

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 382**

21 Número de solicitud: 202230844

51 Int. Cl.:

**C12N 7/02**

(2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**30.09.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.04.2024**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE BURGOS (100.0%)  
C/ Hospital del Rey s/n  
09001 Burgos (Burgos) ES**

72 Inventor/es:

**SANTAMARÍA PALACIOS, Jorge y  
RODRÍGUEZ LÁZARO, David**

54 Título: **Método de aislamiento, purificación y concentración de virus**

57 Resumen:

Método de aislamiento, purificación y concentración de virus.

La presente invención se refiere a un método para el aislamiento, purificación y concentración de virus a partir de una muestra de alimento o clínica. La muestra se somete a una lisis u homogeneización en una solución de extracción, y tras algunos pasos de purificación para eliminar partes inservibles de la muestra, se somete a una acidificación que permite la precipitación y aislamiento de los virus. Dicho método comprende más de una etapa de lisis de la muestra, cuando el virus es intracelular, y no está presente únicamente como contaminación superficial de la muestra. Dicho método permite mejorar la eficiencia de concentración de partículas víricas a partir de una misma muestra, por lo que se aumenta la sensibilidad de los pasos de extracción y detección posteriores. Además, dicho método no comprende el uso de disolventes orgánicos y permite extraer virus que se encuentran tanto en la superficie de la muestra como en el interior celular. Los virus capaces de ser detectados mediante el método de la presente invención son virus causantes de enfermedades transmisibles por alimentos como, por ejemplo, el virus de la hepatitis E.

ES 2 967 382 A1

## DESCRIPCIÓN

### Método de aislamiento, purificación y concentración de virus

5 La presente invención se refiere a un método para el aislamiento, purificación y concentración de virus a partir de una muestra de alimento o clínica. La presente invención tiene especial relevancia en el campo técnico de los controles de seguridad y toxicidad alimentaria, además del análisis de muestras clínicas. Este procedimiento permite la posterior extracción de ADN o ARN vírico y su detección o cuantificación por  
10 sistemas convencionales de amplificación de ácidos nucleicos, tales como PCR /qPCR /digital PCR, así como su empleo en ensayos de infectividad mediante el cultivo celular de los virus extraídos.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El empleo de técnicas como la PCR a tiempo real permite la detección y cuantificación de microorganismos, incluyendo partículas virales que pueden ser patógenas, o posibles riesgos. Los virus no pueden ser reproducidos en medios de cultivo como las bacterias, sino que necesitan líneas de cultivo celular muy sensibles y específicas, que  
20 solamente permiten el cultivo de algunos virus conocidos, y, en muchos casos, solamente de algunas líneas específicas de algunos virus. Para permitir la detección por PCR u otras técnicas, es necesario aislar, purificar de sustancias interferentes y concentrar los virus presentes en las muestras (como muestras alimentarias o clínicas). Los virus suelen estar presentes en cantidades bajas en las muestras (especialmente  
25 en las alimentarias), y como no es posible producir su multiplicación para facilitar su detección, es necesario contar con procedimientos de aislamiento, purificación y concentración que sean sensibles y permitan la detección de las partículas víricas a partir de una cantidad limitada de las mismas.

30 Las técnicas de aislamiento actuales, especialmente las referidas a aislamiento de virus a partir de muestras alimentarias, suelen emplear un pequeño volumen de muestra que muchas veces no es representativo de la misma, muchos se basan en el empleo de disolventes orgánicos, incrementando el coste de operación (los disolventes orgánicos son nocivos y volátiles, con lo que es necesario el empleo de cabinas de extracción y  
35 equipo especializado y generando residuos nocivos para el medio ambiente y con alto coste económico y medioambiental en su gestión). Actualmente la legislación

alimentaria únicamente hace obligatorio el análisis de ciertas bacterias, con lo que la gran mayoría de procedimientos de aislamiento de patógenos a partir de alimentos están diseñados para bacterias, y no son válidos para virus, por lo que es necesario crear nuevos métodos para permitir el control de enfermedades emergentes causadas por virus.

