

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 053**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2015 PCT/US2015/048628**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16037099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2015 E 15838130 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3189163**

54 Título: **Extracción de ácido nucleico usando disolventes orgánicos para eliminar inhibidores**

30 Prioridad:

04.09.2014 US 201462045888 P
03.09.2015 US 201514845124

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2020

73 Titular/es:

TECHLAB, INC. (100.0%)
2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060, US

72 Inventor/es:

CHEN, LI;
STEVENS, JODIE;
SCHWAB, KRISTEN;
BOONE, JAMES y
LYERLY, DAVID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 769 053 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).

DESCRIPCION

Extracción de ácido nucleico usando disolventes orgánicos para eliminar inhibidores

Antecedentes de la invención.

5 La prueba de amplificación del ácido nucleico (NAAT: Nucleic Acid Amplification Test) se ha utilizado mucho en los diagnósticos moleculares actuales, incluidas las enfermedades infecciosas, la oncología y la farmacogenómica. Proporciona un resultado fácil de usar y preciso y requiere menos tiempo en comparación con los métodos de diagnóstico tradicionales. Para realizar estudios de diagnóstico molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación isotérmica, los ácidos nucleicos se extraen de materiales biológicos, como muestras de heces y muestras de sangre. Se ha desarrollado una amplia serie de métodos para la extracción de ácido nucleico, produciendo numerosas compensaciones entre costes, facilidad de uso, tiempo requerido, materiales que incluyen sustancias químicas peligrosas utilizadas, y cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos.

10 Los métodos disponibles actualmente requieren largas digestiones enzimáticas, incubaciones, separación y precipitación o elución de ácidos nucleicos. También una etapa de ebullición es el método más común utilizado para preparaciones crudas de ácido nucleico. En muchos casos, la calidad y cantidad de los ácidos nucleicos aislados no son utilizables en aplicaciones posteriores, como la amplificación de ácidos nucleicos. La preparación de muestras de ácido nucleico antes de la amplificación y detección de dianas específicas es el paso más comprometido del diagnóstico molecular, porque una amplia variedad de compuestos presentes en muestras biológicas pueden degradar y desnaturalizar la ADN polimerasa, o reducir la actividad enzimática de la ADN polimerasa en una PCR o en una reacción de amplificación isotérmica. Por lo tanto, un método óptimo de purificación de ácido nucleico puede reducir o eliminar la inhibición de la amplificación por componentes de muestras biológicas para lograr una amplificación exitosa. Se necesitan métodos simples y rápidos que no precisen un procesamiento de muestras extenso y que puedan adaptarse a un laboratorio clínico para producir ácidos nucleicos de calidad libres de inhibidores de amplificación.

15 El documento EP 1660449 puede ser útil para la comprensión de la invención y describe un *kit* de reactivos para preparar la solución de muestra para la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, y un método para detectar ácidos nucleicos usando una solución de tratamiento, en donde la solución de tratamiento comprende sulfóxido de dimetilo y disolvente acuoso.

Sumario de la invención.

20 La presente invención reivindicada se refiere a un método para tratar la muestra para la extracción de ácido nucleico. Más específicamente, la presente invención reivindicada se refiere a un método para usar bajas concentraciones de disolventes orgánicos comunes para eliminar inhibidores de la amplificación del ácido nucleico. La invención reivindicada se puede usar para extraer ácidos nucleicos (ADN/ARN) de bacterias, virus, parásitos y otros materiales biológicos o matrices, que incluyen, entre otras, muestras de heces, fluidos corporales, plantas y cultivos. El método descrito en el presente documento es rápido, de bajo costo y fácil de usar en el marco de un laboratorio. El ácido nucleico extraído de acuerdo con la invención reivindicada puede usarse para reacciones de amplificación del ácido nucleico. El objeto de la invención reivindicada es proporcionar un método óptimo de purificación del ácido nucleico para reducir o eliminar la inhibición de la amplificación por componentes de muestras biológicas para conseguir una amplificación con éxito.

25 De acuerdo con la invención, se proporciona un método para el tratamiento de una muestra biológica para la extracción del ácido nucleico. El método comprende: diluir una muestra biológica en un tampón de extracción para formar una mezcla, en donde el tampón de extracción comprende del 3% en peso al 10% en peso de disolvente orgánico, en donde dicho disolvente orgánico es acetona o etanol; incubar la mezcla a una temperatura de 15 °C a 35 °C durante un tiempo entre cinco segundos y treinta minutos, para hacer que el ácido nucleico presente en la muestra biológica sea extraído de al menos una porción de la muestra biológica para posterior procesamiento; separar al menos una porción del tampón de extracción que comprende al menos una porción del ácido nucleico de la muestra biológica calentando durante 3 a 5 minutos a 65 °C; formar una mezcla de amplificación que comprende: la al menos una porción del tampón de extracción que comprende la al menos una porción del ácido nucleico; y uno o más tampones de reacción de amplificación; e incubar la mezcla de amplificación durante 1 a 10 minutos entre 25 °C y 70 °C.

30 La invención incluye también el método que comprende diluir una muestra biológica en un tampón de extracción para formar una mezcla, en donde el tampón de extracción comprende del 0,5% en peso al 20% en peso de disolvente orgánico, en donde dicho disolvente orgánico es butanol; incubar la mezcla a una temperatura de 15 °C a 35 °C durante un tiempo entre cinco segundos y treinta minutos, para hacer que el ácido nucleico presente en la muestra biológica sea extraído de al menos una porción de la muestra biológica para posterior procesamiento; separar al menos una porción del tampón de extracción que comprende al menos una porción del ácido nucleico de la muestra biológica calentando durante 3 a 5 minutos a 65 °C; formar una mezcla de amplificación que comprende: la al menos una porción del tampón de extracción que comprende la al menos una porción del ácido nucleico; y uno o más tampones de reacción de amplificación; e incubar la mezcla de amplificación durante 1 a 10 minutos entre 25 °C y 70 °C.

35 En las reivindicaciones dependientes se exponen realizaciones preferidas de la invención.

En el presente documento se describen también métodos asociados para ayudar a la comprensión de la invención, pero estos no forman parte de la invención reivindicada. Los ejemplos o realizaciones descritas en el presente documento que no caen dentro de la definición de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos.

5 A continuación se describe detalladamente la invención reivindicada con referencia a las figuras de dibujos adjuntas, en las que:

La Fig. 1 ilustra ejemplos de etapas de un nuevo método de extracción de ácido nucleico que incluye un disolvente orgánico para simplificar la extracción de ácido nucleico sin necesidad de hervir los materiales biológicos.

10 La Fig. 2 ilustra un conjunto de un ejemplo de dispositivo de recolección de muestras utilizado de acuerdo con aspectos de la invención reivindicada.

Las Figs. 3A-3B representan un gel SDS-poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de amplificación isotérmica, usando ADN crudo extraído de distintas muestras usando el método de la invención reivindicada.

La Fig. 4 representa un gráfico que ilustra el análisis de ADN crudo en un ensayo de amplificación isotérmica RPA de *C. difficile*.

15 Las Figs. 5A-5B representan gráficos que ilustran el análisis de ADN extraído de muestras de heces usando la amplificación isotérmica NEAR.

La Fig. 6 representa un gráfico que ilustra pruebas de RPA de *Salmonella* con ADN extraído de muestras de heces.

Las Figs. 7A-7B representan gráficos que ilustran pruebas de RPA para detectar el gen *stx2* de la toxina Shiga en el ADN extraído de muestras de heces.

20 La Fig. 8 representa un gel de SDS-poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de transcripción inversa y análisis por PCR de ARN extraído de una muestra fecal positiva para norovirus.

La Fig. 9 representa un gráfico que ilustra la amplificación por PCR con ADN crudo extraído de las hojas de *Nicotiana benthamiana*.

25 La Fig. 10 representa un gráfico que ilustra inhibidores de amplificación que pueden eliminarse mediante la adición de disolvente orgánico en diferentes etapas durante la extracción del ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención.

Con los objetivos de velocidad y bajo coste, sigue existiendo la necesidad de nuevos materiales y procedimientos para extraer ácidos nucleicos en menos tiempo y reducir el riesgo de intervención y error del operador. Las muestras humanas como las heces y la sangre representan un gran desafío para la preparación de muestras antes de las aplicaciones moleculares posteriores debido a la presencia de varios inhibidores. Además, eliminar estos inhibidores de la amplificación de ácido nucleico por ebullición no es adecuado para pruebas moleculares que requieren ARN purificado, porque el calentamiento conduce a la degradación del ARN. Los inhibidores que se encuentran en muestras humanas y que afectan tanto a la PCR como a la amplificación isotérmica incluyen sales biliares, polisacáridos complejos, hemoglobina/hemina, polifenoles, pigmentos y urea. Se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de métodos de preparación de muestras para superar el problema de estos inhibidores de amplificación de ADN, y se han empleado técnicas diversas para reducir el efecto de los inhibidores. Por ejemplo, se han utilizado sistemas acuosos de dos fases, filtración, dilución y filtración para facilitar la amplificación del ADN. La ebullición de diez minutos es también un método muy común utilizado para la preparación cruda de ADN de bacterias, que es muy eficaz para lisar las células para liberar el ácido nucleico y reducir la inhibición en las amplificaciones posteriores. Sin embargo, hervir muestras en un laboratorio clínico no es seguro ni conveniente. Por lo tanto existe la necesidad de un método más seguro y más fácil para la extracción de ácido nucleico crudo, ya que los métodos existentes son laboriosos, complejos y/o caros. En consecuencia, no son prácticos en muchos marcos de laboratorios clínicos. Así pues, existe la urgente necesidad de un método simple y fácil de usar que extraiga de las muestras biológicas ácidos nucleicos de alta calidad.

