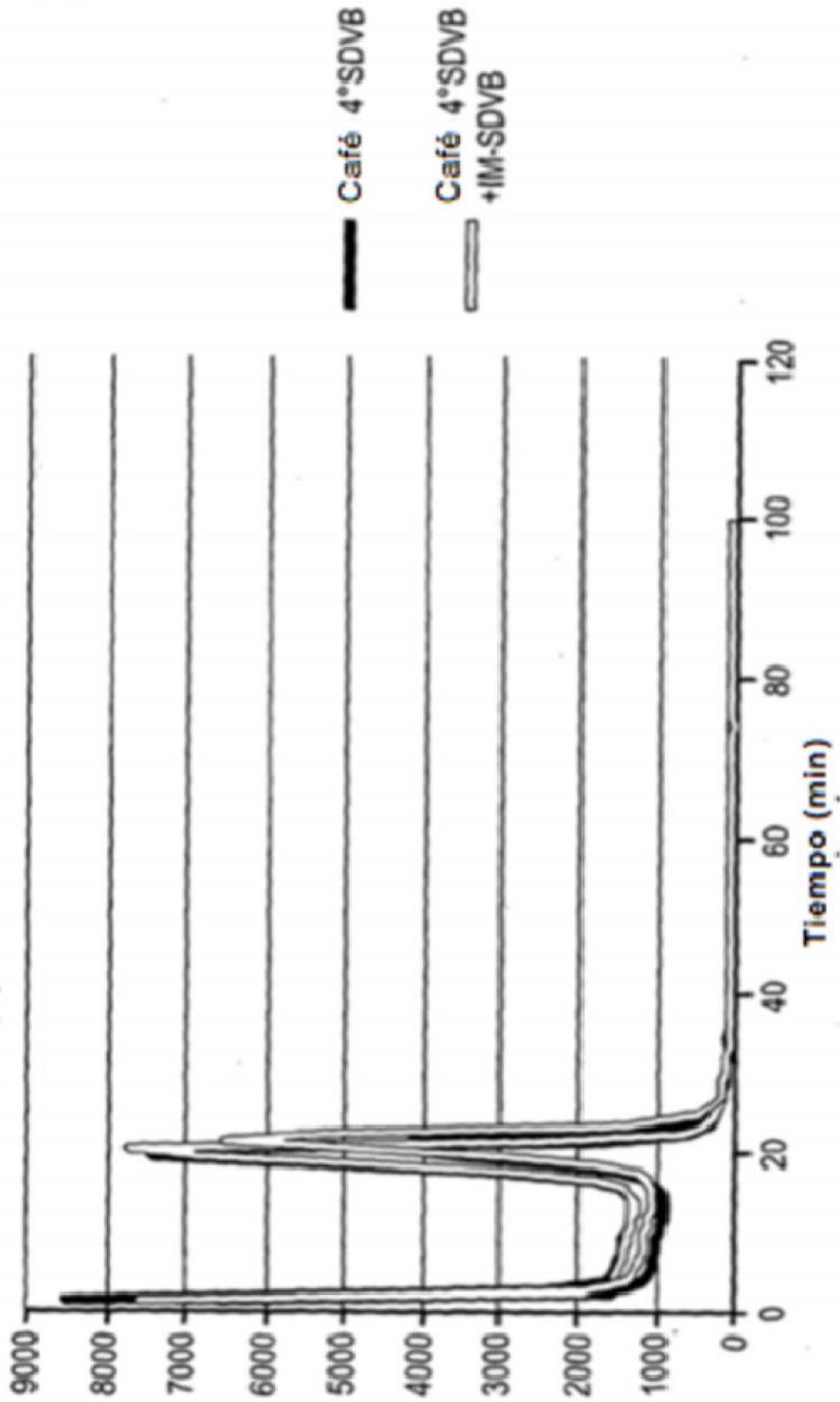
**FIG. 4**  
**Control inhibidor LAMP-BART**  
Tiempo a pico



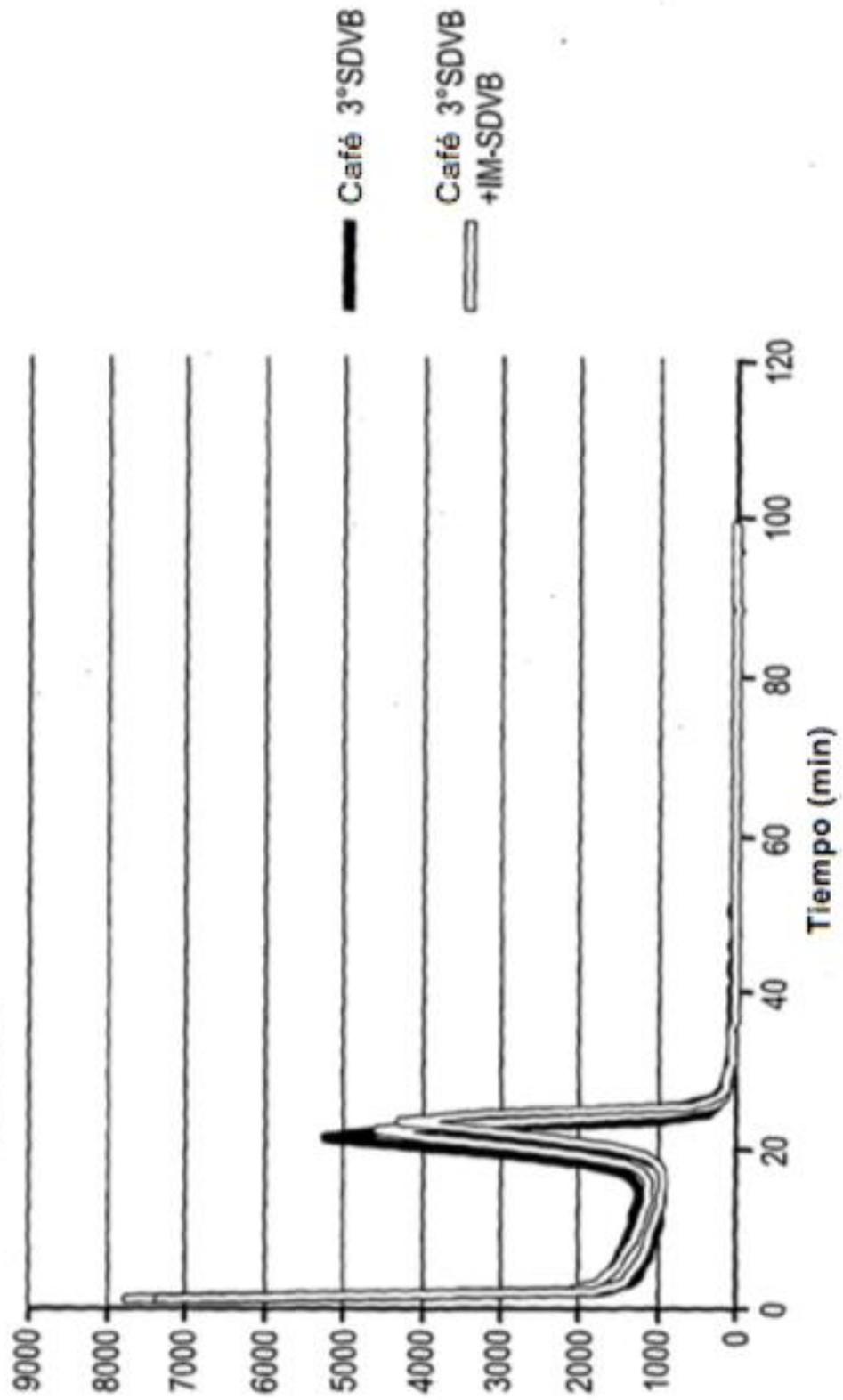
**FIG. 5(a)** Control Inhibidor LAMP b-BART



