

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 333**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2015 PCT/EP2015/054341**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15132216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2015 E 15712533 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 3114224**

54 Título: **Método y kit de partes para la extracción de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**07.03.2014 DE 102014103107
07.03.2014 EP 14158441**

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

20.09.2018

73 Titular/es:

**IFP PRIVATES INSTITUT FÜR
PRODUKTQUALITÄT GMBH (100.0%)
Wagner-Régeny-Strasse 8
12489 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**WEBER, WOLFGANG y
WERNER, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 682 333 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y kit de partes para la extracción de ácidos nucleicos

5 AREA DE LA INVENCION

La invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras de alimentos para su posterior análisis, especialmente por PCR, y a una composición química y un kit para uso en el aislamiento de ácidos nucleicos.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

Las regulaciones de seguridad alimentaria y etiquetado están aumentando con el volumen del comercio. Esto también representa una situación exigente para las cadenas de suministro de alimentos. El procesamiento industrial de alimentos aumenta aún más los riesgos de contaminación con microorganismos y alérgenos inadvertidos. Dado que los consumidores y los organismos reguladores exigen certeza con respecto a los productos, se necesita una correcta identificación y etiquetado de los ingredientes, por ejemplo, con respecto a las especies en mezclas procesadas de materiales cárnicos o vegetales. Esto se aplica también a productos biológicos tales como prendas de vestir, textiles y pieles; por ejemplo, muchos consumidores occidentales no desean usar pieles de gato debido a alergias o por motivos éticos.

El aislamiento y el análisis por PCR de ácidos nucleicos es un método común para la detección e identificación de especies u organismos no deseados. Comúnmente, la muestra de material biológico se rompe mecánicamente y se lisa mediante tratamiento químico, seguido de la posterior purificación de los ácidos nucleicos aislados. Sin embargo, las muestras crudas y procesadas exhiben composiciones muy diversas y, en consecuencia, requieren tratamiento y procesamiento de la muestra diferentes. Es difícil saber de antemano qué tipo de procesamiento de la muestra es necesario para obtener suficientes ácidos nucleicos y suficientemente puros para el posterior análisis de PCR.

EP 2 634 254 B1 (QIAGEN GmbH) describe un método para aislar ADN bacteriano a partir de cultivos de enriquecimiento, en el que la muestra se mezcla con una sustancia no miscible en agua. WO 2013/010674 A1 describe un método de aislamiento de ADN que usa un dispositivo de filtración que contiene bentonita para la eliminación de proteínas. El método más establecido para el aislamiento de ADN genómico emplea el tensioactivo catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) para la desnaturalización y eliminación de proteínas (Drábková LZ et al., *DNA extraction from herbarium specimens*, *Methods Mol Biol.* 2014;11 15:69-84). Este método requiere el uso de una sustancia química costosa y peligrosa, y también es laborioso y lleva mucho tiempo. El estado de la técnica representa, por lo tanto, un problema.

Otro método para el aislamiento y purificación de ADN se describe en EP 0 512 767 A1, US 2003/170664 A1, WO 2006/073472 A2 y por Sails AD y otros en "A Real-Time PCR Assay for the Detection of *Campylobacter jejuni* in Foods after Enrichment Culture", *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2003, 69: 1383-1390; O'Grady et al. "Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target", *FOOD MICROBIOLOGY*, 2007, 25:75-84; y Monaci L et al "Immunochemical and DNA based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives", *TRENDS IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 2010, 21(6);272-283.

NEHA J et al describen en un artículo "Real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of anthrax spores in spiked soil and talcum powder", *WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 2010, 27(6):1407-1413 una composición para uso en la extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras, que comprende de 10 a 40 por ciento en peso de partículas que consisten en silicato de magnesio hidratado insoluble en agua enriquecido con esporas de *B. anthracis* y que tienen un tamaño mediano de partícula de 0,8 a 2,5 µm (es decir, polvo de talco) y solución salina tamponada líquida con fosfato.

RESUMEN DE LA INVENCION

50 El problema se resuelve mediante una composición y un método como se describe en las reivindicaciones 1 y 8. Las realizaciones preferidas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes 2 a 7 y 9 a 13.

La composición para uso en la extracción y purificación de ácidos nucleicos está hecha de una mezcla de sólidos que comprende de 10 a 40 por ciento en peso de partículas que consisten en silicato de magnesio hidratado insoluble en agua y que tienen un tamaño medio de partícula de 0,8 a 2,5 µm; y de 20 a 70 por ciento en peso de solución salina cristalina tamponada con fosfato que es fácilmente soluble en agua para producir una solución que tiene un pH de 5,5 a 7,0 a 70 hasta 95 grados Celsius. En una realización preferida, la composición y la mezcla de sólidos ha sido porcionado como un comprimido o una cápsula que tiene un peso predefinido conocido, de modo que solo es necesario pesar la cantidad de muestra y no la cantidad del agente de liberación y purificación. La composición comprende preferiblemente de 20 a 35 por ciento en peso de un coloide hidrófilo que es eficaz para

dispersar la mezcla de sólidos en agua. Las partículas de silicato de magnesio hidratado tienen preferiblemente un tamaño mediano de partícula de 1,0 a 2,0 μm , más preferiblemente de 1,2 a 1,5 μm .

En una realización preferida, la presente descripción se refiere a un comprimido o una cápsula que comprende esencialmente una composición que comprende de 10 a 25 por ciento en peso de partículas de silicato de magnesio hidratado insoluble en agua; de 45 a 70 por ciento en peso de solución salina tamponada con fosfato, y de 20 a 30 por ciento en peso de un coloide hidrófilo eficaz para dispersar la mezcla de sólidos en agua. La composición puede comprender además uno o más agentes de lisis celular no caotrópicos. El coloide hidrófilo se puede seleccionar entre uno o más de celulosa, carboxi-metil celulosa, derivados de celulosa, alginato, almidón, goma de xantano, goma arábica, goma guar o mezclas de los mismos.

El método estándar descrito para aislar ADN a partir de diversas muestras alimentarias y alimentos para animales, incluidas las bebidas, para el posterior análisis de PCR, comprende los siguientes pasos: (i) obtener una cantidad de peso o volumen predefinidos de la muestra, preferiblemente como pequeñas partículas, solución o dispersión, y transferir la muestra a un recipiente; (ii) agregar una cantidad predefinida de la mezcla de sólidos como se describe anteriormente, para obtener en el recipiente una relación 1:5 a 5:1 de peso de sólidos a muestra; (iii) añadir además una cantidad de agua para disolver los componentes del tampón de la mezcla de sólidos para obtener una solución salina tamponada acuosa con fosfato que tiene un pH de 5,5 a 7,0 y una concentración de sal de 0,6 a 1,2 Mol/L, (iv) obtener una dispersión de la muestra y la mezcla de sólidos en solución salina tamponada con fosfato y calentar la solución o dispersión a una temperatura de 70 a 95 grados Celsius durante 1 minuto a 30 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 5 minutos a 20 minutos, para liberar los ácidos nucleicos de los materiales celulares y otros componentes insolubles en agua de la muestra; (v) separar de la fase acuosa los componentes insolubles en agua de la muestra y de las mezclas de sólidos, preferiblemente por centrifugación o filtración, junto con los componentes adsorbidos a las partículas de silicato de magnesio de la mezcla de sólidos; (vi) retirar el sobrenadante acuoso o filtrado que contiene ácidos nucleicos solubles, seguido de un paso de desalinización para obtener una solución de ADN de la muestra adecuado para el análisis por PCR. Una persona experta en la técnica apreciará que uno o más pasos de este método son intercambiables sin apartarse del principio de purificación descrito.

Otra realización se refiere a un kit de partes para extraer y purificar ácidos nucleicos a partir de muestras, que comprende cantidades porcionadas de la composición y mezcla de sólidos descritos. La composición, el método y el kit se pueden usar para aislar y caracterizar el tipo de ácidos nucleicos a partir de materiales animales y vegetales crudos y/o procesados y sus productos procesados. Son particularmente adecuados para aislar ácidos nucleicos característicos de potenciales alérgenos presentes en cereales y sus productos, garbanzo y sus productos, caseína, almendra y sus productos, anacardo y sus productos, cacahuete y sus productos, avellana y sus productos, macadamia y sus productos, mostaza y sus productos, soja y sus productos, sésamo y sus productos, nuez y sus productos, pistacho y sus productos, altramuz y sus productos, apio y sus productos, pescados y sus productos, crustáceos y sus productos. Son adecuados además para aislar ácidos nucleicos característicos de organismos genéticamente modificados, patógenos, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Cronobacter spp.*, *Clostridium spp.*, *Legionella spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia spp.*

En otra realización, la composición, el método y el kit se pueden usar para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras fecales, preferiblemente muestras de heces de humanos y animales.