45 En el presente documento se describe un nuevo método de preparación de muestras que usa bajas concentraciones de disolventes orgánicos combinados con una incubación corta y a temperatura baja para reemplazar la ebullición y otras etapas extensivas (como la digestión enzimática, incubación, separación, precipitación y elución) que se usan ampliamente en procedimientos de extracción de ácido nucleico para eliminar eficazmente los factores inhibidores en los ácidos nucleicos extraídos de materiales biológicos. El método de la invención reivindicada puede usarse con diferentes muestras biológicas tales como sangre, heces, orina, plantas, etc. La adición de una baja concentración de disolventes orgánicos en el tampón de extracción de ácido nucleico reduce la temperatura requerida para las preparaciones de ADN y las extracciones de ARN porque ya no es necesario hervir para eliminar la inhibición de la amplificación en preparaciones crudas de ácido nucleico. La adición de disolventes orgánicos puede usarse para tratar la muestra antes, durante y después de los métodos de extracción del ácido nucleico. Se puede usar un solo disolvente

o una combinación de disolventes. El tampón de extracción lisa con fuerza las células, lo que tiene como resultado la liberación de ácido nucleico en el tampón de extracción. Los disolventes orgánicos ayudan a reducir o a eliminar la inhibición de la amplificación a una temperatura más baja en la preparación cruda de ácido nucleico. Combinados con filtración a través de carbón activado o bien de filtros convencionales, los inhibidores presentes en las muestras se unen al filtro y/o se disuelven o se desnaturalizan en el tampón. El ácido nucleico extraído de acuerdo con el presente método es adecuado para su uso posterior en técnicas ampliamente utilizadas tales como la amplificación de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, una baja concentración de disolvente orgánico se refiere a una concentración por debajo de un umbral predeterminado. En este documento se proporcionan ejemplos de cantidades.

La presente descripción se dirige a un procedimiento para preparar muestras biológicas destinadas al uso con amplificación isotérmica y PCR usando una baja concentración de un disolvente orgánico para eliminar inhibidores de la amplificación de ácido nucleico.

Las muestras biológicas incluyen tejidos biológicos, extractos de tejidos biológicos y excreciones biológicas, sangre o una parte de sangre, orina, heces, saliva, esputo, mucosa, semen o tejido homogeneizado. Por lo tanto, puede ser una muestra biológica de tejido humano o animal, tal como carne homogeneizada (p. ej. hamburguesa, cordero, cerdo, pollo, pescado, huevo). También puede ser un extracto de una muestra sólida, tal como un extracto acuoso de una muestra fecal o de una muestra de carne comestible. Además, las muestras biológicas incluyen tejidos vegetales, bacterias cultivadas, virus cultivados, parásitos cultivados y células de mamíferos e insectos cultivadas.

También se describe en el presente documento una composición que es capaz de (i) eliminar o inactivar compuestos presentes en los materiales biológicos que pueden interferir con el uso del ácido nucleico para aplicaciones posteriores y (ii) extraer ácido nucleico de muestras biológicas.

Con referencia a la Fig. 1, el proceso incluye un tampón de extracción de ácido nucleico acuoso que contiene un bajo porcentaje de disolvente orgánico que permite la opción de no calentar, concretamente no a 95 °C o más. Con referencia a la Fig. 1, se obtiene un hisopo de muestra en la etapa 1. En la etapa 2, la muestra se agrega a un tubo de apriete que contiene el tampón de extracción de ácido nucleico con un bajo porcentaje de disolvente orgánico, y se quiebra en una línea marcada. Aún en la etapa 2, se coloca una punta de filtro de carbón activado en la parte superior del tubo de apriete y el tubo de apriete se agita en vórtice durante 10 segundos. En la etapa 3, una gota de la muestra de extracción filtrada se estruja a un tubo de reacción. El tubo de reacción tapado se incuba a 65 grados Celsius durante 3 minutos y se agita en vórtice durante 10 segundos en la etapa 4. El ácido nucleico en el tubo de reacción está entonces listo para aplicaciones posteriores. Por ejemplo, como se muestra en las etapas 5-6, se pueden utilizar 50 µl de la muestra de extracción o un volumen apropiado de la muestra de extracción para la amplificación isotérmica o PCR. Por ejemplo, el tiempo necesario para calentar la muestra puede estar dentro de un margen distinto de 3 a 5 minutos.

En cuanto a la Fig. 2, el diagrama 200 representa el ensamblaje del dispositivo de recogida de muestras utilizado en la invención reivindicada. El dispositivo de recogida de muestras comprende: un hisopo para recoger la muestra 210, una punta de filtro 220 que se puede añadir a la parte superior de un tubo de extracción 230. El tubo de extracción 230 contiene tampón de extracción utilizado para la extracción de ácido nucleico. El hisopo puede agregarse al tubo de extracción y ajustarse en la línea marcada 240 y dejarse dentro del tubo de extracción 230. Después de colocar el bastoncillo de presión 240 dentro del tubo de extracción 230, la punta del filtro 220 se puede agregar a la parte superior del tubo de extracción 230 para ensamblar el dispositivo de recogida de muestras 250.

En el presente documento se describe un método para preparar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, en particular muestras de heces, sangre, saliva, orina o tejido vegetal. La muestra biológica se puede diluir en el tampón de extracción que contiene un porcentaje bajo (aproximadamente 0,5% a 20% en peso) de disolventes orgánicos comunes.

Un bajo porcentaje de disolventes orgánicos comunes son adecuados para su inclusión en el tampón de extracción de ácido nucleico en la práctica de esta invención reivindicada, tales como etanol y acetona. Estos disolventes orgánicos, bien sea individualmente o juntos en forma de mezcla, son de particular interés. La concentración de los disolventes orgánicos a los que están expuestas las muestras biológicas puede variar, pero la concentración que puede eliminar eficazmente la inhibición oscilará generalmente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 20%, y en muchos casos entre aproximadamente 3% y aproximadamente 10%, todas ellas en peso. Además, los disolventes orgánicos pueden usarse para tratamiento previo de las muestras biológicas antes de la extracción del ácido nucleico, o bien pueden agregarse al tampón de extracción, o agregarse previamente a la dilución antes de la amplificación. La adición de disolventes orgánicos fuera de un margen de 0,5 a 20% no es ventajosa porque reprime la amplificación del ácido nucleico.

La muestra biológica en el tampón de extracción se incuba a una temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C durante un tiempo entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente treinta minutos, para hacer que los ácidos nucleicos sean liberados al fluido de la muestra. Un filtro de carbón activado, tal como un filtro de fibra de vidrio Porex incrustado con carbón activado, se utiliza como un filtro (el tamaño de poro del filtro de carbón activo puede ser mayor que 50 µm y menor que 250 µm). Los ácidos nucleicos liberados se diluyen en PBS o agua o tampones de reacción de amplificación apropiados para aplicaciones posteriores y la mezcla se incuba durante

1 a 10 minutos a una temperatura de 25 °C a 70 °C.

Las aplicaciones subsiguientes incluyen amplificación isotérmica, PCR (PCR en tiempo real o PCR convencional), secuenciación, genotipado e hibridación. La amplificación isotérmica incluye la reacción asociada a la enzima de mella (NEAR: Nicking Enzyme Associated Reaction), la amplificación por recombinasa polimerasa (RPA), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP: Loop Mediated Isothermal Amplification), la amplificación por desplazamiento de cadena, la amplificación dependiente de la helicasa, la amplificación de círculo rodante y otros métodos de amplificación isotérmica. La amplificación se realiza con la muestra de extracción que contiene una baja concentración de disolvente orgánico con o sin calor. El tampón de extracción de ácido nucleico puede consistir en componentes de tampón usados típicamente.

10 La invención reivindicada se describe a continuación con más detalle, con referencia a los ejemplos que siguen. La PCR y las amplificaciones isotérmicas que se describen a continuación se utilizan para evaluar la calidad y la cantidad de los ácidos nucleicos extraídos.

Ejemplo 1.

15 Comparación de calentamiento por ebullición frente a temperatura más baja con disolventes orgánicos para reducir o eliminar los inhibidores de la amplificación isotérmica del ácido nucleico.

Se usó una prueba comercial de *C. difficile* para evaluar el método descrito de extracción de ácido nucleico. Se probaron diferentes condiciones de extracción, que incluyen ebullición, sin calentamiento, o 65 °C con o sin un 3% de disolvente orgánico, para preparar ácidos nucleicos de muestras de heces para amplificación isotérmica. Esta prueba contiene la amplificación de una diana (gen *tcdB*) y control interno (IC) como se ilustra en la Fig. 3. La Fig. 3A ilustra la amplificación isotérmica usando ADN crudo extraído de una muestra de heces positiva para *C. difficile* (Muestra 10233) en las condiciones enumeradas. Las reacciones se realizaron en un bloque térmico y los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1%. Los resultados se proporcionan en las Figs. 3A (Muestra 10233) y 3B (Muestra 16). Cuando el ADN se preparó sin calentamiento (carril 3), no se observó amplicón del gen *tcdB* (como se ilustra en la Fig. 3A). En la Fig. 3A, cuando el ADN se preparó usando ebullición (carril 2), la adición de etanol al 3% (carril 4), o 3 minutos de calentamiento a 65 °C sin la adición de disolvente orgánico (carril 5), la intensidad de los fragmentos de ADN amplificados fue similar en el gel. La Fig. 3B muestra la amplificación isotérmica usando ADN crudo que se extrajo de la Muestra 16 bajo las condiciones indicadas. La amplificación del gen *tcdB* se examinó en los carriles A-C de la Fig. 3B. La amplificación del control interno se evaluó en los carriles D-F de la Fig. 3B. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1%. Como se muestra en la Fig. 3B, cuando la muestra 16 se trató con etanol al 3% en el tampón de extracción a 65 °C durante 3 minutos, el gen *tcdB* y el control interno mostraron una fuerte amplificación (Fig. 3B, carriles A y D). Sin embargo, cuando la muestra 16 se trató con etanol al 3% sin calentamiento, o bien con calentamiento a solamente 65 °C, no tuvo lugar la amplificación de *tcdB* (Fig. 3B, carriles B y C). Los resultados indican que el etanol 3% combinado con 3-5 minutos de incubación a 65 °C era óptima y comparable a la ebullición en la reducción de la inhibición de las muestras para la amplificación de ADN. Para algunas muestras, la adición de disolvente orgánico en el tampón de extracción sin la etapa de calentamiento presenta la misma cantidad de amplicones en comparación con el método de ebullición.

Ejemplo 2.

Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos extraídos con o sin etanol usando muestras de heces humanas.