**FIG. 5(b)** Control Inhibidor LAMP b-BART



**FIG. 5(c)** Control inhibidor LAMP b-BART



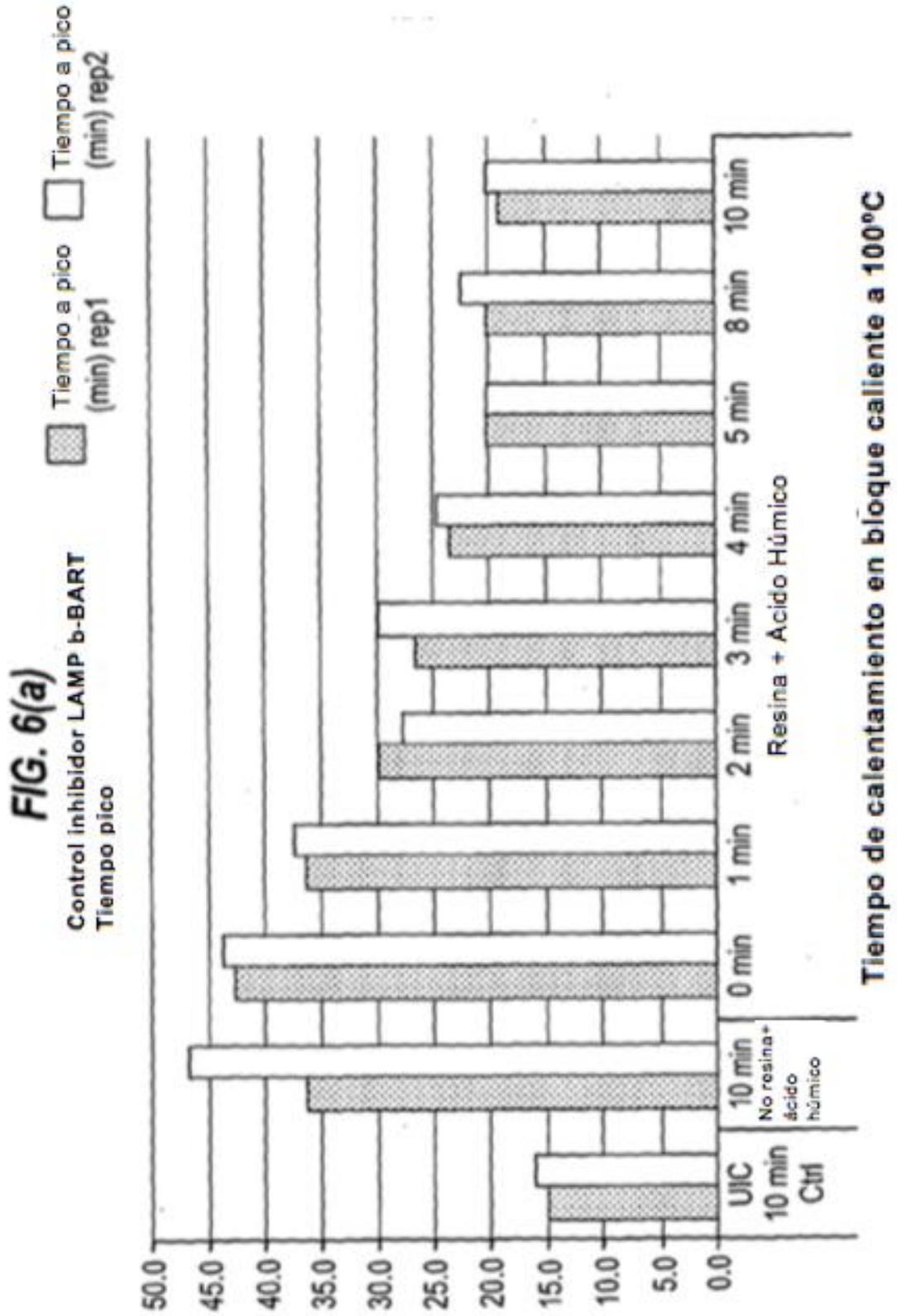


FIG. 6(b)