La composición para extraer y purificar ácidos nucleicos a partir de las muestras de alimentos puede comprender de 10 a 40 por ciento en peso de partículas de silicato de magnesio hidratado insoluble en agua; de 20 a 70 por ciento en peso de una solución salina cristalina tamponada con fosfato que es soluble en agua produciendo de manera efectiva una solución que tiene un pH de 5,5 a 7,0; y de 20 a 35 por ciento en peso de un coloide hidrofílico que se hincha en contacto con el agua y es efectivo para dispersar la mezcla de sólidos en el agua. El silicato de magnesio hidratado utilizado puede tener un tamaño mediano de partícula de 1,2 μm y una densidad de 2,8 g/cm^3 . En una realización preferida, la mezcla de sólidos puede ser un comprimido o una cápsula para que la disolución de la mezcla de sólidos en una solución acuosa pueda dar como resultado 5 a 7 veces solución salina tamponada con fosfato que tiene un pH de 5,5 a 7 a aproximadamente 70 hasta aproximadamente 95 grados Celsius.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a un método de purificación de ADN genómico a partir de muestras de alimentos, que comprende los pasos de i) obtener una cantidad predeterminada de una muestra de alimento; ii) transferir la muestra de alimento a un tubo de reacción; iii) agregar la mezcla de sólidos de la presente descripción a la muestra de alimento, dicha mezcla de sólidos comprendiendo solución salina tamponada con fosfato que es soluble en agua produciendo de manera efectiva una solución con un pH de 5,5 a 7,0; iv) añadir una cantidad predeterminada de agua; v) mezclar la muestra y dicha mezcla de sólidos, el contenido del comprimido siendo liberado, produciendo una solución que tiene una concentración de 5 a 7 veces de salino tamponado con fosfato; vi) calentar el tubo de reacción hasta una temperatura en el rango de 70 a 95 grados Celsius; y vii) extraer ácidos nucleicos de la matriz de alimentos, seguido de la recuperación de los ácidos nucleicos extraídos; la matriz de alimento siendo incubada con la composición de extracción de ácidos nucleicos en el paso vi) durante un período de tiempo suficiente para extraer los ácidos nucleicos.

- 5 La descripción se refiere además a un método para preparar una composición de extracción de ácidos nucleicos, que comprende los pasos de i) proporcionar una mezcla sólida particulada de 10 a 40 por ciento en peso de partículas de silicato de magnesio hidratado insoluble en agua; y de 20 a 70 por ciento en peso de solución salina cristalina tamponada con fosfato; ii) añadir de 20 a 35 por ciento en peso de un coloide hidrófilo a dicha mezcla particulada; iii) compactar dicha mezcla particulada junto con el coloide hidrófilo en un comprimido o una cápsula; y opcionalmente, recubrir el comprimido o la cápsula con una película.
- En otro aspecto, la descripción proporciona un kit de partes para extraer y purificar ácidos nucleicos a partir de muestras de alimentos, que comprende i) un comprimido o una cápsula que tiene la composición de acuerdo con la presente descripción; y opcionalmente, uno o más tubos de reacción con reactivos sólidos o líquidos.
- 10 En otra realización preferida, el método y el kit de partes pueden usarse para extraer ácidos nucleicos a partir de alérgenos seleccionados de cereales y sus productos, garbanzo y sus productos, caseína, almendra y sus productos, anacardo y sus productos, cacahuete y sus productos, avellana y sus productos, macadamia y sus productos, mostaza y sus productos, soja y sus productos, sésamo y sus productos, nuez y sus productos, pistacho y sus productos, altramuz y sus productos, apio y sus productos, pescado y sus productos, crustáceos y sus productos. En otra realización, el método y el kit de partes pueden usarse para extraer ácidos nucleicos de organismos genéticamente modificados.
- 15 Otra realización preferida se refiere al uso de la composición de acuerdo con la presente descripción en el análisis de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa.
- 20 Mediante la adición de un solo comprimido que comprende la mezcla de sólidos de acuerdo con la presente descripción, y de agua caliente de 70 a 95 °C, ya no hay necesidad de enzimas adicionales, disolventes orgánicos, tensioactivos, etc. para obtener una ruptura de la matriz de muestra. El comprimido o la cápsula de la composición puede usarse con todas las matrices de alimentos probadas porque la alta fuerza osmótica, debido a la gran cantidad de sal, en combinación con las altas temperaturas conduce a una liberación de ácidos nucleicos a partir de todas las matrices biológicas. Por otro lado, el tampón con fosfato ligeramente ácido estabiliza las cadenas de ácidos nucleicos incluso en soluciones acuosas de hasta 95 grados Celsius. Lo que es más importante, un método puede usarse con todo tipo de matrices biológicas como cuero, pieles, textiles, chocolate, cereales, materiales que contienen nueces, carne, etc. Esto es particularmente importante para los numerosos alimentos procesados y barras de chocolate.
- 25 Una importante ventaja es el establecimiento de un procedimiento de rutina en el análisis de muestras con diferentes propiedades físico-químicas tales como alimentos ricos en lípidos (chocolate/pastas de nueces), proteínas (carnes), polisacáridos (cereales) y, en particular, mezclas de los mismos. Ya no es necesario adaptar el método a la matriz alimentaria que, de nuevo, requiere experiencia de laboratorio y equipo adicional. A través de la presente descripción, cualquier persona sin una amplia experiencia de laboratorio puede así realizar una extracción de ácidos nucleicos a partir de cualquier muestra biológica, incluso cuando las muestras sean de diferente origen. La estandarización total de la extracción de ácido nucleico a partir de prácticamente cualquier matriz biológica o alimentaria se consigue con la composición y el método descritos (comprimido).
- 30 La extracción convencional de CTAB o de disolvente orgánico está, además, asociada con riesgos para la salud debido a los disolventes orgánicos y tensioactivos. Es más, los métodos convencionales requieren una eliminación completa de disolventes, reactivos y tensioactivos añadidos para evitar la interferencia con la reacción en cadena de la polimerasa. Estos incluyen detergentes iónicos tales como desoxicolato de sodio, sarcosilo y SDS, etanol e isopropanol, fenol y otros. Los tipos de muestras biológicas que se sabe que contienen inhibidores incluyen sangre, telas, tejidos y tierra. Inhibidores de PCR típicos endógenos a muestras biológicas son sales biliares (heces), polisacáridos complejos y otros (heces, materiales vegetales), colágeno, mioglobina, hemoglobina, inmunoglobulinas y hemo (carne y sangre), ácido húmico (suelo, materiales vegetales), melanina y eumelanina (cabello, piel), iones de calcio y proteinasas (leche, hueso). La presente descripción supera los problemas comúnmente asociados con los inhibidores de PCR endógenos y añadidos, en primer lugar, al no requerir ningún disolvente orgánico o agente tensioactivo y, en segundo lugar, mediante la eliminación de esos inhibidores junto con las partículas de silicato de magnesio hidratado. Sin querer limitarse a una teoría, se supone que el paso de calentamiento descrito conduce a una desnaturalización completa de inhibidores de la polimerasa proteínicos, mientras que los inhibidores hidrófobos, lipófilos y ácidos se adsorben sobre las partículas de silicato de magnesio. El polvo de silicato actúa como estabilizador del ADN genómico y se une, al menos, a una porción de lípidos, proteínas, polisacáridos y sales contenidas en la matriz, precipitándolos y eliminándolos de la fracción que contiene el ADN genómico.
- 40 La evaluación del contenido de ácido nucleico y/o la presencia de inhibidores en una muestra se lleva a cabo basándose en el valor de Ct obtenido mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real. Valores bajos de Ct indican que la ADN polimerasa requiere menos ciclos para amplificar el ADN blanco en la muestra. El método y el kit de la descripción permiten una extracción de ácidos nucleicos rápida, segura y económicamente ventajosa a partir de matrices alimentarias, sin las desventajas de los enfoques convencionales.
- 45 Como ya se mencionó, el agente tamponador es responsable de crear un choque osmótico, forzando al citoplasma y, en particular, al núcleo de la célula a liberar su contenido en el medio de extracción preservando la integridad del
- 50
- 55

ácido nucleico para su posterior análisis. Por lo tanto, se recomienda un paso de desalinización antes del análisis de PCR para reducir la concentración de sal en la reacción. Esto puede llevarse a cabo mediante cromatografía de exclusión por tamaño, ultrafiltración o cromatografía convencional de unión a ADN. Alternativamente, la muestra de PCR también puede diluirse simplemente para reducir la concentración de sal a niveles aceptables.