La amplificación por recombinasa polimerasa (RPA) y la reacción asociada a la enzima de mella (NEAR) se usaron para evaluar los disolventes orgánicos en la reducción del efecto inhibitorio sobre la amplificación de ácido nucleico. Se preparó ADN crudo de heces a partir de un paciente con infección por *C. difficile* (CDI) siguiendo los procedimientos mostrados en la Fig. 1. La prueba RPA de *C. difficile* se usó para la muestra 6654 y la prueba NEAR de *C. difficile* se aplicó para las muestras 9637, 9638, 9648, 9665 y 9669. El tampón de extracción se usó con o sin la adición de etanol al 3% y se incubó a 65 °C durante 5 minutos. El gen de la toxina B de *C. difficile* (*tcdB*) se amplificó a partir de la muestra de ADN extraída utilizando la amplificación isotérmica RPA y NEAR. Las cantidades relativas de los productos de amplificación (RFU: Relative Fluorescence Unit; unidad de fluorescencia relativa) se midieron utilizando un lector de fluorescencia Axxin T16. Los resultados se proporcionan en la Fig. 4 y en la Fig. 5. La Fig. 4 ilustra el análisis del ADN crudo en un ensayo de amplificación isotérmica RPA de *C. difficile*. El ADN se extrajo de la Muestra 6654 usando el tampón de extracción suplementado con un 3% de etanol (línea continua) o con solamente el tampón de extracción (línea discontinua), mientras que la Fig. 5 muestra el análisis de ADN extraído de muestras de heces usando la amplificación isotérmica NEAR. El ADN crudo se extrajo de cinco muestras de heces (Muestras 9637, 9638, 9648, 9665 y 9669) sin (Fig. 5A) o con etanol (Fig. 5B) en el tampón de extracción. La amplificación de *tcdB* se midió usando un lector de fluorescencia Axxin T16. NTC en la Fig. 5 significa que no hay control de plantilla, así que no se agregó ninguna plantilla a esta reacción.

55 El ADN purificado del tampón de extracción que contiene el disolvente orgánico (Fig. 4, línea continua y Fig. 5B) dio señales mucho más intensas y una amplificación rápida en comparación con el ADN purificado sin el disolvente orgánico en el tampón de extracción (Fig. 4, línea discontinua y Fig. 5A). Estos resultados indican que la inhibición de la amplificación de ADN se reduce sustancialmente mediante la adición de etanol al 3% en el tampón de extracción y

la incubación a 65 °C.

Ejemplo 3.

Comparación de la amplificación de ADN extraído con o sin disolvente orgánico usando muestras de heces humanas que contienen bacterias y parásitos.

5 Las muestras de heces humanas utilizadas en este ejemplo fueron de pacientes infectados con *C. difficile*, *E. coli* productor de toxinas similares a shiga, *Shigella*, *Campylobacter*, *H. pylori*, *Salmonella*, *Giardia*, *Cryptosporidium* y *E. histolytica*. Se extrajo el ADN de esas muestras clínicas usando el método descrito con referencia a la Fig. 1. El ADN se purificó también a partir de esas muestras usando el instrumento automatizado Biomerieux NucliSENS easyMAG y se usó como controles para la comparación. La PCR, la amplificación por recombinasa polimerasa (RPA) y la
10 amplificación isotérmica de la reacción asociada a la enzima de mella (NEAR) se utilizaron para evaluar la calidad y la cantidad de ácidos nucleicos extraídos.

Amplificación por PCR:

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos o placas de 96 pocillos en volúmenes de 20 µl, utilizando ya sea IQ power mix (Bio-Rad) o SYBR GreenER™ master mix (Life Technologies). Se emplearon en las reacciones
15 cebadores y/o sondas específicos para cada patógeno. Para la mezcla maestra SYBR, la amplificación por PCR fue seguida por un análisis de la curva de fusión.

Se realizó una PCR multiplex en tiempo real para detectar *Giardia*, *Cryptosporidium* y *E. histolytica* usando ADN purificado con el método descrito con referencia a la Fig. 1. Para las muestras positivas para *Giardia*, *Cryptosporidium* o *E. histolytic*, el ADN crudo purificado con 3% de etanol y el ADN purificado por el instrumento automatizado
20 Biomerieux NucliSENS easyMAG mostraron una amplificación similar de ADN.

Reacción de amplificación de la enzima de mella (NEAR):

Las reacciones NEAR se llevaron a cabo en volúmenes de 50 µl usando Nt.BstNBI (New England Biolabs) y *Bst* DNA polimerasa (New England Biolabs) o Manta DNA polimerasa (Enzymatics). Se usaron cebadores específicos y sondas dirigidas al gen de la toxina B de *C. difficile*, al gen de la toxina Shiga *stx1* y al gen de la toxina Shiga *stx2* en las
25 reacciones. Se usó un lector de fluorescencia Axxin T16 para detectar señales de amplificación. En el Ejemplo 2 se han presentado ejemplos de muestras de heces positivas para *C. difficile* usando la prueba NEAR.

Amplificación mediante recombinasa polimerasa (RPA: Recombinase Polymerase Amplification):

Las reacciones RPA se llevaron a cabo en volúmenes de 50 µl utilizando materiales liofilizados preparados por TwistDx. Se usaron cebadores específicos y sondas dirigidas al gen de la toxina B de *C. difficile*, el gen de la toxina Shiga *stx1*, el gen de la toxina Shiga *stx2*, el gen de ARNr *Campylobacter* 16s y el gen *Salmonella invA* en las
30 reacciones. Se usó un lector de fluorescencia Axxin T16 para detectar señales de amplificación. Las señales de amplificación del gen de la toxina B, el gen de la toxina Shiga *stx1*, el gen de la toxina Shiga *stx2*, el gen de ARNr *Campylobacter* 16s y el gen *Salmonella invA* del ADN purificado usando un bajo porcentaje de disolvente orgánico presentaron la misma intensidad que las plantillas de ADN purificadas usando el método de ebullición o usando un sistema comercial de purificación de ácido nucleico, el instrumento automatizado Biomerieux NucliSENS easyMAG. Las pruebas RPA para el gen *Salmonella invA* (Muestras 3, 4, 6, 7 y 8) y el gen de la toxina Shiga *stx2* (Muestras 3 y 12) se muestran en las Figs. 6 y 7. La Fig. 6 muestra pruebas RPA de *Salmonella* con ADN extraído de muestras de heces. El ADN crudo se extrajo de cinco muestras positivas para *Salmonella* (Muestras 3, 4, 6, 7 y 8) usando el método de ebullición (como se ilustra en la Fig. 6A) o un tampón de extracción que contiene 3% de etanol con incubación a
35 65 °C durante 3 minutos (como se ilustra en la Fig. 6B). Se muestran las curvas de amplificación del gen *Salmonella invA* de las muestras de ADN. NTC: sin control de plantilla.

Las figs. 7A y 7B ilustran las pruebas de RPA para detectar el gen *stx2* de la toxina Shiga en el ADN extraído de muestras de heces. El ADN crudo se extrajo de las dos muestras positivas para *stx2* (Muestras 3 y 12) usando el método de ebullición (como se ilustra en la Fig. 7A) o un tampón de extracción que contiene 3% de etanol con
45 incubación a 65 °C durante 3 minutos (como se ilustra en la Figura 7B). Se muestran las curvas de amplificación del gen *stx2* Shiga de las muestras de ADN.

Para las muestras de ADN preparadas a partir del método de ebullición o el método descrito en la presente invención, el tiempo de inicio de la amplificación y la lectura del punto final más alto en las curvas de amplificación fueron comparables. Usando la composición y el método presentado en la presente invención reivindicada, los resultados
50 ilustran que la calidad y cantidad de ADN extraído de las muestras de heces humanas que contienen bacterias y parásitos son suficientes para la PCR y la amplificación isotérmica.

Ejemplo 4.

Comparación de la amplificación de ácidos nucleicos extraídos con o sin etanol usando muestras de cultivo y heces humanas que contienen virus de ADN y ARN.

5 Este ejemplo se proporciona para evaluar la eficiencia del tampón y el procedimiento para la extracción de ácido nucleico viral. En este ejemplo se utilizaron muestras fecales clínicas positivas para adenovirus y norovirus. El ácido nucleico se extrajo de esas muestras usando el método descrito con referencia a la Fig. 1. Se realizó una PCR en tiempo real utilizando los ácidos nucleicos extraídos y los cebadores específicos dirigidos a un gen hexón (proteína de la cápsida II) de adenovirus para evaluar la calidad y cantidad de ácidos nucleicos extraídos de las muestras positivas para adenovirus. El ADN crudo extraído de las muestras positivas para adenovirus mostró una amplificación muy intensa del gen de la proteína II de la cápsida del adenovirus. Cuando se usó la misma cantidad de ADN en la PCR en tiempo real, los valores del ciclo umbral (Ct) para el ADN purificado usando el método descrito con referencia a la Fig. 1 eran casi iguales al ADN purificado con el instrumento automatizado BioMerieux NucliSENS easyMAG.

15 La Fig. 8 ilustra la transcripción inversa y el análisis por PCR del ARN extraído de una muestra fecal positiva para norovirus. El ARN extraído de una muestra positiva para norovirus usando el tampón de extracción con etanol al 3% presentado en la presente invención se comparó con el ARN extraído con ebullición, sin ebullición o incubación a 65 °C sin disolvente orgánico. El ARN se extrajo también usando el instrumento automatizado BioMerieux NucliSENS easyMAG y sirvió como control. El *kit* de síntesis de ADNc Thermo Scientific Maxima H Minus First Strand con dsDNasa se usó entonces para la transcripción inversa. Después de la transcripción inversa, se usaron cebadores específicos dirigidos al extremo 3' de la región ORF1 del norovirus en una PCR en tiempo real. Una banda de 331 pb de la región diana de norovirus de la muestra tratada con disolvente orgánico se amplificó como se ilustra en la Fig. 8). El ARN purificado con el instrumento automatizado BioMerieux NucliSENS easyMAG a cinco veces la mayor cantidad de material de partida se usó como control. La etapa de ebullición redujo drásticamente el rendimiento de ARN de la muestra biológica en comparación con la muestra tratada con tan solo 3% de etanol. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 %. Los resultados demuestran que el tampón de extracción y el método presentado en esta invención reivindicada pueden lisar fuertemente el virus para liberar ácidos nucleicos muy adecuados para PCR y PCR de transcripción inversa.

Ejemplo 5.

El método de preparación del ácido nucleico descrito en el presente documento puede ser aplicado a tejidos vegetales.