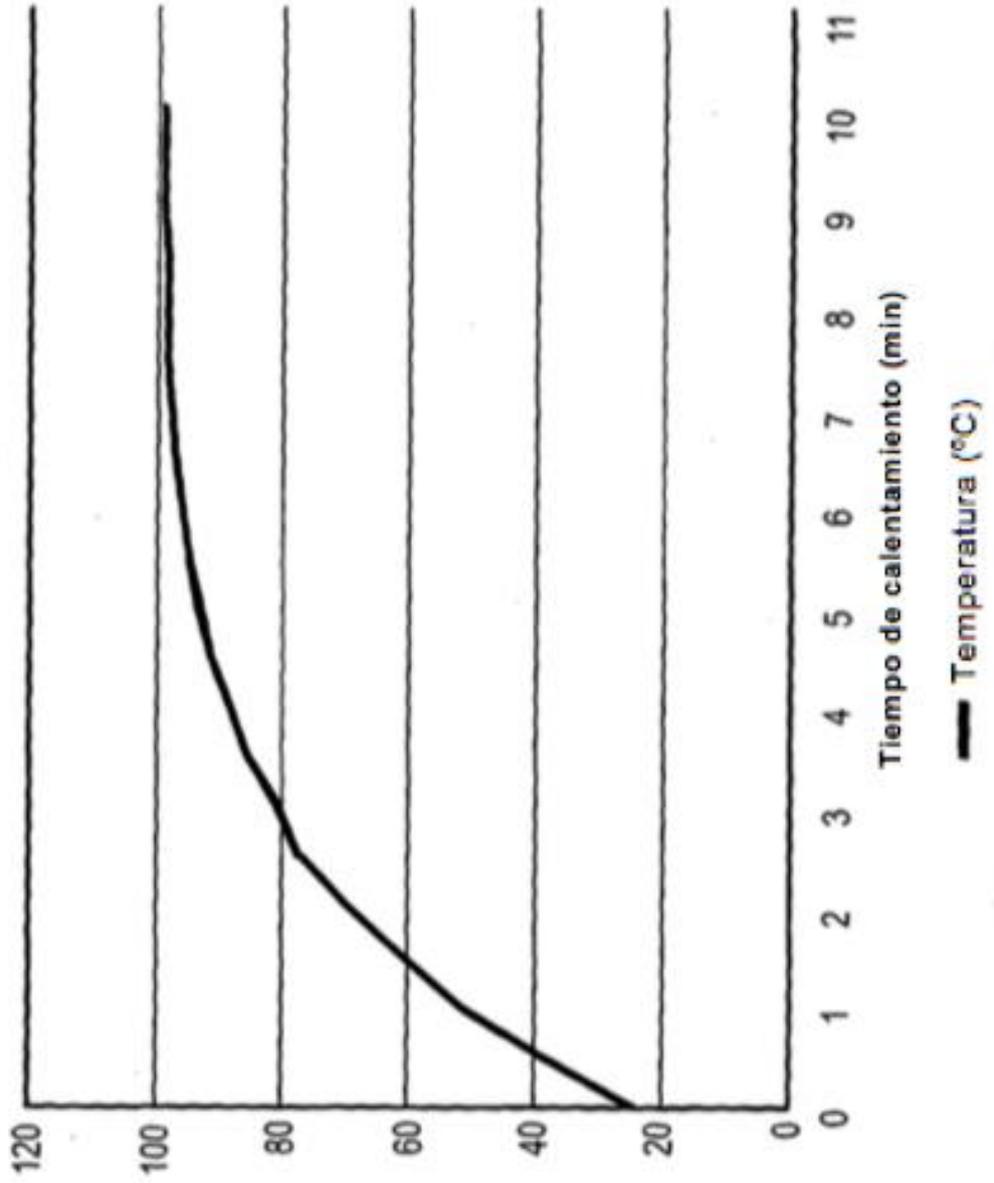
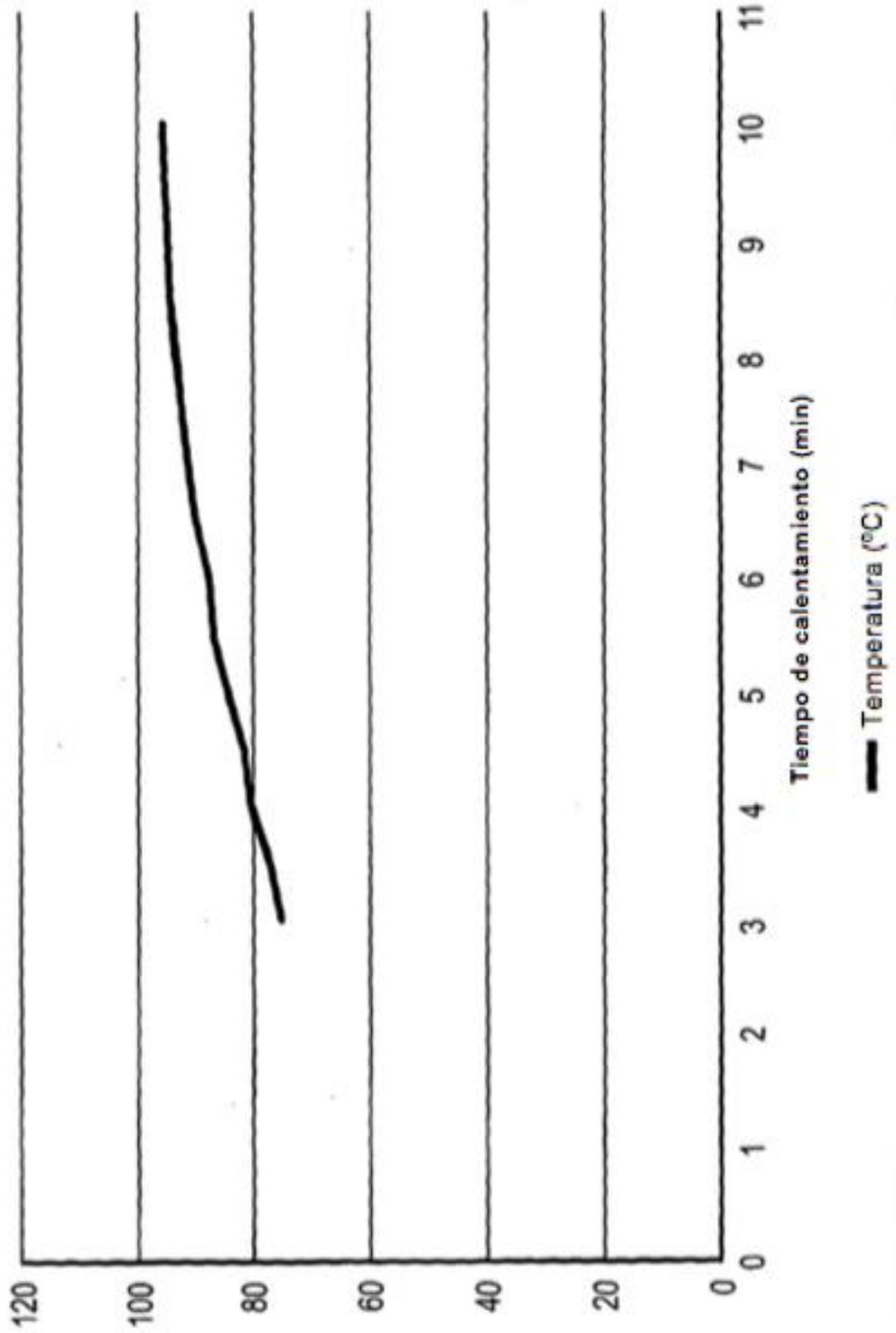