- 5 Ventajas, objetivos y realizaciones adicionales de la invención son evidentes a partir de las ilustraciones adjuntas, ejemplos representativos y reivindicaciones. La invención, sin embargo, no estará limitada por los ejemplos, sino que se ha definido en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

- 10 En las ilustraciones:

Fig. 1 es un diagrama que muestra una comparación del umbral del ciclo para la detección de mostaza por PCR en muestras con cantidades conocidas de mostaza (log ppm).

Fig. 2 es un diagrama que muestra una comparación del umbral del ciclo para la detección de mostaza amarilla por PCR en muestras con cantidades conocidas de mostaza amarilla (log ppm).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

La composición para uso en extraer y purificar ácidos nucleicos a partir de muestras de alimentos es una mezcla de sólidos que comprende de 10 a 40 por ciento en peso de silicato de magnesio hidratado insoluble en agua que tiene un tamaño mediano de partícula de 0,8 a 2,5 μm , y de 20 a 70 por ciento en peso de sal cristalina que es fácilmente soluble en agua para producir un tampón salino con fosfato que tiene un pH de 5,5 a 7,0 a 70 hasta 95 grados Celsius. Una mezcla de sólidos es una combinación de sustancias sólidas en forma de polvo, gránulos, partículas o cristales sin un disolvente líquido. El silicato de magnesio hidratado insoluble en agua es preferiblemente un silicato de magnesio hidratado o talco fino en forma de un polvo fino o finamente granulado. Dicho polvo de silicato de magnesio hidratado puede tener un tamaño mediano de partícula en el rango de 1,0 a 2,0 μm . preferiblemente de 1,2 a 1,5 μm ; un diámetro mediano D_{50} en el rango de 0,8 a 2,5 μm ; y una densidad de 2,6 a 2,8 g/cm^3 . El polvo de silicato insoluble tiene, por lo tanto, una gran superficie para la adsorción de lípidos, azúcares complejos y otros potenciales inhibidores de la polimerasa.

La sal tampón con fosfato puede estar presente en la mezcla de sólidos como cristales finos o en forma granulada y su composición es preferiblemente la siguiente: NaCl 137 mmol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L, KH_2PO_4 2 mmol/L. La sal tampón con fosfato dará, después de disolverse, una solución hipertónica de modo que los ácidos nucleicos también se liberen de la muestra biológica a través del choque osmótico resultante. La composición de la solución salina tamponada con fosfato es preferiblemente tal que de un pH de 5,5 a 7 a una temperatura del agua de 70 a 95 grados Celsius.

Las partículas de la mezcla de sólidos se pueden presionar o comprimir y porcionar para obtener un comprimido. Un comprimido está hecho solo de la mezcla de sólidos. Una cápsula puede estar hecha de gelatina y rellena con la mezcla de sólidos, sin ser presionada. La compactación de la composición se puede realizar mediante cualquier dispositivo convencional para compresión polvo conocido por el experto en la técnica.

El coloide hidrofílico hinchable puede estar presente en la mezcla en forma granulada o microcristalina. El material hinchable adecuado para la disolución rápida del comprimido o la cápsula con polvo puede elegirse entre celulosa, carboximetilcelulosa, derivados de celulosa, alginato, almidón, goma de xantano, goma arábiga, goma guar o sus mezclas. El coloide hidrofílico hinchable puede facilitar tanto la compactación de la composición como la dispersión de la mezcla de sólidos al contacto con agua. El material hinchable debe estar libre de contaminantes, en particular ácidos nucleicos animales, organismos genéticamente modificados y alérgenos. Además, el comprimido puede contener uno o más detergentes no caotrópicos y enzimas termoestables. El comprimido puede recubrirse opcionalmente con una película, preferiblemente hecha de celulosa, preferiblemente derivados de celulosa, la más preferida hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) para excluir la humedad y evitar residuos del comprimido.

El comprimido o la cápsula puede comprender una mezcla de sólidos compuesta de 10 a 25 por ciento en peso de partículas de silicato de magnesio hidratado insoluble en agua; de 45 a 70 por ciento en peso de sal tamponada con fosfato; y de 20 a 30 por ciento en peso de un coloide hidrofílico hinchable eficaz para asistir en la dispersión en agua de la mezcla de sólidos.

El método estándar para aislar ADN a partir de una diversidad de muestras para el posterior análisis por PCR puede comprender los siguientes pasos: se prepara una cantidad predefinida de peso o volumen de 10 a 100 g (ml) de la muestra usando una báscula o pipeta. La muestra puede disociarse preferiblemente usando un molinillo o mezclador que da como resultado pequeñas partículas, solución o dispersión. Una porción de 50 mg a 5 g de la muestra disociada puede pesarse con una balanza y, con una espátula, transferirse a un recipiente que tenga un seguro para evitar la contaminación y el derramamiento. Se puede agregar a la muestra una cantidad predefinida de la mezcla de sólidos de 50 mg a 1 g para obtener en el recipiente una relación de peso de sólidos de 1:5 a 5:1 de mezcla de sólidos a muestra. Una cantidad de agua, previamente calentada a una temperatura de 70 a 95 grados centígrados

5 usando un hervidor puede ser agregado para disolver los componentes del tampón de la mezcla de sólidos para obtener una solución salina tamponada acuosa con fosfato que tiene un pH de 5,5 a 7,0 y una concentración de sal de 0,6 a 1,2 Mol/L. La dispersión de la muestra y la mezcla de sólidos en tampón salino con fosfato se puede obtener agitando en vórtex o sacudiendo la muestra de 1 segundo a 120 segundos. Alternativamente, se puede usar un mezclador, preferiblemente un mezclador de pistón. La solución o dispersión se puede calentar a una temperatura de 70 a 95 grados Celsius usando cualquier baño de agua, bloque térmico, horno o cualquier otro aparato de calentamiento como un microondas. El tratamiento térmico puede tomar de 1 minuto a 30 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 5 minutos a 20 minutos, para liberar los ácidos nucleicos de los materiales celulares y otros componentes insolubles en agua de la muestra. Debido al exceso de sal y fosfato, incluso un tratamiento prolongado de los ácidos nucleicos a 95 grados Celsius demostró no tener ningún efecto adverso apreciable en la estabilidad del ADN, si se prueba posteriormente mediante PCR. Se considera que una liberación de ácidos nucleicos ha tenido lugar cuando las estructuras celulares (membranas, orgánulos, etc.) están tan alteradas que ya no se produce una interacción de ácidos nucleicos con proteínas estructurales, lípidos y polisacáridos. La diferencia osmótica creada por la solución hipertónica también promueve una liberación de los ácidos nucleicos a partir de los núcleos celulares. Las altas temperaturas no solo rompen las paredes celulares y conducen a una desnaturalización de proteínas; también provocan un aumento de la solubilización de lípidos y polisacáridos que, sin embargo, se adsorben y se precipitan en estado de unión sobre las partículas de silicato de magnesio insolubles en agua. Al menos, son adheridas principalmente por las partículas de silicato de magnesio hidratado insolubles en agua y menos por las paredes internas del recipiente. Una separación de la fase acuosa de la mezcla de sólidos junto con los componentes insolubles en agua se puede realizar preferiblemente por centrifugación (por ejemplo, centrífuga de mesa) o filtración (por ejemplo, filtros de celulosa). El sobrenadante acuoso o filtrado que contiene ácidos nucleicos solubles libres de inhibidores de la ADN polimerasa se puede pipetear o decantar en un recipiente limpio.