30 Este ejemplo se proporciona para probar la capacidad del tampón de extracción presentado en esta invención reivindicada utilizando tejidos vegetales. La Fig. 9 ilustra la amplificación por PCR con ADN crudo extraído de las hojas de *Nicotiana benthamiana*. El ADN vegetal crudo se extrajo usando el método descrito en la presente invención. La amplificación del gen de actina se muestra como una línea continua. Una línea de puntos representa que no hay control de plantilla (NTC). El biomaterial se obtuvo de las hojas de la planta *Nicotiana benthamiana*. Las hojas se molieron usando un mortero y se transfirieron (100 µg) a un tubo de apriete fácil usando el tampón de extracción que contiene 3% de etanol. El tubo se agitó en vórtice y se estrujó una gota de tampón a través de una punta de filtro de carbón vegetal en un tubo eppendorf de 1,5 ml que contiene 500 µl de PBS. El tubo eppendorf se incubó a 65 °C durante 3-5 minutos. Se llevó a cabo un análisis de PCR en tiempo real utilizando el ADN extraído y los cebadores dirigidos específicamente al gen de actina de *Nicotiana benthamiana* en un SmartCycler. La amplificación con éxito por PCR del gen de actina vegetal demostró que las plantillas de ADN extraídas de tejidos vegetales con el método descrito en la presente invención reivindicada pueden usarse para reacciones de PCR (como se ilustra en la Fig. 9).

Ejemplo 6.

El método de extracción descrito en el presente documento puede ser usado para eliminar o reducir inhibidores de la amplificación en muestras de sangre.

45 El presente ejemplo se proporciona para probar la inhibición de la amplificación de ADN por la sangre. En este procedimiento se utilizaron muestras de heces clínicas positivas para *C. difficile* enriquecidas con sangre humana a una concentración del 5%. Las reacciones isotérmicas se llevaron a cabo con ADN que se extrajo de las muestras enriquecidas utilizando el tampón de extracción y el método descrito con referencia a la Fig. 1. Se añadió una torunda de la muestra con sangre a un tubo de apriete que contenía el tampón de extracción con etanol al 3% y la torunda se rompió en el marcador señalado. Se estrujó una gota de tampón de extracción en el tubo de reacción después de colocar una punta de filtro de carbón activado en la parte superior del tubo de apriete. Después de incubar el tubo de reacción a 65 °C durante 3 minutos, se utilizaron 50 µl del ADN extraído para la reacción RPA con *C. difficile*. Los ácidos nucleicos extraídos fueron capaces de amplificar el gen *tcdB* y el control interno en las reacciones de amplificación isotérmica. Sin embargo, cuando se usó el tampón de extracción sin etanol para la muestra enriquecida con 5% de sangre humana, la amplificación del gen *tcdB* de *C. difficile* y el control interno del ADN crudo se suprimieron por completo en la prueba de RPA. Los resultados indican que la presente invención reivindicada eliminó eficazmente los inhibidores de la muestra con sangre.

Ejemplo 7.

Se puede agregar un bajo porcentaje de disolvente orgánico antes, durante y después de la etapa de lisis durante el proceso de extracción de ácido nucleico.

5 Las muestras de heces humanas utilizadas en este procedimiento fueron de pacientes infectados con *C. difficile*. Se
añadió disolvente orgánico en diferentes etapas durante la extracción del ácido nucleico. En el primer grupo
experimental, se agregó disolvente orgánico directamente a las muestras de heces. Se agregaron muestras de heces
(100 µl) a un tubo eppendorf que contenía 250 µl de PBS con un 3% de etanol y se agitó en vórtice durante 10
10 segundos. Luego se transfirieron a un tubo de apriete fácil que contiene el tampón de extracción sin etanol. Después
de eso, se extrajo el ADN siguiendo el método descrito con referencia a la Fig. 1. En el segundo grupo experimental,
se añadió etanol después de lisar las muestras de heces. Se agregaron muestras de heces (100 µl) a un tubo de
apriete fácil que contenía el tampón de extracción sin etanol y se rompió una punta de filtro en la parte superior del
tubo. El tubo de apriete fácil se agitó en vórtice y aproximadamente 100 µl de la muestra lisada se exprimieron desde
15 el tubo. Se añadió tres por ciento de etanol a la muestra lisada de 100 µl y se agitó en vórtice. Una gota de las muestras
lisadas (aproximadamente 25-30 µl) se diluyó en un tubo de reacción y se incubó a 65 °C durante 3 minutos. El ADN
crudo se usó después directamente para la amplificación por PCR. En el tercer grupo experimental, se añadió
disolvente orgánico al tampón de extracción. El ADN bruto se extrajo de las muestras de heces con el tampón de
extracción que contenía 3% de etanol siguiendo el método descrito con referencia a la Fig. 1).

20 Se llevaron a cabo reacciones de RPA en volúmenes de 50 µl utilizando los ADN crudos preparados con los métodos
mencionados anteriormente y los materiales liofilizados preparados por TwistDx. Se usaron en la reacción cebadores
específicos y sondas dirigidas al gen de la toxina B de *C. difficile*. Se usó un lector de fluorescencia Axxin T16 para
detectar señales de amplificación del ADN. La adición de etanol en diferentes etapas durante la extracción de ácido
nucleico no hizo ninguna diferencia en la intensidad de la señal de amplificación del ADN extraído; se logró una
amplificación exitosa con todo el ADN crudo que se extrajo con diferentes procedimientos (como se ilustra en la Fig.
10).

25 La Fig. 10 ilustra que los inhibidores de la amplificación pueden eliminarse mediante la adición de disolvente orgánico
en diferentes etapas durante la extracción de ácido nucleico. El ADN crudo se extrajo de muestras de heces humanas.
Se añadió etanol (3%) al tampón de extracción (línea continua), a las muestras de heces diluidas (línea discontinua)
o a los lisados de las muestras de heces (línea de puntos), seguido de incubación a 65 °C durante 3 minutos. La
amplificación del gen de la toxina B de *C. difficile* en el ADN extraído se midió con un ensayo RPA de *C. difficile*. Los
30 resultados indican que la calidad y la cantidad de ADN extraído usando el presente método de las muestras de heces
humanas son apropiadas para PCR y amplificación isotérmica, y que el tratamiento con disolventes orgánicos puede
aplicarse antes de la extracción de ácido nucleico, durante la extracción o después de la extracción antes de diluir en
una PCR o un tampón de reacción isotérmica.

Ejemplo 8.

35 Alternativas al etanol en el tampón de extracción de ácido nucleico.

Se probó un grupo de disolventes orgánicos como alternativas al etanol en el tampón de extracción de ácido nucleico
presentado en esta presente invención reivindicada; los ejemplos incluyen acetona, metanol, isopropanol, butanol y
DMSO. El ADN crudo se extrajo de dos muestras positivas para *C. difficile* (muestras 6654 y 6799) y dos negativas
(muestras 4268 y 6901) usando el método descrito con referencia a la Fig. 1. El ADN crudo preparado a partir de estas
40 cuatro muestras sin la adición de disolvente orgánico presentó intensos efectos inhibidores sobre la amplificación,
dando como resultado un fallo de amplificación del control interno (Tabla 1, columna 2). Cada disolvente orgánico se
usó para reemplazar el etanol en el tampón de extracción. La prueba RPA de *C. difficile* se empleó para evaluar la
calidad y cantidad de ADN extraído con diferentes disolventes orgánicos. La prueba de RPA de *C. difficile* se calificó
como (1) fallo-señal de amplificación no detectable, (2) comprometido-menos señal de amplicón en comparación con
45 los controles, o (3) nominal-amplicón similar a los controles. Todos los disolventes orgánicos dieron señales intensas
con muestras positivas conocidas (Tabla 1). Estos resultados demuestran que pueden usarse disolventes orgánicos,
incluyendo etanol, acetona, butanol o DMSO.

Tabla 1. Prueba de alternativas al etanol en el ensayo RPA de *C. difficile*.

muestra	sin disolvente	etanol	acetona	DMSO	butanol
4268 (-)	no válido	-	-	-	-
6654 (+)	no válido	+++	++	+	+
6799 (+)	no válido	+++	+++	++	+++
6901 (-)	no válido	-	-	-	-

Tabla 2. Amplificación de ADN con concentraciones de etanol en el intervalo de 0,5% a 15%.

			% de etanol en tampón de extracción con calentamiento a 65 °C durante 3 minutos					
			0,50%	3%	5%	8%	10%	15%
PCR en tiempo real	<i>gluD</i> de <i>C. difficile</i>	Muestra 4	30,04	30,12	29,98	30,39	30,69	n/a
		Muestra 16	34,97	33,59	36,35	36,21	36,75	n/a
RPA	<i>tcdB</i> de <i>C. difficile</i>	Muestra 4	32,07	33,45	32,11	32,55	32,48	n/a
		Muestra 16	35,08	40,08	37,91	39,12	40,95	n/a
		Muestra 16	++	++	++	++	++	++

Además, se han probado distintas concentraciones de disolvente orgánico (de 0,5% a 20%) en el tampón de extracción. La amplificación de los genes *gluD* y *tcdB* de *C. difficile* a partir de extractos de ADN crudo (muestras 4 y 16) no mostró diferencias significativas. Los valores de Ct de la PCR en tiempo real fueron similares para el ADN crudo extraído con distintas concentraciones de etanol (Tabla 2). Los resultados de RPA muestran que la concentración de etanol que varía de 0,5% a 15% en el tampón de extracción no interfirió con la amplificación del ADN (Tabla 2).

Ejemplo 9.

Comparación de la calidad y la cantidad de ácido nucleico extraído de acuerdo con la invención reivindicada frente a un sistema automatizado en PCR multiplex y amplificación isotérmica multiplex.