El control de las enfermedades transmitidas por alimentos conforma una prioridad de seguridad convirtiéndose en una preocupación para la industria alimentaria en los últimos años. Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que cada año una de cada diez personas en el mundo enferma por la ingesta de alimentos contaminados. Esto se traduce en una mayor presión en los sistemas de atención lo cual perjudica el desarrollo económico y social.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por microorganismos como bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas. Dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos, aquellas causadas por microorganismos, más concretamente virus, representan un gran porcentaje en el total, siendo el norovirus y el virus de la hepatitis A (VHA) dos de los principales agentes patógenos causantes de las mismas. Las infecciones por norovirus dan lugar a 1 de cada 5 casos de gastroenteritis aguda cada año. Los síntomas característicos de las infecciones causadas por norovirus son las náuseas, los vómitos explosivos, la diarrea acuosa y los dolores abdominales. Por otro lado, virus de la hepatitis A puede provocar enfermedades hepáticas persistentes y se transmite en general por la ingestión de mariscos crudos o poco cocinados o de productos crudos contaminados causando hasta un 2% el total de las enfermedades alimentarias cada año. Además, también existen otros agentes patógenos de tipo vírico implicados en el desarrollo de enfermedades transmitidas por alimentos tales como enterovirus, sapovirus, rotavirus, astrovirus, adenovirus y virus de la hepatitis E (VHE), los cuales presentan síntomas similares a los descritos. Estos agentes patógenos se pueden encontrar en el tracto gastrointestinal humano y son principalmente transmitidos debido a contaminación fecal por ejemplo mediante la manipulación de alimentos por personas infectadas.

Debido al gran impacto de las enfermedades alimentarias causadas por virus, es necesario implementar medidas de control de estos a lo largo de la cadena de

procesado y manipulación alimentaria. La mayoría de los métodos de detección de virus causantes de enfermedades alimentarias están basados en técnicas moleculares, tales como las basadas en PCR para la detección de ADN o ARN viral. En algunos casos se opta por el aislamiento directo de los ácidos nucleicos de la muestra, sin embargo, debido a la baja cantidad de virus en la misma se pueden dar lugar a falsos negativos. Por lo que para evitar ese problema se opta por realizar un aislamiento los virus de la matriz que conforma los alimentos y posteriormente se lleva a cabo una etapa de concentración a un volumen óptimo para así aumentar la sensibilidad de las etapas posteriores de detección.

En Butot, S., Putallaz, T., & Sanchez, G. (2007) *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 186-192, se describe un método para la detección de virus de la HAV, NV y rotavirus (RV) en muestras de diferentes vegetales. Para testar el método, las muestras vegetales analizadas fueron inoculadas con los virus mencionados para simular la contaminación. Los virus se extrajeron de la superficie de los alimentos mediante un método de elución directa en un tampón de glicina-Tris (pH 9,5) y se concentraron mediante ultrafiltración. Posteriormente, se realizó una centrifugación para concentrar las partículas víricas y finalmente se realizó una extracción de ARN para la etapa de detección mediante RT-PCR.

EP2467471B1 describe un método para el aislamiento de virus de una muestra de alimento o clínica donde la muestra fue tratada con una solución de extracción que contiene al menos una sal de cloruro divalente que permite la lisis de la matriz compleja que conforma la muestra de alimento o clínica. Posteriormente los virus fueron aislados por centrifugación o filtración. A diferencia de la misma, en la presente invención se emplea una acidificación para provocar la precipitación de las partículas virales asociada a la precipitación de otras proteínas. A diferencia del documento EP2467471B1, donde en los ejemplos únicamente se prueba la recuperación de virus añadidos artificialmente a la superficie del alimento, en la presente invención se prueba la extracción de virus intracelulares presentes en células hepáticas, es decir, presentes en el interior de las propias células de la muestra histológica o alimentaria de forma natural, que puede dificultar mucho la extracción de los mismos.

Por otro lado, WO2009091110A1 describe un método para el aislamiento y concentración de virus y/o bacterias de una muestra de alimento mediante ultrafiltración.

En Stals, A. *et al.*, (2011) Food microbiology, 28(1), 52-58 se describió un método para la concentración y aislamiento de virus en frutas, donde dicho método comprendía lavar la muestra de alimento con un tampón de elución y posteriormente se añadió PEG para precipitar las partículas víricas, además en el método se incluyó una etapa de tratamiento con disolventes orgánicos.

En vista del estado de la técnica, las principales estrategias para concentrar y aislar virus de muestras complejas como alimentos o muestras clínicas comprenden elución de los virus de la superficie de los alimentos, precipitación, ultrafiltración, centrifugación o uso de disolventes orgánicos. Sin embargo existen limitaciones en dichos métodos, ya que por ejemplo el uso de estrategias de elución solo permite asilar los virus presentes en la superficie de los alimentos y no aquellos que se encuentran en el interior de las células; el uso de disolventes orgánicos presenta riesgos de toxicidad y además son compuestos perjudiciales para el medio ambiente; la ultrafiltración o ultra centrifugación requiere el uso de equipos específicos y complejos no presentes en todos los laboratorios.

De modo que, en vista del estado de la técnica, existe la necesidad de proporcionar nuevos métodos para la concentración de virus a partir de muestras de alimentos o clínicas, donde dichos métodos permitan una fácil implantación en la rutina del laboratorio; permitan obtener una mayor eficacia en la concentración de los virus; posibiliten la extracción de virus del interior de las células de la muestra; y sean métodos más respetuosos con el medio ambiente y seguros.