25 El método estándar de aislamiento de ácidos nucleicos normalmente sigue con un paso de desalinización, que puede llevarse a cabo usando cromatografía de exclusión por tamaño, ultrafiltración o cromatografía de afinidad, tal como una columna de extracción de ácidos nucleicos comercial basada en sílice. Alternativamente, la muestra de ácido nucleico puede diluirse de modo que la concentración de sal se reduzca a niveles aceptables y la muestra sea adecuada para el análisis por PCR.

30 Otro aspecto se refiere a un kit de partes para extracción y detección de ácidos nucleicos a partir de una muestra alimentaria y puede comprender un comprimido que comprende una cantidad conocida de una composición lista para usar (mezcla de sólidos) para extraer ácidos nucleicos de acuerdo con la presente descripción y, opcionalmente, uno o más tubos de reacción con reactivos sólidos o líquidos.

35 En una realización preferida de la descripción, la composición, el método y el kit de partes para la extracción de ácidos nucleicos se pueden usar para aislar y caracterizar ácidos nucleicos de materiales animales y vegetales crudos y/o procesados y sus productos procesados. Materia cruda animal y vegetal significa partes o fragmentos de los organismos de donde derivan, sin experimentar previamente disociación mecánica, tratamiento químico o térmico. El material animal y vegetal procesado y sus productos implica materia que ha sido disociada mecánicamente y/o tratada químicamente o térmicamente, de modo que su forma original y propiedades físicas han sido alteradas.

40 En otra realización preferida, la composición, el método y el kit de partes para la extracción de ácidos nucleicos pueden usarse para aislar ácidos nucleicos característicos de potenciales alérgenos presentes en cereales y sus productos, garbanzo y sus productos, caseína, almendra y sus productos, anacardo y sus productos, cacahuete y sus productos, avellana y sus productos, macadamia y sus productos, mostaza y sus productos, soja y sus productos, sésamo y sus productos, nueces y sus productos, pistachos y sus productos, altramuces y sus productos, apio y sus productos, pescado y sus productos, crustáceos y sus productos. Animales, plantas o microorganismos son fuentes de alérgenos biológicos. La composición, el método y el kit de partes pueden utilizarse además para aislar ácidos nucleicos característicos de organismos genéticamente modificados, patógenos, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Cronobacter*, *Clostridium spp.*, *Legionella spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia spp.* Un organismo modificado genéticamente (OMG) es un organismo tal como bacteria, levadura, insectos, plantas, peces y mamíferos, cuyo material genético ha sido cambiado usando técnicas de ingeniería genética. Un patógeno significa cualquier organismo tal como bacterias, hongos o protozoos que pueden inducir una enfermedad en su organismo huésped.

55 En otra realización preferida, la composición, el método y el kit de partes para la extracción de ácidos nucleicos se pueden usar para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras fecales, preferiblemente muestras fecales de animales y humanos.

60 La detección y cuantificación de material foráneo en muestras alimentarias mediante una reacción en cadena de la polimerasa es conocida por los expertos en la técnica. Sin embargo, la purificación de ácidos nucleicos a partir de matrices complejas requirió una adición de diversas enzimas de disrupción, disolventes orgánicos y tensioactivos. ADN suficientemente puro significa aquí "libre de inhibidores específicos de ADN polimerasa" de modo que se obtenga una amplificación del ADN extraído. La extracción de ADN y la eficacia de purificación se pueden describir

mediante el denominado umbral de ciclo (Ct), que es el número de reacciones de polimerasa necesarias para amplificar un molde de ADN en la muestra hasta el nivel de detección. Los valores más bajos de Ct significan un menor número de ciclos requeridos para amplificar el ADN molde y, por lo tanto, una mayor sensibilidad de detección.

- 5 Más allá del análisis de muestras de alimentos, también es posible la detección de pieles de animales domésticos (es decir, gatos, perros) en productos de prendas falsamente etiquetados. También otros materiales sólidos (por ejemplo, textiles, paños, etc.) pueden someterse eficazmente a una extracción de ácidos nucleicos como se ha descrito. La composición, el método y el kit de la descripción se pueden aplicar uniformemente a todos los tipos de muestras de alimentos, reduciendo considerablemente los pasos de extracción de ácidos nucleicos así como minimizando los errores de pipeteo y la contaminación. De manera más importante, se puede aplicar a matrices de muestras desconocidas y ya no es necesario usar diferentes métodos de purificación de ácidos nucleicos para la diversidad de muestras. En otras palabras, el método ya no debe probarse previamente en una muestra. El método de la presente descripción es sensible y reproducible para diferentes laboratorios y muestras, así como diferentes reacciones de PCR, permitiendo el establecimiento de curvas estándar para la determinación de ácidos nucleicos en una muestra a partir de animales, plantas, bacterias, organismos genéticamente modificados y alérgenos.

Otras realizaciones, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir del estudio de los ejemplos que se dan a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Composición para la extracción de ADN y comprimido de sal/talco

- 20 Talco de calidad farmacéutica en forma de polvo se utilizó para la preparación de los comprimidos de extracción de ADN. El talco tuvo un tamaño medio de partícula de 1,2 μm , un diámetro mediano D_{50} de 0,65 μm y una densidad de 2,8 g/cm^3 . El polvo de talco (silicato de magnesio hidratado) tuvo la siguiente composición; SiO_2 (61,5%), MgO (31,0%), CaO (0,4%), Fe_2O_3 (0,6%), (Al_2O_3) 0,5%, con un pH de 8,8. El segundo componente fue solución salina tamponada con fosfato de acuerdo a Dulbecco (1 x PBS = NaCl 137 mmol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L, KH_2PO_4 2 mmol/L) y se añadió como una sal microcristalina. Como agente de desintegración se usó celulosa microcristalina hinchable de calidad farmacéutica libre de contaminantes. Los tres componentes fueron comprimidos en un comprimido usando una prensa de estampado. El comprimido de "sal" tuvo un peso unitario total de 117 mg y consistió en partículas de talco; 20 mg (17,1%); sal cristalina de PBS; 68 mg (58,1%) celulosa hinchable, 29 mg (24,8%). El comprimido se dimensionó para la extracción de muestras de alimentos en aproximadamente 200 mg.

Ejemplo 2- Extracción de ADN de muestras de alimentos complejos ("Protocolo de sal")

- 35 *Extracción de ADN:* 10 g de muestra (salchicha Bockwurst en tripa, desayuno de agricultor (tipo de jamón), salchicha roja, pizza con salami, salsa boloñesa, salchicha ahumada, pollo cordon bleu, sopa de fideos con pollo y alimento para animales) se homogeneizaron mecánicamente usando un molinillo con cuchillas giratorias. Cuando la muestra molida se volvió líquida se homogeneizó adicionalmente usando un homogeneizador de vidrio con un pistón. Se transfirieron 200 mg de muestra homogénea a un tubo Eppendorf de 2 ml usando una pipeta o espátula. Se añadió un (1) comprimido de extracción de muestra del ejemplo 1 junto con 1 ml de agua destilada. La concentración de PBS en la solución de muestra resultante fue aproximadamente 5 veces. El tubo se sometió a vórtex durante 5 segundos y se colocó en un baño de agua a 95 grados Celsius durante 20 minutos. Después de la centrifugación a 14.000 rpm, a temperatura ambiente durante 5 minutos, el sedimento con el precipitado se descartó y el sobrenadante claro se usó para análisis adicionales.

- 45 *Desalinización:* el sobrenadante se desalinizó utilizando una columna de afinidad de ADN (Centrispin, Genaxxon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron 100 ml de sobrenadante a 500 μL de tampón de unión y el volumen (600 μL) se cargó en una columna de centrifugación de ADN equilibrada, seguido de 14.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. El flujo circulado se descartó, la columna se lavó con 700 μL de tampón de lavado y la muestra de ADN se eluyó con 50 μL de tampón de elución.