Se extrajo ADN de muestras fecales clínicas que eran positivas para el gen de toxina Shiga *stx1* y *stx2*, usando el tampón de extracción de ADN presentado en la presente invención y siguiendo el procedimiento descrito con respecto a la Fig. 1. Además, el ADN purificado de Biomerieux NucliSENS easyMAG sirvió como control. Se utilizaron cebadores específicos que apuntan a genes *stx1* y *stx2* en las reacciones de PCR multiplex y RPA multiplex. Usando el ADN extraído de esas muestras, las señales de amplificación de ambos genes *stx1* y *stx2* se detectaron en la PCR multiplex mediante un instrumento de PCR y en las reacciones RPA multiplex mediante un lector de fluorescencia Axxin T16. El ADN extraído usando un 3% de etanol presentado en la presente invención reivindicada dio las mismas señales de amplificación de *stx1* y *stx2* que el ADN purificado de Bionerieux NucliSENS easyMAG. Esto indicó que la calidad y cantidad de ácidos nucleicos crudos extraídos usando el método de la presente invención reivindicada es equivalente al ADN purificado del instrumento automatizado Biomerieux NucliSENS easyMAG.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar una muestra biológica para la extracción del ácido nucleico, que comprende: diluir una muestra biológica en un tampón de extracción para formar una mezcla, en donde el tampón de extracción comprende de 3% en peso a 10% en peso de disolvente orgánico, en donde dicho disolvente orgánico es uno o más entre acetona o etanol; incubar la mezcla a una temperatura de 15 °C a 35 °C durante un tiempo entre 5 segundos y treinta minutos, para hacer que el ácido nucleico presente en la muestra biológica sea extraído en al menos una porción de la muestra biológica para posterior procesamiento; separar al menos una porción del tampón de extracción que comprende al menos una porción del ácido nucleico de la muestra biológica calentando durante 3 a 5 minutos a 65 °C; formar una mezcla de amplificación que comprende: la al menos una porción del tampón de extracción que comprende la al menos una porción del ácido nucleico; y uno o más tampones de reacción de amplificación; e incubar la mezcla de amplificación durante 1 a 10 minutos a una temperatura entre 25 °C y 70 °C.
2. Un método para tratar una muestra biológica para la extracción de ácido nucleico, comprendiendo el método: diluir una muestra biológica en un tampón de extracción para formar una mezcla, en donde el tampón de extracción comprende del 0,5% en peso al 20% en peso de disolvente orgánico, en donde dicho disolvente orgánico es butanol; incubar la mezcla a una temperatura de 15 °C a 35 °C durante un tiempo entre cinco segundos y treinta minutos, para hacer que el ácido nucleico presente en la muestra biológica sea extraído en al menos una porción de la muestra biológica para posterior procesamiento; separar al menos una porción del tampón de extracción que comprende al menos una porción del ácido nucleico de la muestra biológica calentando durante 3 a 5 minutos a 65 °C; formar una mezcla de amplificación que comprende: la al menos una porción del tampón de extracción que comprende la al menos una porción del ácido nucleico; y uno o más tampones de reacción de amplificación; e incubar la mezcla de amplificación durante 1 a 10 minutos entre 25 °C y 70 °C.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha muestra biológica comprende una o más muestras humanas, bacterias, virus, parásitos, muestras de heces, fluidos corporales, plantas o cultivos.
4. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde separar al menos una porción del ácido nucleico de la muestra biológica comprende filtrar la mezcla con un filtro, en donde el filtro comprende uno o más entre un plástico poroso, fibra polimérica porosa o fibra de vidrio porosa.
5. El método según la reivindicación 4, en donde el filtro tiene un tamaño de poro de 50 µm a 250 µm.
6. El método según la reivindicación 4, en donde el filtro comprende un filtro de fibra de vidrio incrustado con carbón activado.
7. El método según la reivindicación 1 o 2, que comprende además agregar etanol como disolvente orgánico a la al menos una porción del ácido nucleico a una concentración de 0,5 a 20% en peso, antes de diluir la al menos una porción del ácido nucleico en el tampón de la reacción de amplificación.
8. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha mezcla de amplificación se incuba a una temperatura entre 50 °C y 65 °C.
9. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde uno o más tampones de reacción de amplificación son tampones adecuados para PCR, secuenciación, genotipado, hibridación y amplificación isotérmica incluyendo reacción asociada a enzima de mella (NEAR), amplificación por recombinasa polimerasa (RPA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de desplazamiento de cadena, amplificación dependiente de la helicasa, amplificación de círculo rodante y otros métodos de amplificación isotérmica.
10. El método según la reivindicación 1 o 2, que comprende además amplificar la al menos una porción del ácido nucleico en una reacción de amplificación, y en donde el tampón de extracción comprende un tampón de extracción usado para amplificación del ácido nucleico.
11. El método según la reivindicación 10, en donde la amplificación se hace usando el tampón de extracción con disolvente orgánico pero sin calentamiento.
12. El método según la reivindicación 10, en donde la amplificación se hace usando el tampón de extracción con disolvente orgánico con calentamiento.

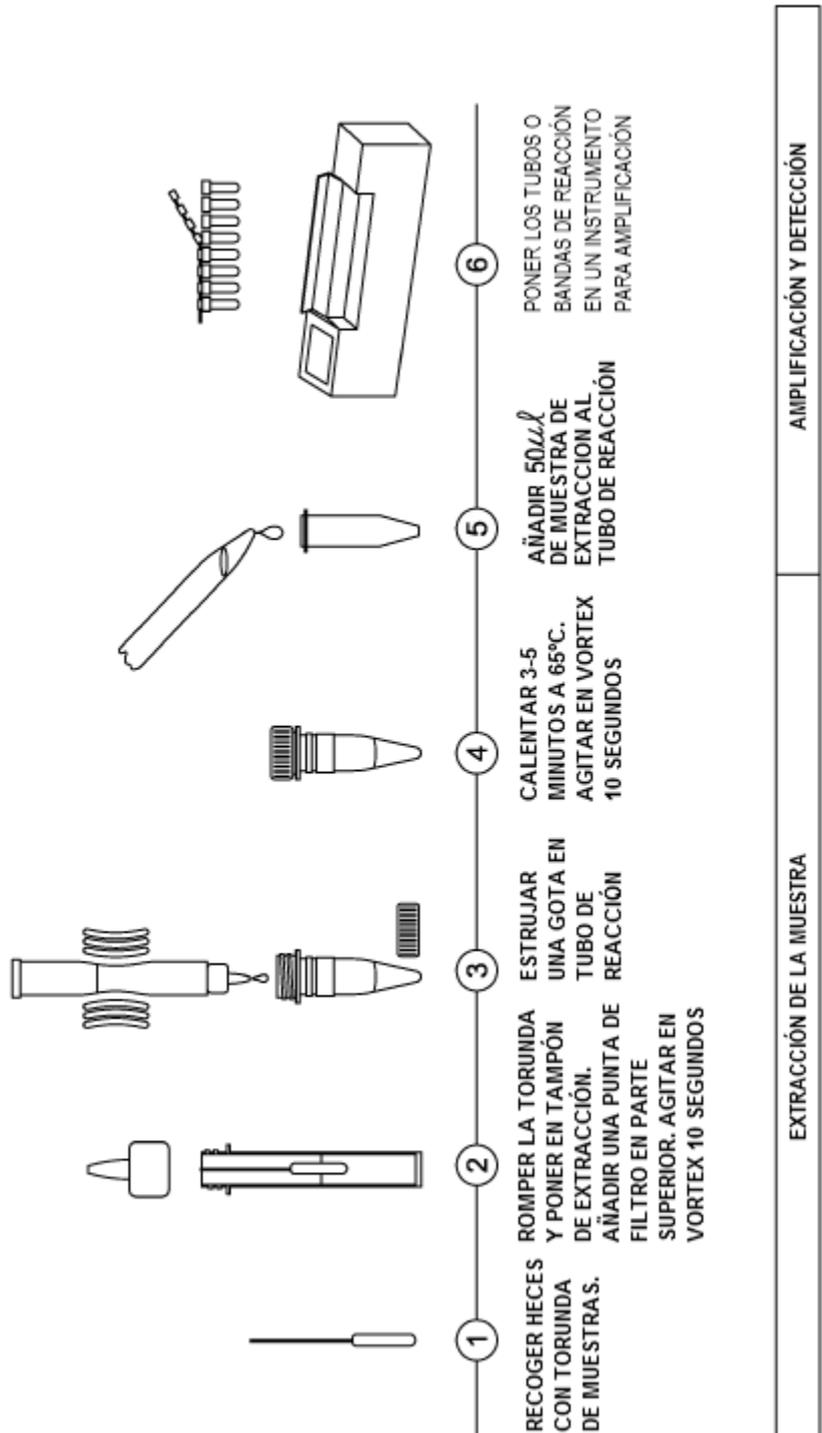


FIG. 1.

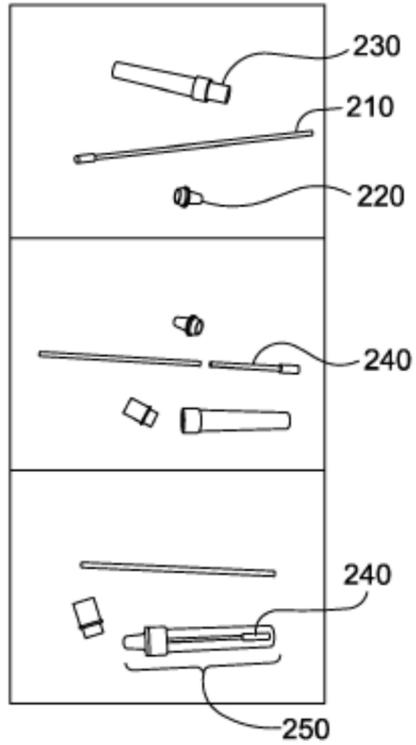


FIG. 2.

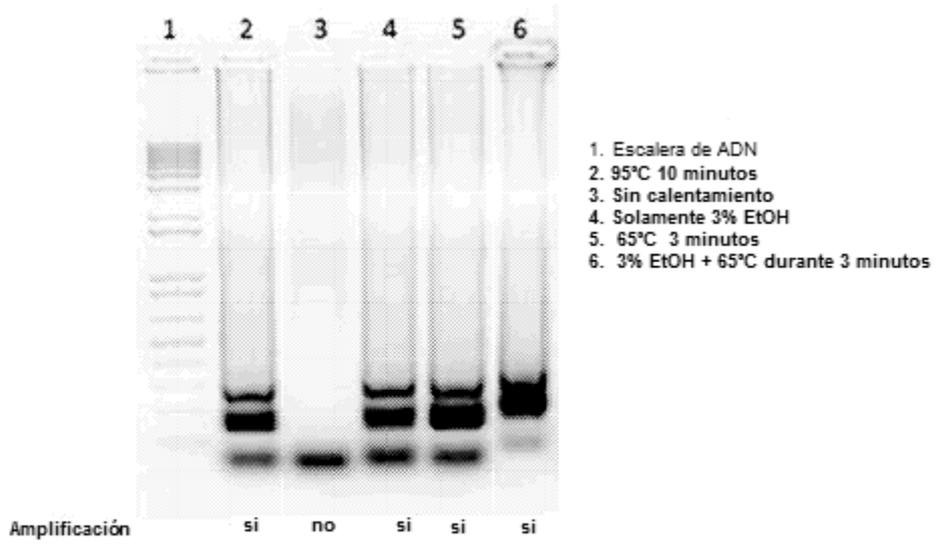


FIG. 3A.