25

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Los inventores han desarrollado un método aislamiento, extracción o purificación, y concentración de virus comprendidos en una muestra, donde dicho método permite mejorar la eficiencia de concentración de partículas víricas a partir de una misma muestra al usar más de una fase de lisis mecánica, por lo que se aumenta la sensibilidad de los pasos de extracción y detección posteriores. Además, evita el uso de disolventes orgánicos por lo que el método es más seguro, ecológico, económico y también más simple ya que no es necesario trabajar en cabinas de extracción de gases, ni almacenar productos tóxicos volátiles en zonas de almacenamiento especial y no implica la

35

generación de residuos con disolventes orgánicos, cuyo coste de gestión y tratamiento es muy alto y contaminante. Al no emplear disolventes orgánicos se reduce el riesgo de toxicidad asociado a la realización de los análisis (por el manejo de sustancias tóxicas y la inhalación de compuestos altamente volátiles e inflamables), además de reducir los efectos negativos para el medio ambiente debido a la capacidad contaminante de dichos disolventes, por lo que es un método más ecológico.

En los ejemplos mostrados más adelante, los inventores han empleado, a modo meramente ilustrativo y no limitante, el método de la presente invención para la extracción de virus de la Hepatitis E en muestras de hígado de cerdo, con la peculiaridad de que es un virus que se encuentra no solo contaminando la muestra superficialmente sino también en el interior de las células de la muestra, lo cual hace más difícil su extracción y concentración, y de que el hígado es una muestra compleja que contiene multitud de sustancias de diferente índole (grasas, enzimas, etc) algunas con capacidad de inhibir la PCR (el sistema posterior de detección de virus). Tras utilizar el método de aislamiento de la invención, se realizó la extracción del ARN con un kit comercial y se realizó la detección mediante qPCR. En comparación con otros métodos convencionales se consiguió una reducción de los Ct de qPCR significativa, es decir, se consiguió una mayor señal procedente de la misma muestra.

De modo que el método desarrollado por los inventores además permite extraer virus del interior celular y no solo de la superficie, lo cual permite aumentar la sensibilidad de la etapa de detección e identificar así contaminaciones víricas más allá de las producidas superficialmente por contaminación cruzada. En este sentido, en mucha de la literatura se han descrito métodos de concentración y extracción de virus de productos alimentarios vegetales, en los cuales los virus están en la superficie del alimento porque se han contaminado con el agua de riego, pero no así de virus que se encuentran y reproducen en el interior de las células. Tampoco se necesita el uso de materiales o aparatos específicos o complejos, por lo que el método aquí descrito se puede implementar de manera rutinaria en cualquier laboratorio.

Además, el método de la presente invención resulta en una mayor representatividad de la muestra al permitir emplear una porción mayor de la misma, lo cual es de relevancia especialmente en muestras tales como hígado de cerdo, embutido o piezas cárnicas.

La cantidad de muestra de partida para llevar a cabo el método de la presente invención es 0,1-25g, preferiblemente 0,25-4g.

5 Por todas estas ventajas, el método de aislamiento de virus de muestras de alimentos o clínicas descrito en la presente invención puede implementarse en el control de calidad del procesado, producción, manipulación y almacenaje de alimentos, así como en el tratamiento de muestras en el ámbito clínico (como tejidos, heces, sangre, etc..., tanto humanas como animales).

10 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método, de ahora en adelante el “método de la presente invención”, para el aislamiento y concentración de virus a partir de una muestra de alimento o clínica, donde dicho método comprende al menos una etapa de lisis de la muestra de alimento o clínica, una etapa de que permite la purificación de los virus al eliminar los componentes de la matriz de la muestra, y una  
15 etapa de acidificación que permite la precipitación y aislamiento de los virus de la muestra. Concretamente, el método de la presente invención comprende una etapa de acidificación de una solución o fracción líquida que comprende virus que se quieren aislar para su posterior análisis, donde la acidificación se lleva a cabo por medio de la adición de ácido a dicha solución o fracción líquida hasta un pH de entre 2 y 4,5, 20 preferiblemente a un pH de entre 3 y 4,5; más preferiblemente a un pH de entre 3,3 y 4,5; y más preferiblemente a un pH de entre 3,3 y 3,7.

En el contexto de la presente invención “aislar” o “aislamiento”, o sus sinónimos “extracción” y “purificación”, usados de forma intercambiable, se refieren a la separación  
25 de virus de la matriz compleja que conforma una muestra compleja que puede ser una muestra de alimento o clínica. El término “matriz compleja” se refiere en la presente invención a los componentes comprendidos en una muestra de alimento o clínica. Una matriz compleja comprende un mayor o menor número de diferentes compuestos de origen principalmente orgánico, que pueden ser líquidos, semisólidos y/o sólidos. Una  
30 muestra compleja según la presente invención comprende normalmente una matriz que comprende péptidos, polipéptidos, proteínas (incluso también enzimas), hidratos de carbono (complejos y/o simples), lípidos, ácidos grasos, grasa, y/o ácidos nucleicos, etc.