Ejemplo 3 - Extracción CTAB convencional de ADN

- 50 Con fines comparativos, las mismas muestras homogenizadas también se sometieron a extracción de ADN utilizando el protocolo CTAB de extracción de ADN. Para este fin, 100 ml tampón de lisis CTAB se preparó mezclando 2,0 g de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), 10,0 ml de Tris 1M, pH 8,0, 4,0 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0, 28,0 ml de NaCl 5 M, 40,0 ml H_2O . El pH se ajustó con HCl a pH 8,0 y se añadió agua destilada hasta un volumen de 100 ml. Se mezclaron 2 g de muestra homogeneizada con 10 ml de tampón de lisis de CTAB y 25 μL de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó durante la noche a 60 grados Celsius bajo agitación suave. Después de la centrifugación a 4.000 g a temperatura ambiente durante 5 minutos, el primer sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 14.000 g, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se extrajo el sobrenadante con un volumen igual de cloroformo. 600 μL de fase acuosa se mezclaron con 1,2 ml de tampón de precipitación CTAB (5 g/L de CTAB, 0,04 mol/L de NaCl), el ADN precipitó a temperatura ambiente durante 60

minutos, seguido de centrifugación a 14.000 g, a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el sedimento de ADN recogido en 350 µL de solución de NaCl 1,2 mol/L. Después de otra extracción con 350 µL de cloroformo, el ADN en la fase acuosa volvió a precipitarse con isopropanol a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el sedimento de ADN se centrifugó con 500 µL de etanol al 70% frío y se secó a temperatura ambiente. El sedimento de ADN seco se disolvió en 100 µl de TE 0,1x. RT-PCR y la determinación del valor de Ct se realizaron como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 4 - PCR en tiempo real, valor de Ct y evaluación de la inhibición de PCR

RT-PCR se realizó utilizando el instrumento RotorGene (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó en un volumen de 20 µL que comprende 10 µL 2x SensiFAST™ Multiplex Master Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde, DE), ADN de referencia 200 nM, cebadores 400 nM y 10 µL de extracto de ADN. El SensiFast Multiplex MasterMix consta de un sistema tampón, Mg²⁺, los cuatro dNTP y la ADN polimerasa. El termociclador para PCR se programó con un paso inicial de incubación a 95°C durante 5 minutos seguido de 45 ciclos de incubación a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 10 segundos. La PCR se llevó a cabo en duplicados. El valor de Ct fue determinado por el software RotorGene usando un umbral de 0,02.

Para la evaluación de la inhibición de PCR (control de inhibición), se añadieron 2 ng de ADN extraído y preparado de acuerdo al ejemplo 2 ("Sal") o al ejemplo convencional 3 (CTAB) a partir de carne de cerdo, pollo, pavo, rumiante, etc. en un volumen de 10 µL sin primers. De lo contrario, se agregaron cebadores específicos para la detección del ADN diana de cerdo, vaca, pollo, pavo, rumiante.

La inhibición relativa de PCR por la muestra puede obtenerse de los valores de Ct para la amplificación de ADN de referencia (control de inhibición). Los resultados se muestran en la tabla 1.

TABLA 1

		Sistema de ensayo	Sistema de ensayo	Control de inhibición	Control de inhibición
Matriz	Especie	Ct Sal	Ct CTAB	Ct Sal	Ct CTAB
Salchicha Bockwurst en tripa	Cerdo	18,13	22,20	30,35	29,55
Desayuno de agricultor	Cerdo	18,93	23,04	29,49	29,39
Salchicha roja	Cerdo	20,86	24,99	31,76	29,75
Pizza Salami	Cerdo	19,83	22,01	28,32	28,23
Salsa boloñesa	Vaca	31,32	34,97	30,61	30,80
Salchicha ahumada	Vaca	22,65	25,84	30,41	30,95
Cordon bleu de pollo	Pollo	20,71	21,73	28,52	29,70
Sopa de fideos con pollo	Pollo	20,00	22,12	28,81	28,57
Cordon bleu de pollo	Pavo	20,09	21,84	28,83	28,85
Alimento animal	Rumiante	32,79	32,26	31,36	31,49

Los experimentos de control de inhibición muestran valores de Ct muy similares independientemente de la matriz de muestra a partir de la cual se preparó el ADN e independientemente del método de purificación (ejemplo 2 "Sal" o ejemplo 3 "CTAB").

Los resultados sugieren que los métodos de purificación de ADN aquí descritos (talco/sal PBS y protocolo CTAB) son equivalentes y se pueden usar para muchas matrices de alimentos diferentes, ya que resultan en sondas de ADN equivalentes en términos de sus propiedades de amplificación ("sin inhibición de la ADN polimerasa"). Esto confirma el alto rendimiento y la viabilidad del protocolo de extracción de talco/sal PBS, mientras que es más rápido (la extracción y RT PCR se puede hacer el mismo día), menos laborioso y no requiere el uso de productos químicos caros y desagradables. No se requieren caotrópicos químicos como CTAB o urea y no se deben realizar extracciones con solventes orgánicos como el cloroformo que requieren el uso de una campana extractora de laboratorio por razones de salud.

Lo que es más importante, la calidad del ADN diana (probado en cerdo, pollo, pavo, vaca o rumiante) fue regularmente mejor, independientemente de la matriz alimentaria original, cuando se usó el protocolo de talco/PBS. Si bien las soluciones de muestra fueron equivalentes con respecto a la cantidad de inhibidores de la PCR, los bajos valores de Ct para el ADN diana sugieren que el ADN diana aislado de acuerdo al ejemplo 2 puede haber tenido una calidad superior que el ADN extraído y purificado de acuerdo al protocolo CTAB.

Ejemplo 5 - Efectos del talco

Harina de soja, lecitina de soja y condimento comercial se homogeneizaron como se ha descrito y se extrajo y se aisló el ADN de muestra de acuerdo al método del ejemplo 2. Para comparar, solo se añadió celulosa y sal PBS (*sin talco*). Después de la centrifugación, se observaron dos fases bien definidas en las preparaciones de ADN con talco/PBS añadido, es decir, un sobrenadante claro y un sedimento precipitado definido, mientras que el

sobrenadante en la preparación sin talco todavía estaba turbio. El sobrenadante se usó en cada caso para la purificación de ADN como se ha descrito. PCR en tiempo real y los valores de Ct para el ADN de soja y de apio se determinaron como se ha descrito anteriormente. Para los resultados, véase la tabla 2.

TABLA 2

Matriz	Parámetro PCR	Sin talco	Con talco
Harina de soja	Soja	21,7	21,1
Lecitina de soja	Soja	33,5	30,7
Condimento	Apio	25,5	25,1

5 En cada caso, el talco añadido había adsorbido y precipitado inhibidores de la ADN polimerasa presentes en la matriz de lecitina o el condimento como se muestra en la valores más bajos de Ct. La adición de talco facilita aún más el manejo de muestras que contienen muchos fosfolípidos, ácidos grasos y triglicéridos.

Ejemplo 6 - Extracción de ADN a partir de lecitina de soja

10 La lecitina de soja se homogeneizó y se extrajo y purificó el ADN como se describe en el ejemplo 2 (talco/sal PBS) o el ejemplo comparativo 3 (CTAB). El rendimiento de ADN se analizó midiendo la DO a 280 nm y la relación de OD a 260 nm/280 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

	Sal/Talco	CTAB
Valor DO 260nm	0,017	0,118
Relación 260nm/280nm	-3,2	1.67
Concentración de ADN	0,9 ng/μL	5,9 ng/μL

15 El protocolo CTAB dió un mayor rendimiento y pureza de ADN (proteína/ADN). Sin embargo, estas ventajas no se mantuvieron cuando el ADN se sometió a análisis de PCR.

20 La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el ejemplo 4. El ADN diana fue para contaminación con soja Roundup Ready™ modificada genéticamente, es decir, se agregaron pares de cebadores para la detección de 35S (promotor 35S, originado a partir del virus del mosaico de la coliflor), nos (nopalina sintasa-terminador, derivado de *Agrobacterium tumefaciens*), RRS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, obtenida de la cepa CP4 de *A. tumefaciens*). Las condiciones de control de la inhibición de la PCR se realizaron como se describe en el Ejemplo 4. Consúltense la tabla 4 para los resultados.

TABLA 4

	Sistema de ensayo	Sistema de ensayo	Control de inhibición	Control de inhibición
Gen de ensayo	Valor Ct Sal	Valor Ct CTAB	Valor Ct Sal	Valor Ct CTAB
Soja	28,67	31,64	29,5	31,2
35S	36,78	37,85	29,42	32,19
NOS	39,53	39,09	29,83	31,6
RRS	39,54	34,93	30,32	30,36

30 Nuevamente, los experimentos de control de inhibición dieron como resultado valores de Ct similares. Si bien no se encontraron diferencias importantes, la inhibición ligeramente mayor en las muestras preparadas de acuerdo al protocolo CTAB sugiere que trazas del CTAB añadido, que también tiene actividad inhibitoria de la ADN polimerasa, podrían haber estado presentes en esas muestras, mientras que el talco y la sal de PBS pueden eliminarse más fácilmente y de forma segura.