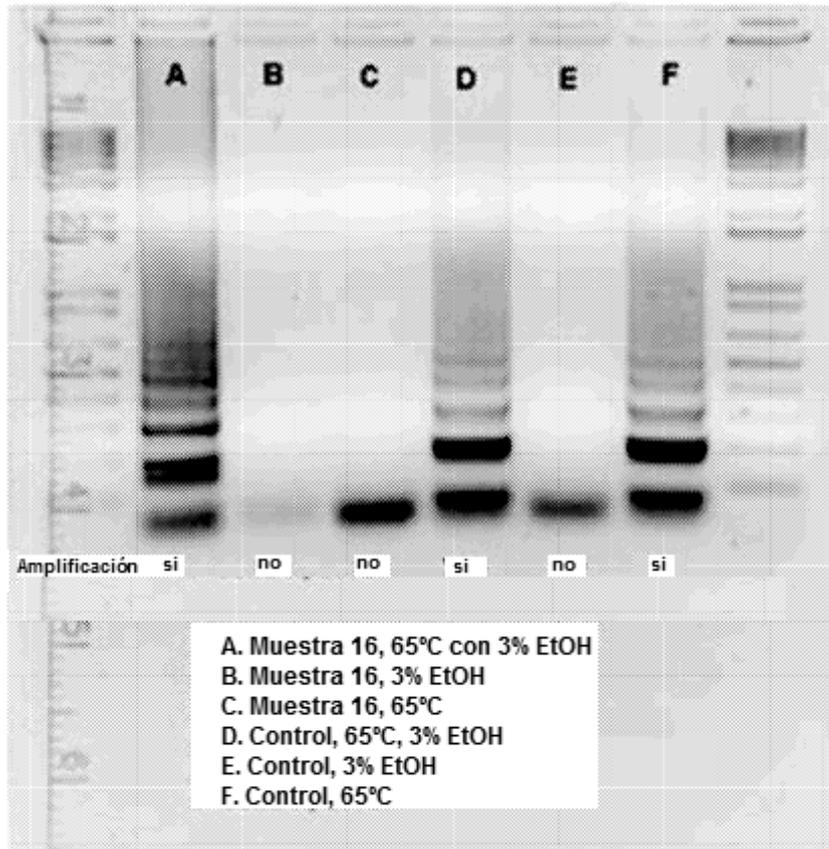


FIG. 3B.

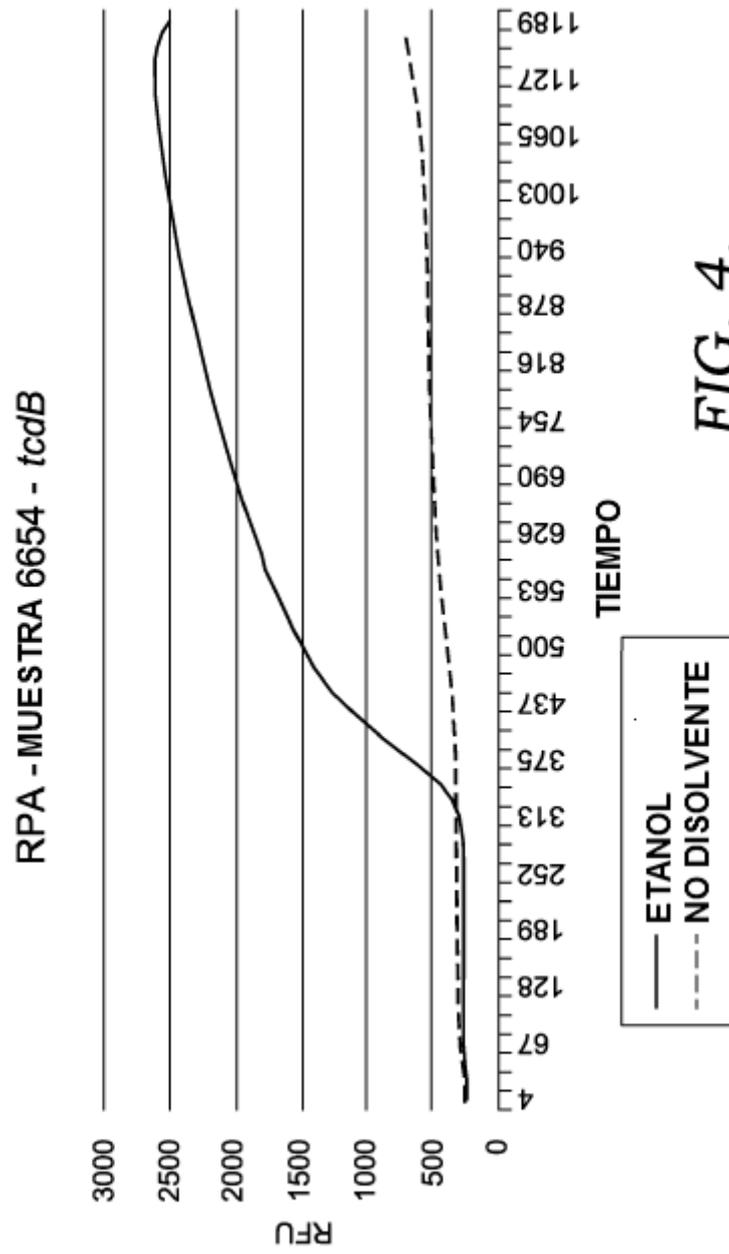


FIG. 4.

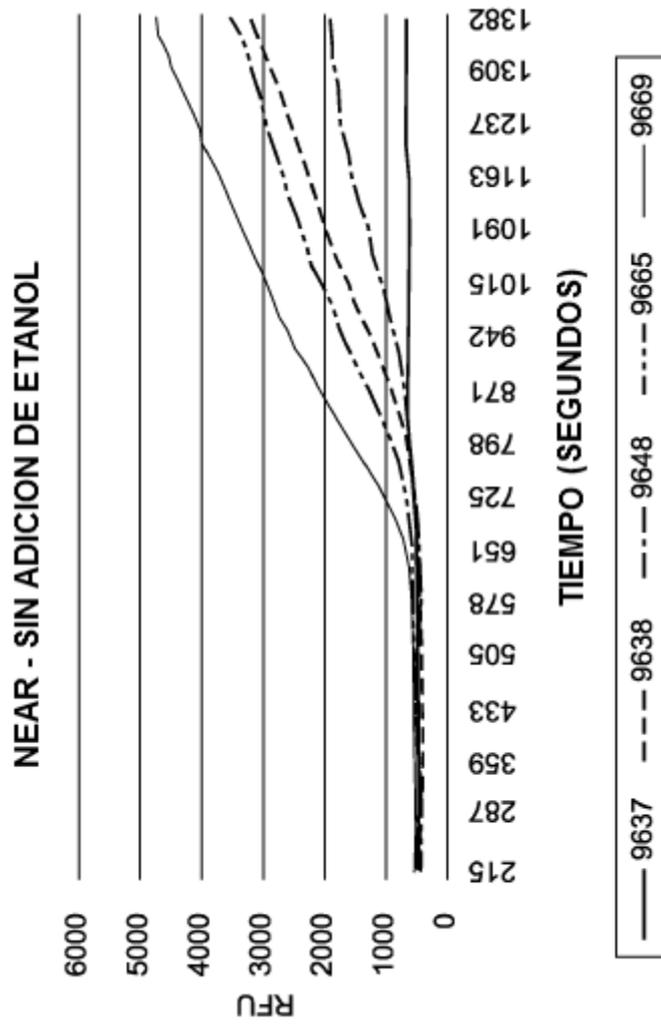


FIG. 5A.

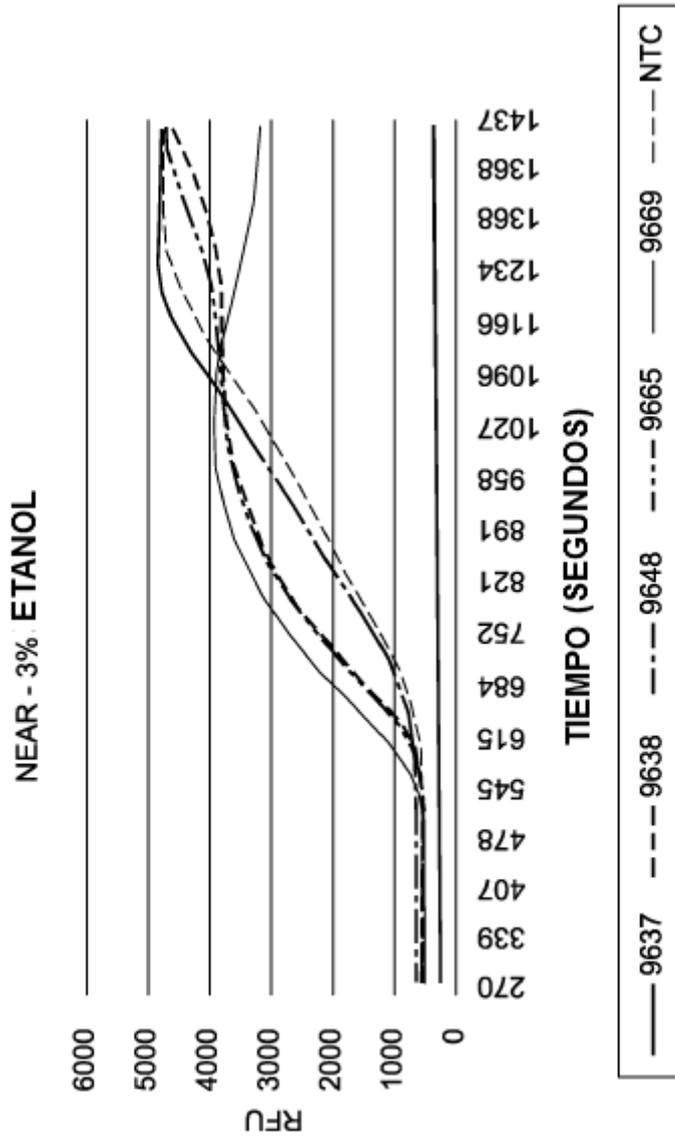


FIG. 5B.