FIG. 7



**FIG. 8**  
**Control de inhibidor LAMP-BART**

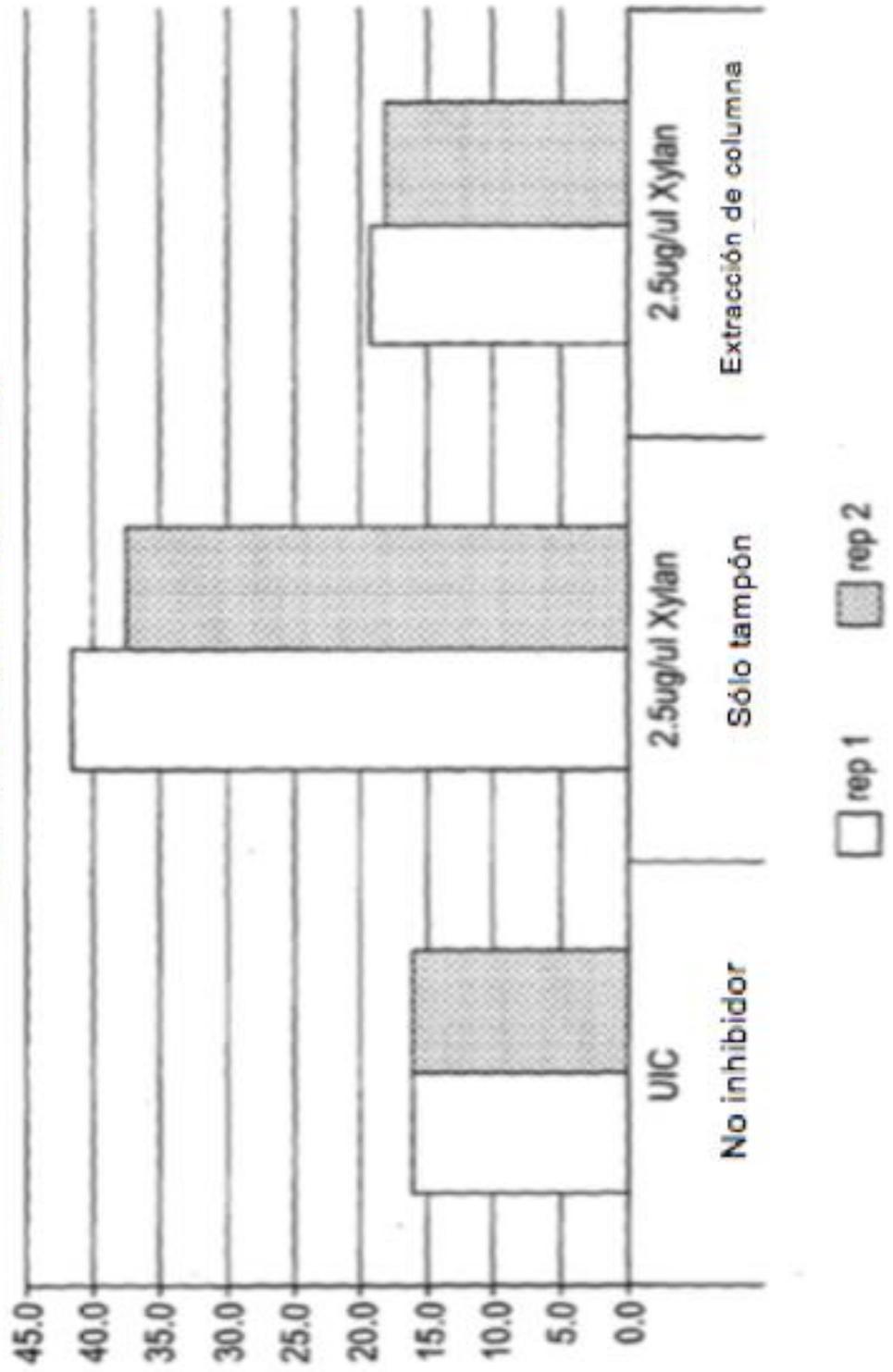


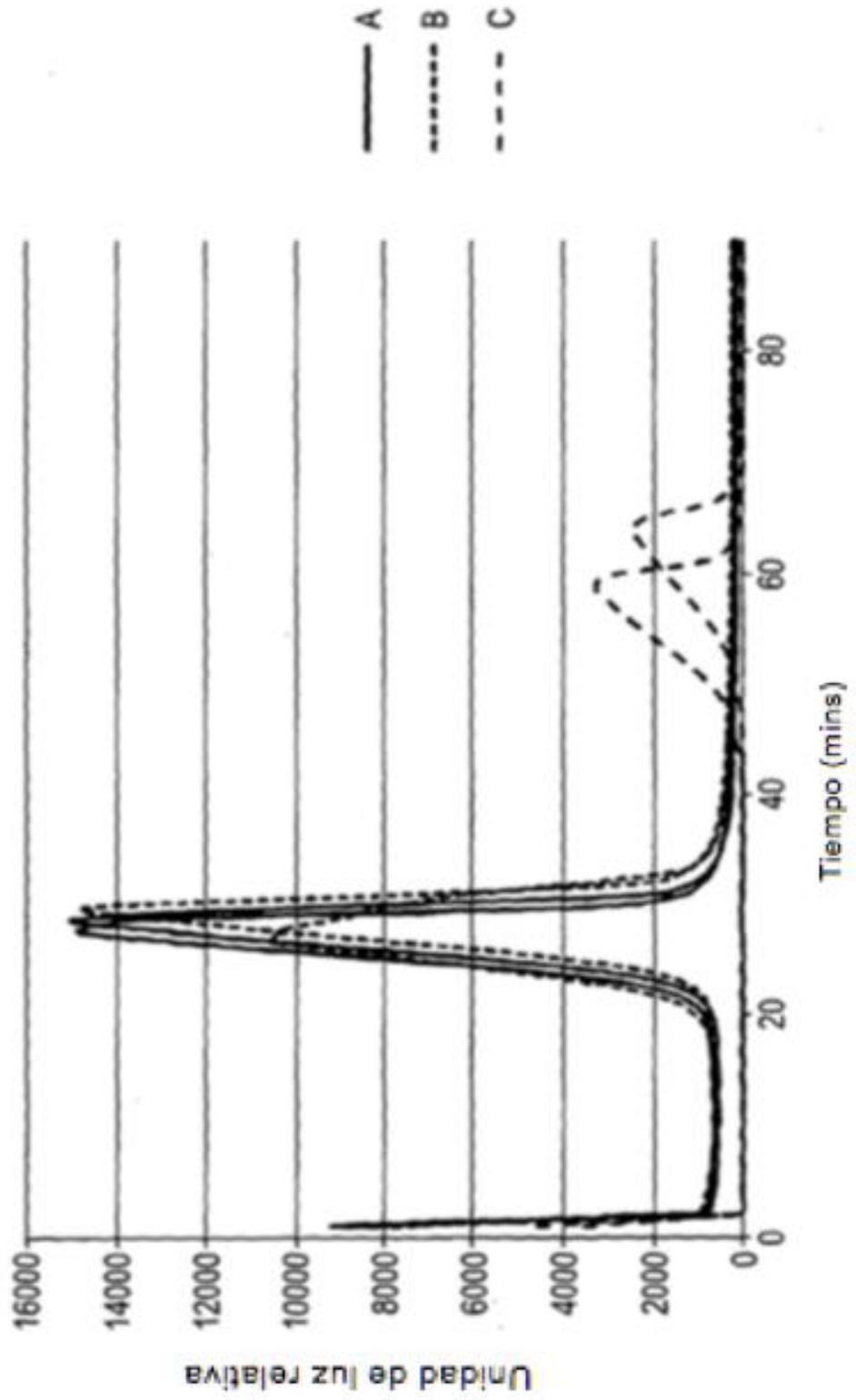
FIG. 9

Formato usando contenedores de 8 ml, que contienen:	Tiempo para elución (min) de aprox. 1965 $\mu$ l de líquido
<b>Mezcla de resina + frita de polietileno</b>	<b>1.5 min</b>
Mezcla de resina + 300mg cera de parafina* + frita de polietileno	2 min (1 min retraso antes de las primeras gotas y, a continuación, elución rápida debido al aumento de presión)
SPC** frita + Mezcla de resina + frita de polietileno (Resina colocada entre fritas)	<b>3 min</b>
SPC frita + Mezcla de resina + 300 mg cera de parafina* + frita de polietileno (resina colocada entre fritas)	3 min (1 min retraso antes de las primeras gotas y, a continuación, elución rápida debido al aumento de presión)
Mezcla de resina + 300 mg cera de parafina* + SPC frita + frita de polietileno	5 min (2 min 15 seg retraso antes de las primeras gotas)

\*Cera de parafina de alta temperatura de fusión (mp 70-80°)