35 El protocolo talco/PBS resultó en valores de Ct generalmente más bajos que el protocolo CTAB. A pesar de los rendimientos de ADN más bajos con el protocolo de talco/PBS (véase la tabla 2), los valores de Ct para los transgenes analizados fueron equivalentes para ambos métodos de extracción de ADN. Los valores de Ct fueron diferentes para los diversos genes investigados, lo que indica diferentes cantidades de contaminación.

Ejemplo 7- Detección de organismos genéticamente modificados en cereales y plantas

40 Se analizaron granos de maíz, proteína aislada de soja, soja, pan tostado multicereal, harina de mostaza, semillas de colza y alimento animal como se ha descrito anteriormente. Se añadieron cebadores para la detección de 35S,

RRS, FMV (promotor del virus figwort de mosaico), nos, Ctp2 (GTP2-CP4EPSPS, intersección del péptido de tránsito de cloroplastos a 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa; de *Arabidopsis thaliana* y *Agrobacterium sp.* resistencia al herbicida Roundup Ready) y CAMV (CaMV, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor). Véase tabla 5 para los resultados.

5

TABLA 5

Matriz	Gen	Sistema de ensayo	Sistema de ensayo	Control de inhibición	Control de inhibición
		Ct Sal	Ct CTAB	Ct Sal	Ct CTAB
Maiz	35S	29,27	30,59	29,61	29,48
Proteína de soja	RRS	31,36	34,69	31,46	31,34
Soja	FMV	36,98	38,21	31,44	33,24
Tostada multicereal	nos	27,40	26,91	30,70	29,58
Harina de mostaza	Ctp2	33,40	34,10	30,27	31,42
Semilla de colza	35S	33,28	37,44	30,02	29,10
Alimento animal	CAMV	30,19	30,48	29,99	30,53

10

Los controles de inhibición dieron nuevamente valores de Ct similares para el ADN de referencia, de modo que ambos métodos de extracción de ADN pudieron usarse con todas las matrices de muestras probadas. Sin embargo, los valores de Ct obtenidos para los ADN diana sugieren que el ADN purificado utilizando talco/sal PBS generalmente está más intacto ("rendimiento de ADN de mejor calidad") que el ADN preparado a partir de una matriz de muestra usando el protocolo de extracción CTAB.

Ejemplo 8 - Extracción de ADN a partir de vegetales complejos/muestras de plantas

15

Pasta de almendra cruda, galletas (sin aromatizantes), arroz crujiente, mezcla de semillas de amapola y pasta de avellana oscura fueron examinados. La muestra de ADN se extrajo y se purificó como se ha descrito. Los resultados se muestran en la tabla 6.

TABLA 6

Matriz	Especies	Sistema de ensayo	Sistema de ensayo	Control de inhibición	Control de inhibición
		Ct Sal	Ct CTAB	Ct Sal	Ct CTAB
Pasta de almendra cruda	Almendra	21,94	22,20	28,94	30,80
Galleta (sin aromatizantes)	Almendra	25,94	27,03	32,17	32,79
Arroz crujiente	Maíz	20,62	21,34	27,71	28,23
Mezcla de semillas de amapola	Maíz	29,16	27,79	30,78	31,74
Pasta de avellana oscura	Soja	38,36	No Ct	31,55	33,23

20

Los valores de Ct para el ADN de referencia volvieron a ser similares para todas las preparaciones de muestras y matrices alimentarias, mientras que de nuevo notamos menos inhibición en las muestras preparadas de acuerdo al protocolo de talco/sal PBS. Los resultados sugieren aún mejor calidad de rendimiento de ADN con el protocolo de talco/sal PBS que con el protocolo CTAB ya que trazas de soja eran detectables en la "pasta de avellana oscura" probada que no se encontraron en la preparación comparativa de ADN utilizando el protocolo CTAB.

Ejemplo 9 - Detección basada en ADN de alérgenos en muestras de alimentos

25

Leche para untar que comprende copos de chocolate y avellanas, agente de pulverización para carne de cerdo ahumada, pulpa de avellana (tratada térmicamente a 166°C), hisopo, almendra (molida, pedazos de tamaño 1-2 mm), perejil (molido), mezcla de condimentos y salmón gratinado se analizaron para detectar ADN de fuentes típicas de alérgenos (avellana, mostaza, nuez pecana, pescado, cacahuete y apio). Los valores de extracción de ADN, RT-PCR y Ct fueron análogos a los de los ejemplos 2, 3 y 4. Los resultados se muestran en la tabla 7.

TABLA 7

Matriz	Alérgeno	Sistema de ensayo	Sistema de ensayo	Control de inhibición	Control de inhibición
		Ct Sal	Ct CTAB	Ct Sal	Ct CTAB
Leche para untar con copos de chocolate y avellanas	Avellana	29,95	28,07	31,72	32,48
Agente de pulverización para carne de cerdo	Mostaza	38,19	38,78	32,44	31,85

ahumada					
Pulpa de avellana (tratada térmicamente a 166 °C)	Pecana	37,73	40,71	32,35	32,69
Hisopo	Pescado	31,91	32,89	26,74	32,11
Almendra (molida, pedazos de tamaño 1-2 mm)	Cacahuete	31,47	34,04	34,59	37,31
Perejil (molido)	Apio	27,02	24,65	32,09	31,78
Mezcla de condimentos	Mostaza	24,49	No Ct	32,80	No Ct
Salmón gratinado	Pescado	26,74	32,11	31,91	32,89

Los valores de Ct para la referencia interna de ADN (control de inhibición) fueron similares en todas las matrices alimentarias, excepto en la mezcla de condimentos. Los resultados nuevamente sugieren una mejor calidad del rendimiento de ADN con el protocolo de talco/PBS ya que ni ADN de mostaza ni ADN de referencia fue detectable en la mezcla de condimentos cuando se extrajo usando el protocolo CTAB.

5

Ejemplo 10 - Sensibilidad y linealidad

Muestras de harina de maíz con cantidades conocidas de mostaza (1, 10, 10², 10³ y 10⁴ ppm) se procesaron como se describe en el ejemplo 2 y los valores de Ct determinados para ADN de a) mostaza normal y b) mostaza amarilla (ver figura 1) como se ha descrito. Lo mismo fue hecho también para muestras de mayonesa con cantidades conocidas de mostaza (1, 10, 10², 10³ y 10⁴ ppm). Todas las mediciones de Ct se realizaron por duplicado y el valor promedio se usó para calcular la linealidad y la sensibilidad de la detección. Los resultados se muestran en la tabla 8.

10

TABLA 8

Parámetro Matriz	Mostaza		Mostaza amarilla		Log ppm
	Valor Ct CTAB	Valor Ct SAL	Valor Ct CTAB	Valor Ct SAL	
Mostaza en harina de maíz 10000 ppm	12,62	15,55	23,97	25,96	4
Mostaza en harina de maíz 1000 ppm	16,14	18,04	27,22	28,74	3
Mostaza en harina de maíz 100 ppm	19,26	21,53	30,06	33,1	2
Mostaza en harina de maíz 10 ppm	21,46	25,09	32,78	35,11	1
Mostaza en harina de maíz 1 ppm	25,22	28,88			0
Mostaza en mayonesa 10000 ppm	8,33	12,08	20,1	23,23	4
Mostaza en mayonesa 1000 ppm	11,6	14,92	23,23	26,05	3
Mostaza en mayonesa 100 ppm	15,08	18,04	26,42	29,41	2
Mostaza en mayonesa 10 ppm	18,44	20,42	29,97	32,23	1
Mostaza en mayonesa 1 ppm	21,03	24,10	32,51	36,38	0

15

Los valores de Ct para la presencia de mostaza o mostaza amarilla en harina de maíz y mayonesa se han representado en las figuras 1 y 2. Los resultados muestran un comportamiento lineal de detección de ADN por PCR en tiempo real, cuando el ADN se extrajo y purificó de acuerdo al protocolo de talco/sal. La linealidad fue comparable a las muestras extraídas con CTAB. Es importante destacar que esto se encontró para dos matrices alimentarias muy diferentes, a saber, harina de maíz, que es rica en polisacáridos, y mayonesa, que tiene un alto contenido de lípidos, ácidos grasos y aceite. La extracción con comprimidos de talco/sal permitió una detección de cantidades extremadamente bajas de contaminantes, hasta 1 ppm. Si bien la sensibilidad de detección fue algo menor, esta fue comparable a la de CTAB. El comportamiento lineal, por lo tanto, permite el establecimiento de curvas estándar que hace posible una estimación, con gran confianza, de la cantidad absoluta de contaminantes dentro de una matriz alimentaria.