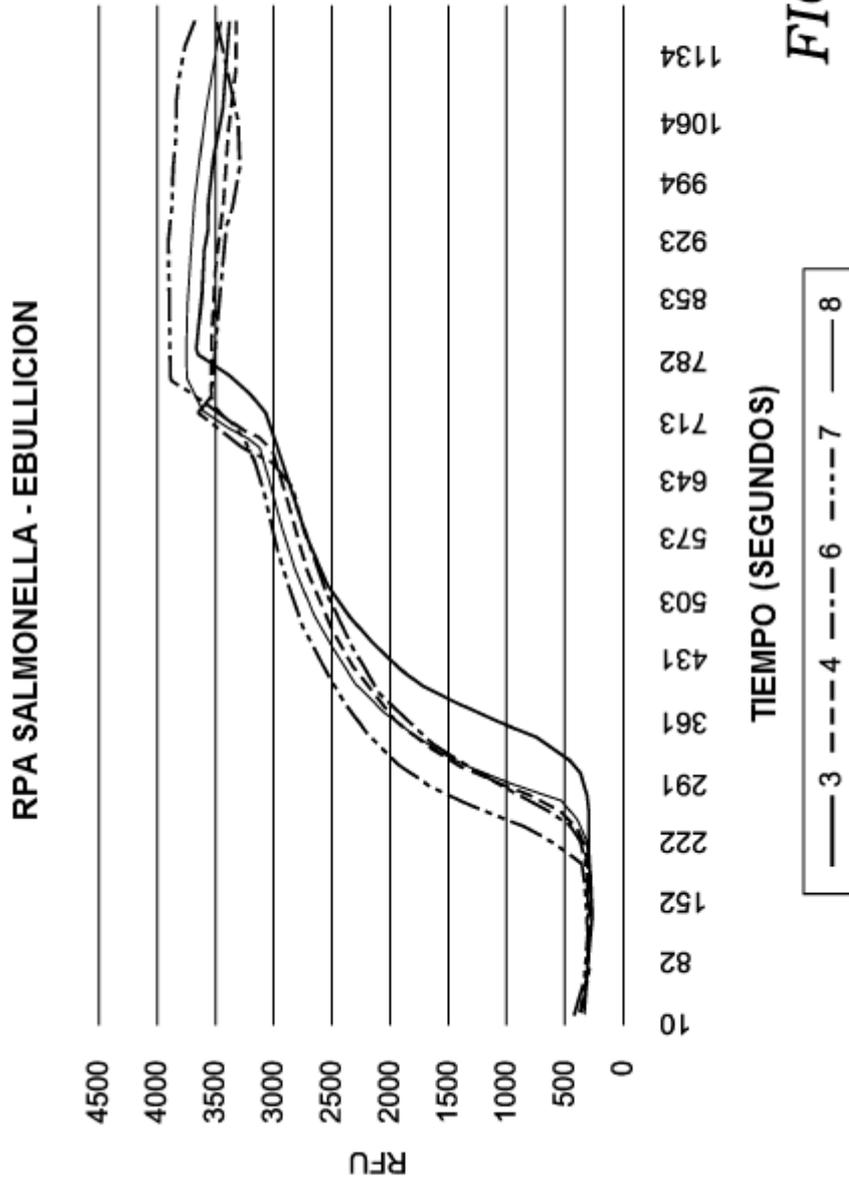


FIG. 6A.

RPA SALMONELLA - 3% ETANOL, 3 MIN. A 65°C

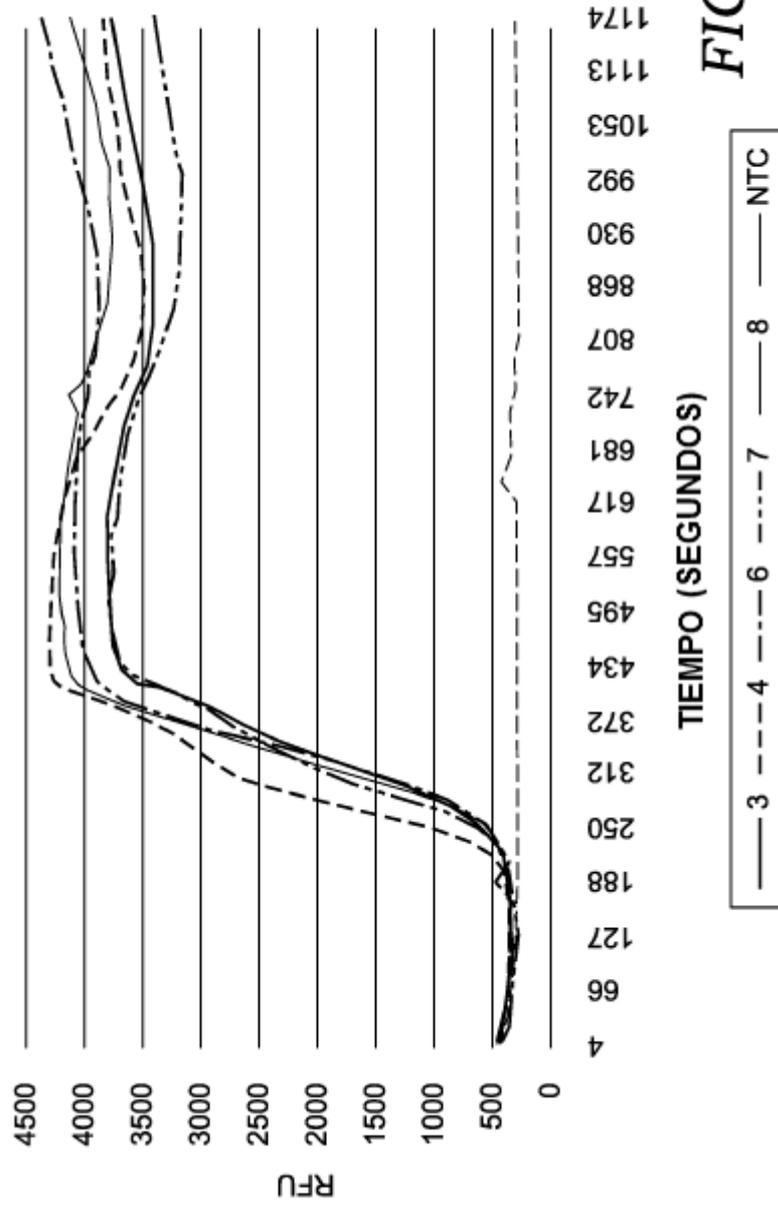
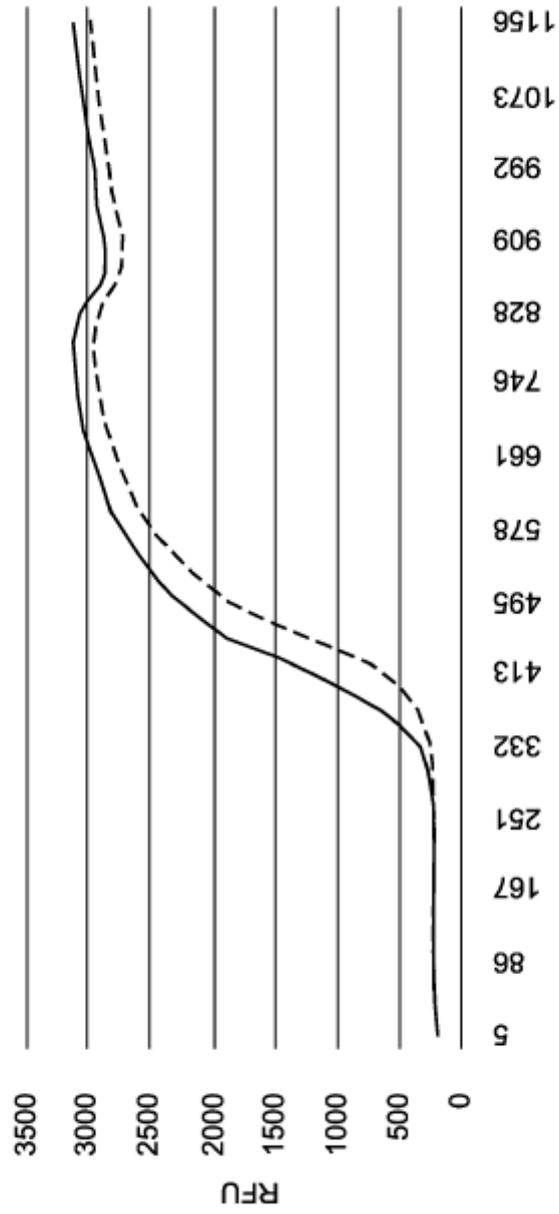


FIG. 6B.

RPA Stx2 - MUESTRAS HERVIDAS



TIEMPO (SEGUNDOS)

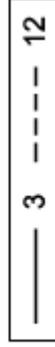
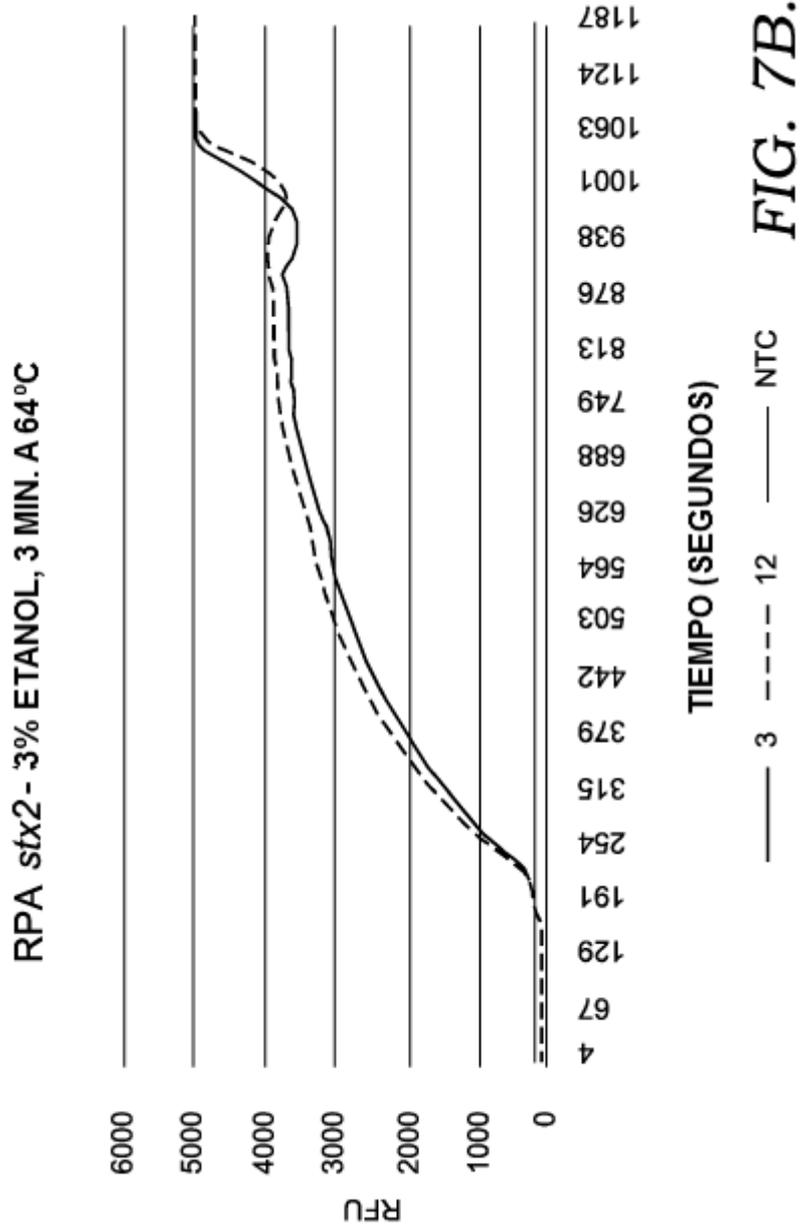


FIG. 7A.