\*\*SPC=Capa de polietileno porosa ultra fina tamaño de poros

FIG. 10



**FIG. 11**

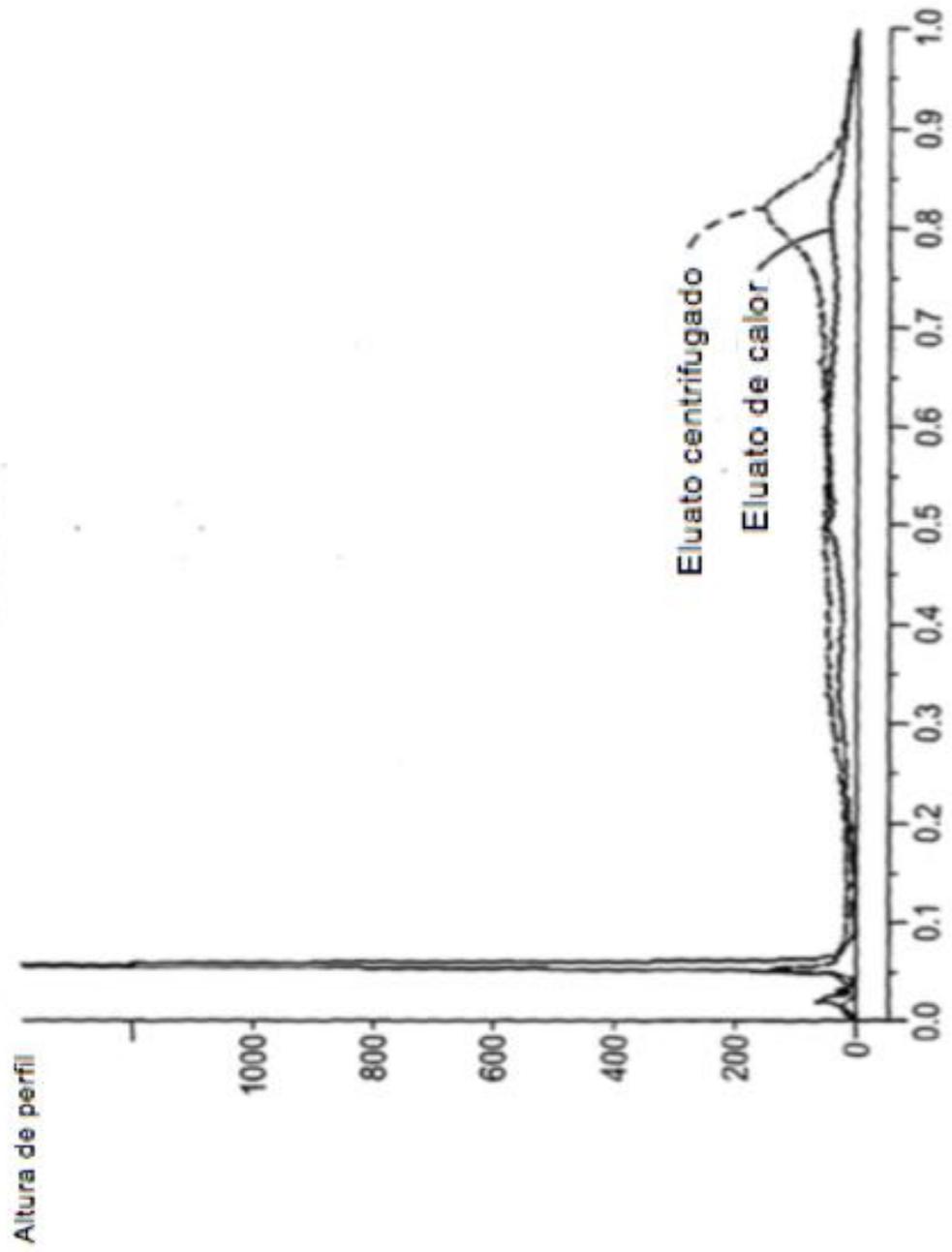
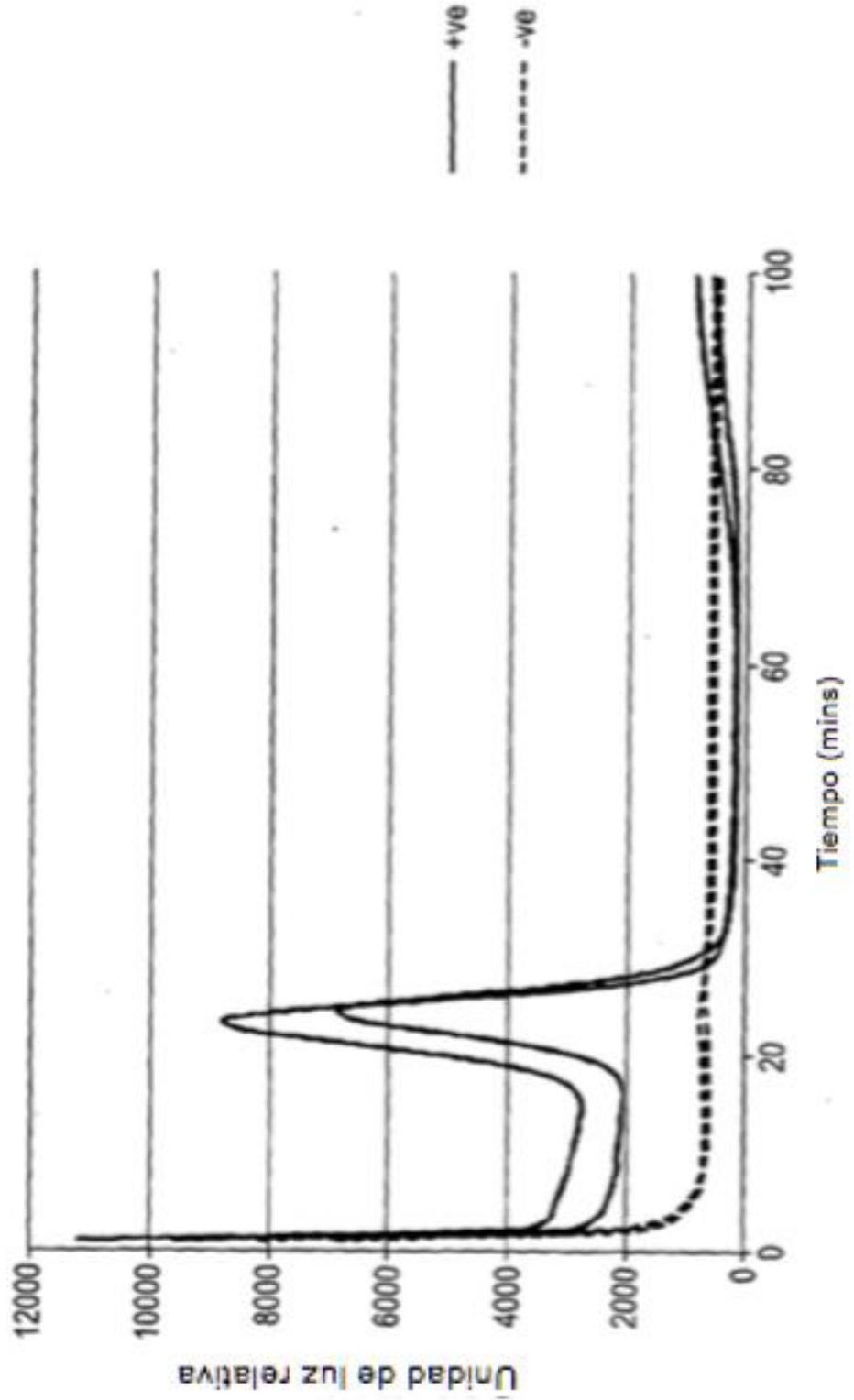
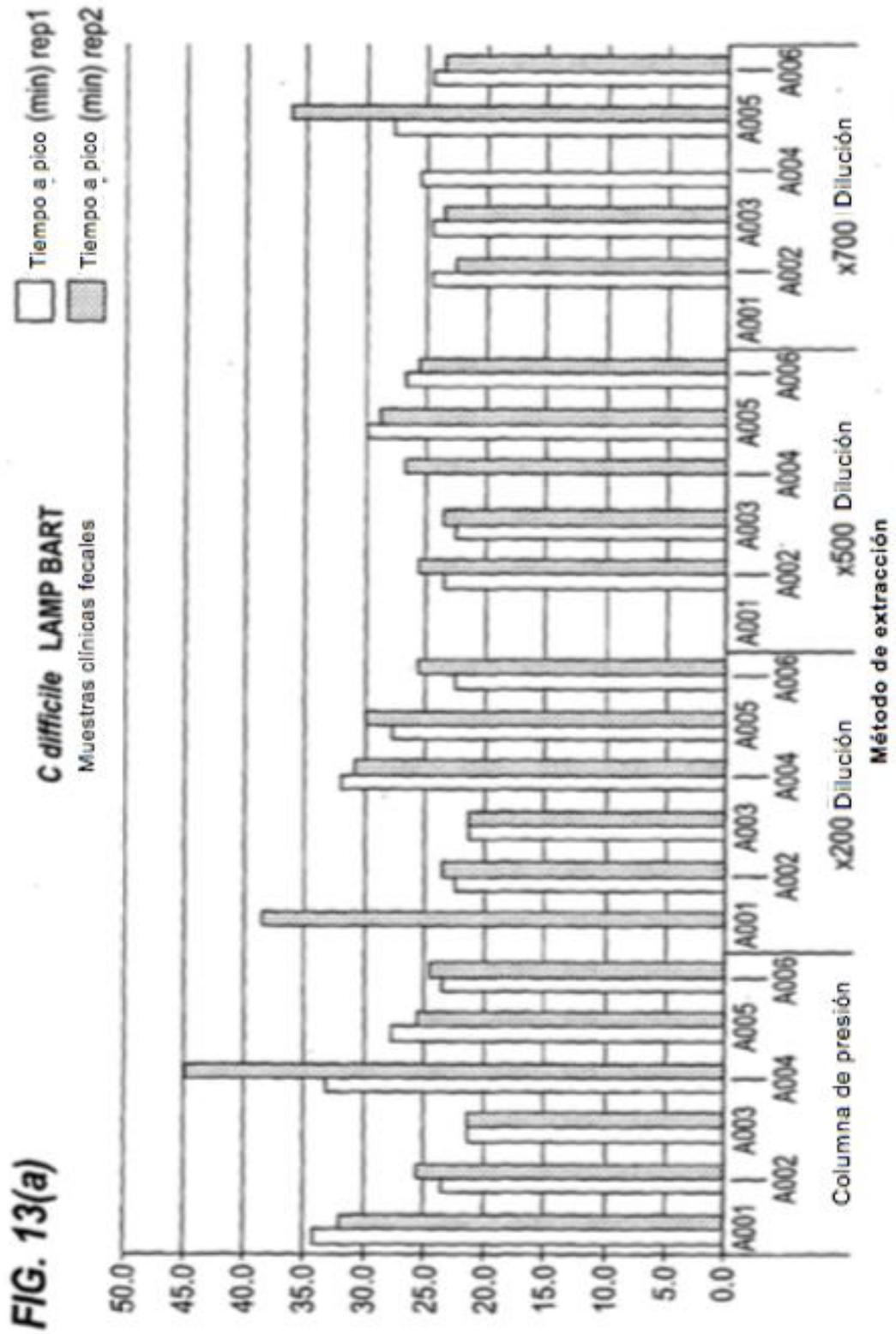