20

25

Ejemplo 11 - Determinación cuantitativa de material foráneo en muestras alimentarias

Se obtuvo ADN de albóndiga, semilla de colza, hojaldre, salchicha, sémola de trigo duro y harina de trigo duro como se describe en los ejemplos 2 y 3. Se identificaron materiales foráneos utilizando cebadores específicos para búfalo, GT73 (marcador de semilla de colza genéticamente modificada, RRS, cerdo y trigo). Se seleccionó un gen estándar correspondiente y cebadores específicos se utilizaron en cada condición. Se determinó el porcentaje relativo de ADN foráneo en la muestra de ADN total para diferentes matrices alimentarias usando una preparación de ADN convencional y la descrita aquí. Se muestran los resultados. en la tabla 9.

30

TABLA 9

Matriz	Parámetro PCR	SAL	CTAB
Albóndiga	Búfalo	0,02%	0,02%
Semilla de colza	GT73	0,03%	0,03%
Semilla de colza	GT73	0,77%	0,61%
Hojaldre	RRS	0,18%	0,19%
Salchicha	Cerdo	1,88%	1,97%
Salchicha	Cerdo	0,15%	0,33%
Sémola de trigo duro	Trigo	19%	12%
Harina de trigo duro	Trigo	5,10%	5,20%

5 Los resultados en la tabla 9 confirman una detección sensible y cuantitativa de materiales foráneos cuando las matrices de muestras fueron procesadas y trabajadas de acuerdo al protocolo de talco/sal. Los valores obtenidos son muy similares para cualquiera de los protocolos de extracción y purificación. Se observa una sensibilidad de detección constante para las matrices de muestra dadas.

Ejemplo 12 - Determinación cuantitativa de ADN de OMG en alimentos para animales

10 Muestras de 12 diferentes alimentos para animales comercialmente disponibles se analizaron en base a su ADN como se describió anteriormente. Se usaron cebadores para soja genéticamente modificada y el gen RRS. Cebadores para un gen estándar se eligieron para cuantificar el ADN total. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 10.

TABLA 10

Matriz	Parámetro PCR	SAL	CTAB
Alimento animal 1	MON89788	0,16%	0,10%
Alimento animal 2	RRS	0,14%	0,1
Alimento animal 3	RRS	42%	54%
Alimento animal 4	RRS	0,10%	0,13%
Alimento animal 5	RRS	0,11%	0,09%
Alimento animal 6	RRS	0,35%	0,46%
Alimento animal 7	RRS	0,04%	0,07%
Alimento animal 8	RRS	0,73%	0,85%
Alimento animal 9	RRS	49%	47%
Alimento animal 10	RRS	49%	57%
Alimento animal 11	RRS	62%	58%
Alimento animal 12	RRS	43%	47%

15 Los resultados confirman que el método de extracción de ADN basado en talco/sal proporciona una muestra que puede usarse de manera segura para determinar el contenido relativo de materiales biológicos en matrices alimentarias altamente procesadas.

Ejemplo 13 - Extracción de ADN bacteriano y detección a partir de cultivos de enriquecimiento de alimentos

20 Los cultivos de preenriquecimiento se prepararon inoculando 225 ml de caldo de agua de peptona tamponada (BPW) (relación 1:9), calentados a 37°C, con una sonda. Las sondas probadas fueron un trapo/paño (tejido Kleenex™), agua del circuito de refrigeración, chocolate, cobertura de chocolate negro, agua potable, vaca (*round robin* 01-03), sésamo, cebolla, salchicha mettwurst, productos lácteos, carne de pato en tiras, pechuga de pollo, carne de pato marinada, leche entera y carne de muslo de pavo. El cultivo de enriquecimiento se incubó a 37°C durante 18 horas en agitación. Se mezclaron 900 µL de cultivo de enriquecimiento con 100 µL de una dilución de un cultivo nocturno de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter* spp., y *Campylobacter* spp., así que
25 contenía 10³ unidades formadoras de colonias (ufc) por condición experimental. 200 µL de cultivo post-inóculo (200 cfu) se sometieron a extracción de ADN de acuerdo a los ejemplos 2 o 3. Cuando se extrae de acuerdo al protocolo talco/sal, el procedimiento siguió como se ha descrito hasta el primer paso de centrifugación. Sin embargo, una dilución (1:20) del sobrenadante se sometió directamente a análisis de PCR. RT-PCR y los valores de Ct se
30 determinaron como en el ejemplo 4. Se usaron cebadores específicos para la detección de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter* spp. y *Campylobacter* spp..

En el caso de la extracción comparativa con CTAB, la solución para la extracción de ADN bacteriano contenía CTAB al 2%, 100 ml Tris-HCl, pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, 0,2% β-mercaptoetanol, 0,1 mg proteinasa K. Se añadieron 0,8 ml de tampón CTAB a 60°C a 200 ml de muestra de cultivo enriquecido y se incubaron a 60°C durante 1 hora con movimiento regular cada 10 minutos. Se agregaron 0,8 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezclaron

durante 2 minutos, seguido de centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, para obtener dos fases. Se retiró la fase acuosa clara superior sobre una capa de interfaz blanca y se usó para la purificación y desalinización del ADN como se describe en el ejemplo 2. La determinación cualitativa de RT-PCR y del valor de Ct se realizó como se describe en el ejemplo 4. Los resultados se muestran en la tabla 11. Los valores de Ct de los sistemas de ensayo indican si el ADN del patógeno respectivo estaba presente o no en la muestra tomada.

5

TABLA 11

		Sistema de ensayo	Sistema de ensayo	Control de inhibición	Control de inhibición
Matriz	Patógeno	Ct Sal	Ct CTAB	Ct Sal	Ct CTAB
Paño	<i>Salmonella spp.</i>	33,23	36,55	28,89	31,06
Paño	<i>Salmonella spp.</i>	31,96	31,66	29,59	29,17
Agua del circuito de refrigeración	<i>Salmonella spp.</i>	25,90	27,02	29,84	30,44
Chocolate	<i>Salmonella spp.</i>	20,48	18,97	27,83	28,25
Cobertura de chocolate negro	<i>Salmonella spp.</i>	23,66	21,68	29,25	27,99
Agua potable	<i>Salmonella spp.</i>	26,91	27,90	29,44	29,90
Ensayo Round robin 01	<i>Salmonella spp.</i>	18,79	19,76	27,73	29,32
Ensayo Round robin 02	<i>Salmonella spp.</i>	17,54	20,88	28,71	27,8
Ensayo Round robin 03	<i>Salmonella spp.</i>	17,40	20,88	27,31	28,47
Sésamo	<i>Salmonella spp.</i>	25,27	30,13	31,06	28,32
Salchicha mettwurst	<i>Salmonella spp.</i>	32,00	30,56	29,32	30,23
Producto lácteo	<i>L. monocytogenes</i>	no Ct	No Ct	28,92	29,52
Carne de pato en tiras	<i>L. monocytogenes</i>	30,41	30,64	29,89	30,85
Pechuga de pavo	<i>L. monocytogenes</i>	21,96	34,16	30,21	30,29
Carne de pato marinada	<i>L. monocytogenes</i>	33,66	35,53	29,02	31,33
Producto lácteo	<i>Cronobacter spp.</i>	37,86	42,00	28,33	28,94
Producto lácteo	<i>Cronobacter spp.</i>	35,32	36,47	28,99	28,88
Leche entera	<i>Campylobacter spp.</i>	23,19	30,50	27,90	31,63
Leche entera	<i>Campylobacter spp.</i>	18,96	23,46	27,63	29,48
Pavo	<i>Campylobacter spp.</i>	17,33	19,10	28,02	29,03

Los valores de Ct para el ADN de referencia ("control de inhibición") confirman la calidad del método de extracción, es decir, que la reacción de RT-PCR no fue inhibida por los inhibidores de la ADN polimerasa a partir de la matriz de alimentos extraídos. Un valor de Ct reducido en el sistema de ensayo indicaría que la muestra estaba contaminada con patógeno. En esencia, el método CTAB produjo resultados muy similares al protocolo talco/sal. El ADN preparado usando el protocolo de talco/sal generalmente tuvo una calidad superior en comparación con el método CTAB, con la única excepción del "chocolate negro" que es rico en polifenoles y catequinas. Sin embargo, se contempla una extracción opcional después de la extracción de talco/sal PBS antes de la desalinización del ADN. No obstante, el protocolo de talco/sal resultó ser totalmente satisfactorio para esta matriz alimentaria tradicionalmente difícil.