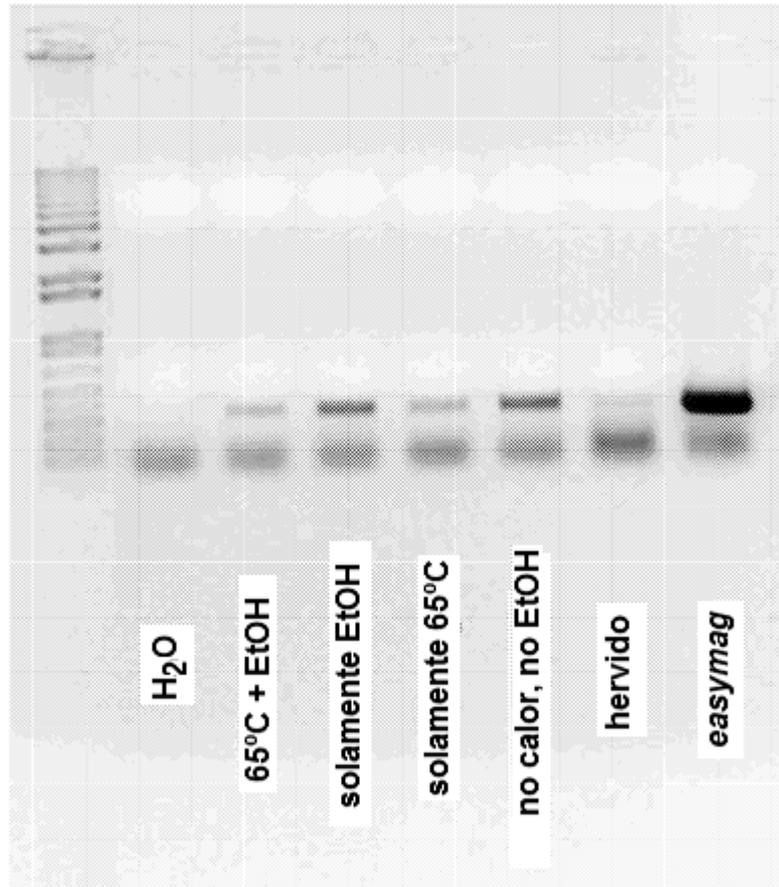


FIG. 8.

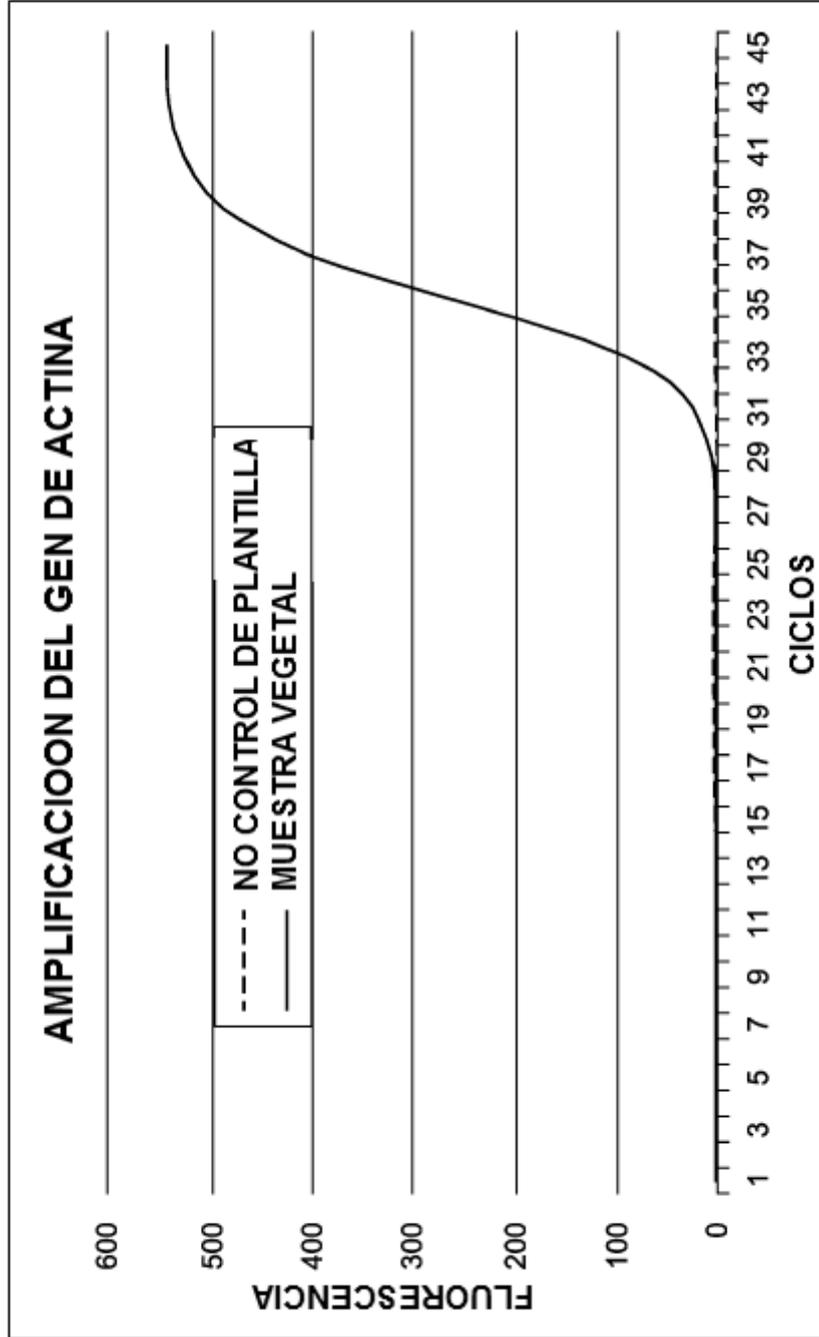
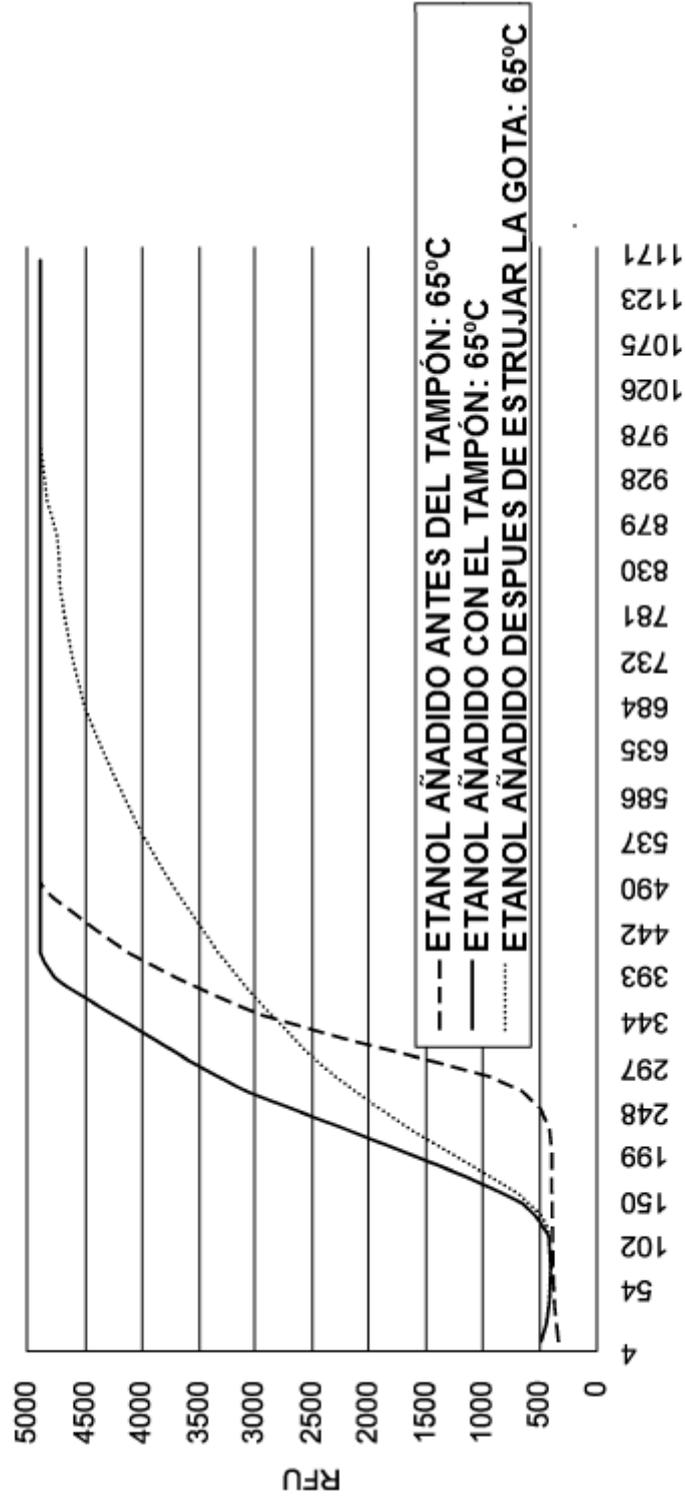


FIG. 9.

PREP. CRUDA DE MUESTRA 10235



TIEMPO (SEGUNDOS)

FIG. 10.