FIG. 12

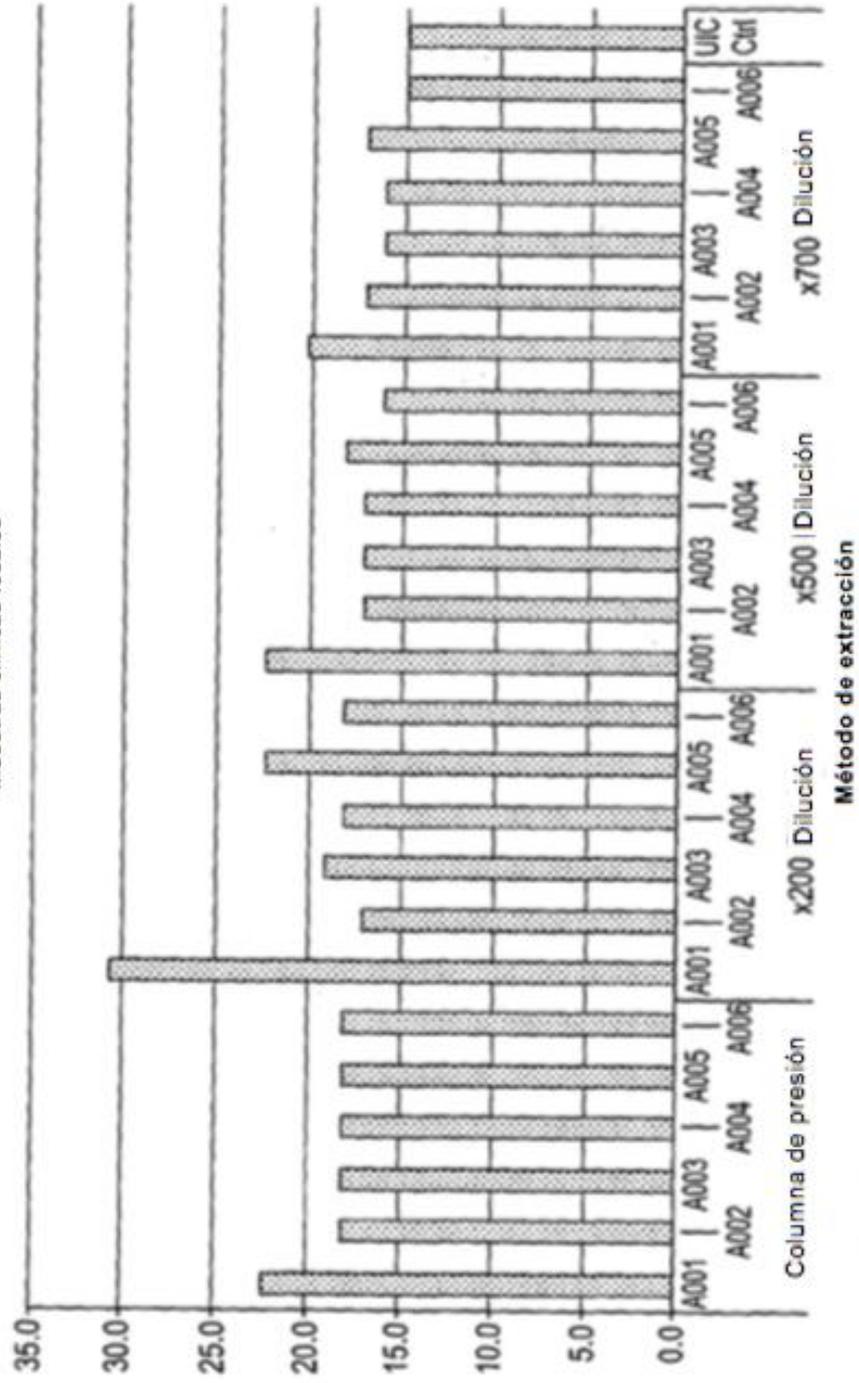




**FIG. 13(b)**

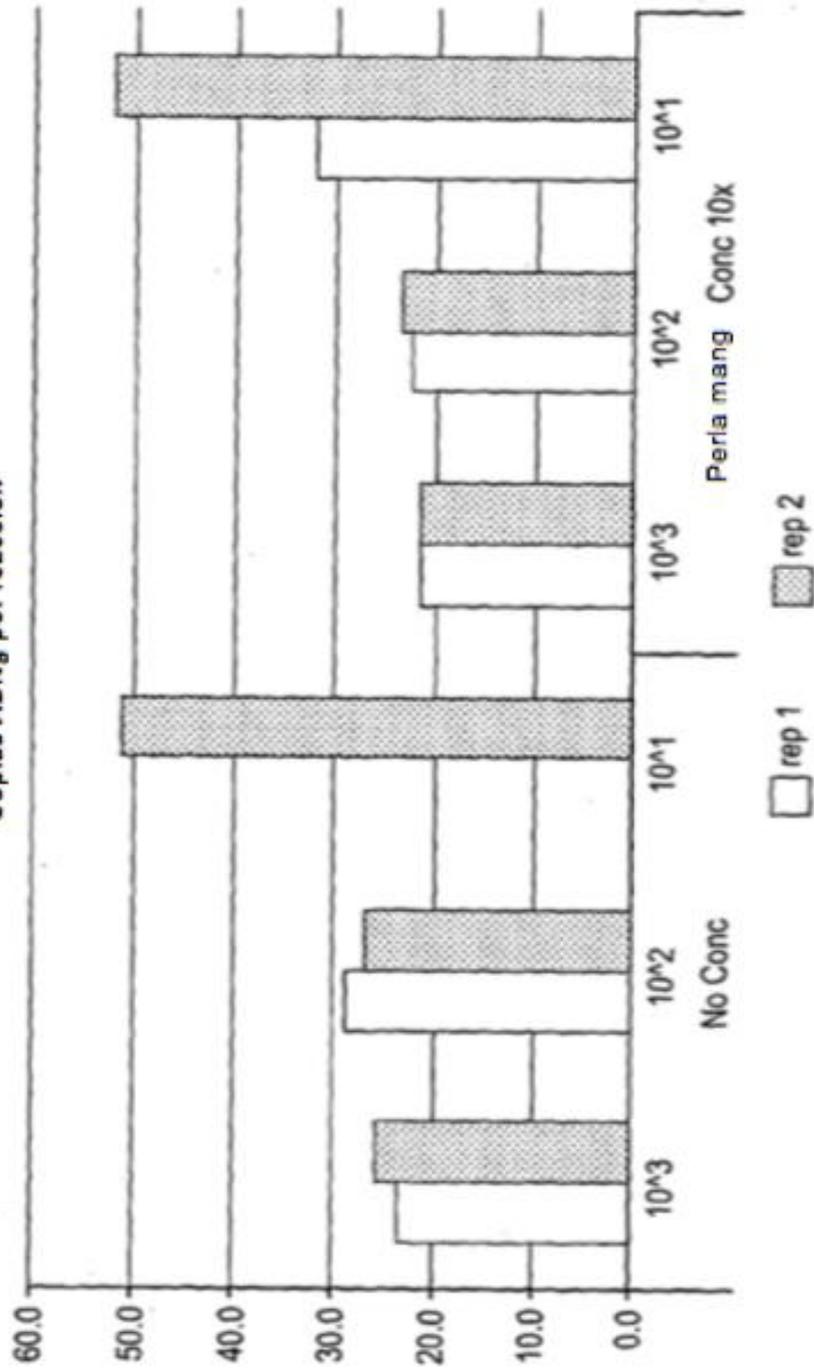
**Control de inhibidor LAMP-BART**

Muestras clínicas fecales



**FIG. 14**

***C. difficile* LAMP-BART**  
Copias ADNg por reacción