10

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para uso en la extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras alimentarias caracterizada en que la composición es una mezcla de sólidos que comprende de 10 a 40 por ciento en peso de partículas que consisten en silicato de magnesio hidratado insoluble en agua y que tienen un tamaño mediano de partícula de 0,8 a 2,5 µm, y de 20 a 70 por ciento en peso de solución salina cristalina tamponada con fosfato que es fácilmente soluble en agua para producir una solución que tiene un pH de 5,5 a 7,0 a 70 hasta 95 grados Celsius.
- 10 2. Composición como reivindicada en la reivindicación 1, en la que la mezcla de sólidos se ha porcionado como un comprimido o una cápsula que tiene un peso predefinido conocido.
- 15 3. Composición como reivindicada en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que además comprende de 20 a 35 por ciento en peso de un coloide hidrófilo eficaz para dispersar la mezcla de sólidos en agua.
- 20 4. Composición como reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 3, que comprende partículas de silicato de magnesio hidratado que tienen un tamaño mediano de partícula de 1,0 a 2,0 µm, preferiblemente de 1,2 a 1,5 µm.
- 25 5. Comprimido o cápsula que comprende esencialmente una composición como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende de 10 a 25 por ciento en peso de partículas de silicato de magnesio hidratado insoluble en agua; de 45 a 70 por ciento en peso de solución salina tamponada con fosfato, y de 20 a 30 por ciento en peso de un coloide hidrófilo eficaz para dispersar la mezcla de sólidos en agua.
- 30 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende uno o más agentes de lisis no caotrópicos.
- 35 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el coloide hidrófilo es celulosa, carboximetilcelulosa, derivados de celulosa, alginato, almidón, goma de xantano, goma arábiga, goma de guar o mezclas de los mismos.
- 40 8. Método estándar de aislar ADN a partir de una diversidad de alimentos para animales y muestras alimentarias, incluyendo bebidas, para el posterior análisis de PCR, que comprende los siguientes pasos:
 - 45 obtener una cantidad predefinida de peso o volumen de la muestra, preferiblemente como partículas pequeñas, solución o dispersión, y transferir la muestra a un recipiente;
 - añadir una cantidad predefinida de la mezcla de sólidos contenida en la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el comprimido o la cápsula de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para obtener en el recipiente una relación en peso de sólidos a muestra de 1:5 a 5:1;
 - añadir además una cantidad de agua para disolver los componentes del tampón de la mezcla de sólidos para obtener una solución salina acuosa tamponada con fosfato que tiene un pH de 5,5 a 7,0 y una concentración de sal de 0,6 a 1,2 Mol/L,
 - 50 obtener una dispersión de la muestra y la mezcla de sólidos en solución salina tamponada con fosfato y calentar la solución o dispersión hasta una temperatura de 70 a 95 grados Celsius durante 1 minuto a 30 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 5 minutos a 20 minutos, para liberar los ácidos nucleicos de los materiales celulares y otros componentes insolubles en agua de la muestra;
 - separar de la fase acuosa los componentes insolubles en agua de la muestra y de las mezclas de sólidos, preferiblemente mediante centrifugación o filtración, junto con los componentes adsorbidos a las partículas de silicato de magnesio de la mezcla de sólidos;
 - 55 retirar el sobrenadante acuoso o filtrado que contiene ácidos nucleicos solubles, seguido de un paso de desalinización para obtener una solución de ADN de la muestra adecuada para el análisis de PCR.
- 60 9. Kit de partes para extraer y purificar ácidos nucleicos de muestras, que comprende cantidades porcionadas de la composición reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 4 o el comprimido o la cápsula que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes 5 a 7.

10. Uso de la composición, el comprimido o la cápsula, el método y el kit de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para aislar y caracterizar el tipo de ácidos nucleicos de materiales animales y vegetales crudos y/o procesados y sus productos procesados.
- 5 11. Uso de la composición, el comprimido o la cápsula, el método y el kit de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para aislar los ácidos nucleicos característicos de posibles alérgenos presentes en cereales y sus productos, garbanzo y sus productos, caseína, almendra y sus productos, anacardo y sus productos, cacahuete y sus productos, avellana y sus productos, macadamia y sus productos, mostaza y sus productos, soja y sus productos, sésamo y sus productos, nuez y sus productos, pistacho y sus productos, altramuz y sus productos, apio y sus productos, pescado y sus productos, crustáceos y sus productos.
- 10
12. Uso de la composición, el comprimido o la cápsula, el método y el kit de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para aislar los ácidos nucleicos característicos de organismos genéticamente modificados, patógenos, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Cronobacter*, *Clostridium* spp., *Legionella* spp., *Enterobacteriaceae*, *Escherichia* spp.
- 15
13. Uso de la composición, el comprimido o la cápsula, el método y el kit de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras fecales, preferiblemente muestras fecales humanas y de animales.
- 20

Fig. 1

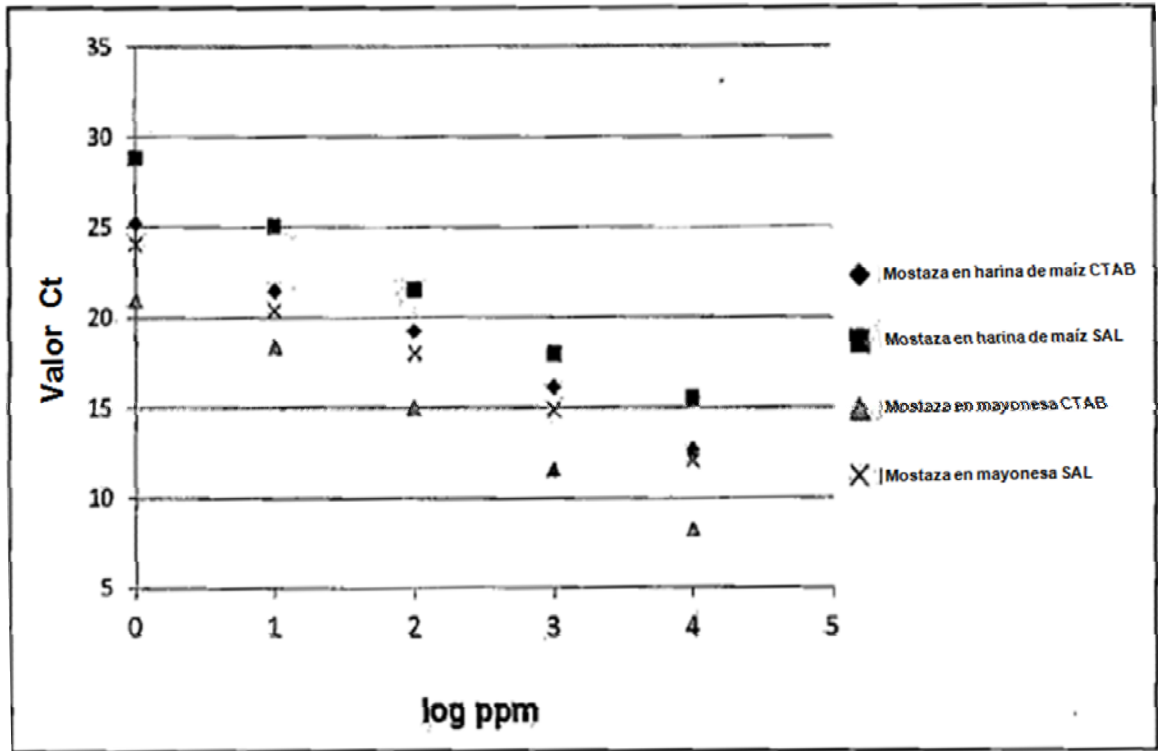


Fig. 2