**FIG. 15**

Integración de preparación de muestras de múltiples recipientes y amplificación mediante elución de calor

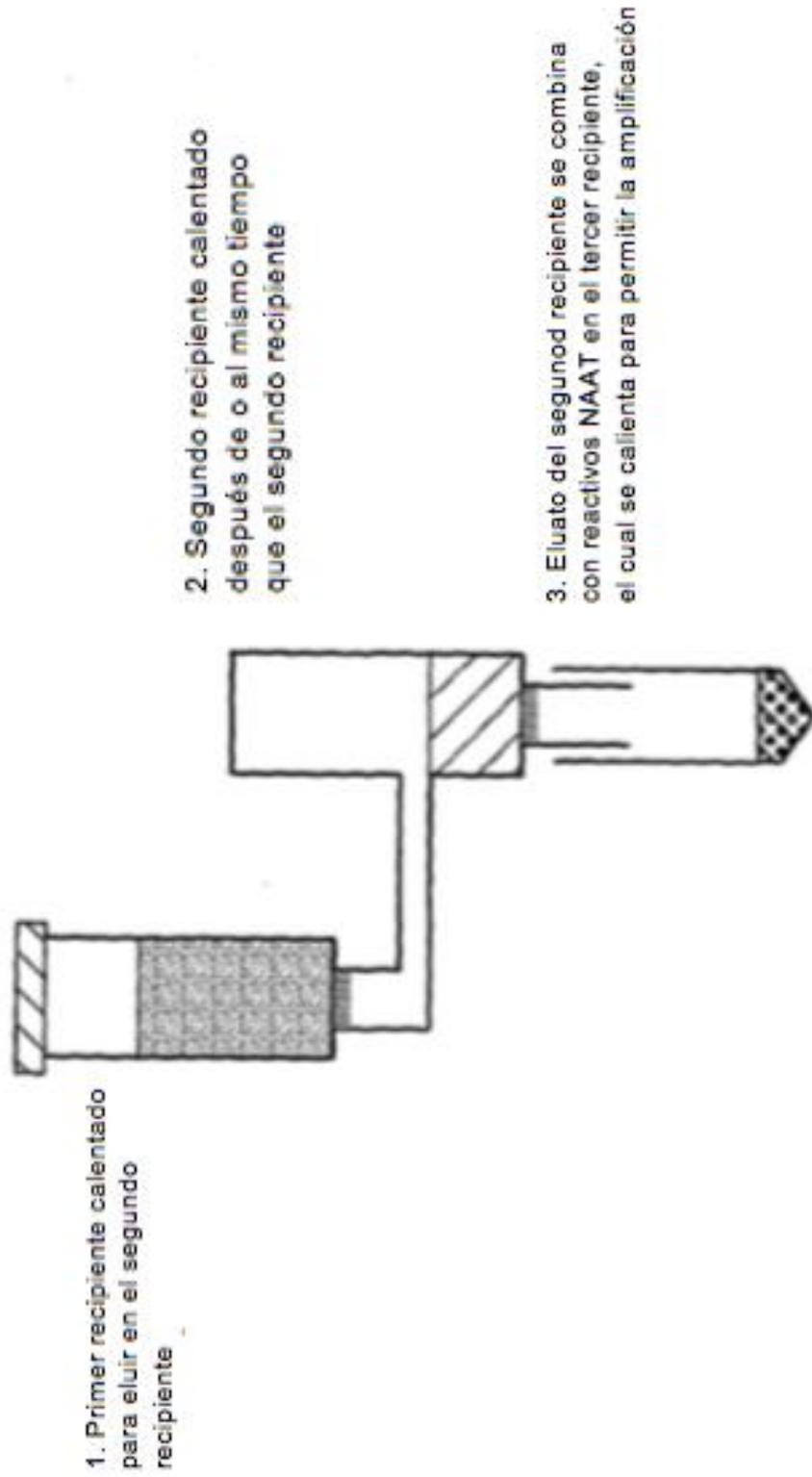


FIG 16 Comparación de detección de ADN genómica con y sin elución de calor con perlas magnéticas ChargeSwitch® incorporadas en el primer recipiente