En el contexto de la presente invención “concentrar” o “concentración”, usados de  
35 manera intercambiable, se refiere al aumento de la concentración de virus a partir de

una muestra de alimento o clínica. La concentración final de virus es mayor que la concentración inicial en la muestra de alimento o clínica de partida.

El "virus", "partícula viral" o "partículas virales" tal y como se usa la presente invención,  
 5 de forma intercambiables, se refiere a un agente infeccioso que consiste en un ácido nucleico rodeado por una capa o envoltura protectora de proteína denominada cápside. La cápside está formada por subunidades de proteína idénticas denominadas capsómeros. La forma de la cápside puede servir como base para la distinción morfológica de los virus. Además, la cápside puede estar rodeada por una capa lipídica,  
 10 donde la envoltura es una bicapa lipídica.

El término "ácido nucleico" se refiere a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple o doble cadena.

15 En una realización preferida, el método de la presente invención comprende los siguientes pasos:

- a) Adición de una solución de extracción a la muestra;
- b) Lisar la mezcla del paso a);
- 20 c) Separar y aislar la fracción líquida de la mezcla del paso b);
- d) Adicionar ácido a la fracción líquida obtenida en el paso c) hasta alcanzar un pH de entre 2 y 4.5;
- e) Aislar dichos virus a partir de la mezcla del paso d).

25 La etapa c) permite la separación en dos fases de los componentes del producto resultante de la etapa b). Tras la etapa c) queda un sobrenadante que contiene los virus comprendidos en la muestra junto otros elementos como proteínas o ácidos nucleicos en suspensión; y un pellet que contiene los componentes de la matriz de la muestra, principalmente fragmentos de células resultantes de la lisis del paso b).

30 El ajuste de pH de la etapa d) hasta un pH ácido permite la concentración y aislamiento de los virus por medio de su precipitación. En disolución acuosa, los residuos hidrofóbicos de las proteínas de la superficie de los virus se acumulan en el interior de la estructura, mientras que en la superficie aparecen diversos grupos con carga eléctrica, en función del pH del medio. En condiciones fisiológicas las proteínas  
 35 de la superficie de los virus presentan en su parte exterior aminoácidos hidrofílicos con



carga que establecen interacciones con los dipolos del agua que se orientan conforme a la carga eléctrica de cada grupo, de tal manera que las proteínas de la superficie de los virus presentan una capa de solvatación formada por el agua de hidratación. Además, la carga de las proteínas da lugar a repulsiones electrostáticas entre las mismas que en conjunto con la capa de solvatación, evita que las proteínas de la superficie de diferentes partículas víricas se agreguen y precipiten.

En condiciones ácidas, tal y como se realiza en el paso d) del método de la presente invención, las proteínas de la superficie de los virus alcanzan su punto isoeléctrico, es decir, pH al cual las proteínas de la superficie de los virus tienen carga neta cero. Esto da lugar a la pérdida de interacciones con los dipolos del agua y además consecuencia no existe repulsión electrostática entre moléculas de proteínas vecinas, las cuales tienden a reunirse y precipitar, entonces la proteína presenta su mínima solubilidad dando lugar a la agregación y precipitación. En el método de la presente invención la reducción de la solubilidad de las proteínas mediante una reducción del pH en la etapa d) da lugar a la agregación de proteínas de la superficie de diferentes partículas virales o la agregación de las proteínas de la superficie de los virus con proteínas de la muestra, dando lugar a la precipitación de los virus.

En una realización preferida, la etapa de lisis b) del método de la presente invención comprende:

- b1) una primera etapa de lisis de la mezcla del paso a);
- b2) adicionar una cantidad adicional de la solución de extracción empleada en el paso a) al producto resultante de la primera etapa de lisis b1);
- b3) segunda etapa de lisis de la mezcla resultante del paso b2).

La doble lisis permite no solo concentrar y aislar los virus o partículas víricas de la superficie de la muestra de alimento o clínica, sino que también permite concentrar y aislar los virus o partículas víricas que se replican en el interior de las células de la muestra de alimento o clínica, por lo que se aumenta la cantidad de virus que se pueden aislar de una muestra. Esto permite aumentar la sensibilidad de los métodos de detección de los virus que se apliquen posteriormente, arrojando resultados más fiables. La doble lisis se lleva a cabo en muestras que comprenden virus tanto en su superficie como en el interior de las células, preferiblemente el tipo de muestra a la que se aplica

la doble lisis es una muestra de alimento cárnica o muestra clínica de tejido sólido, por ejemplo, muestras de hígado, corazón o riñón entre otros.

El término “solución de extracción” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una solución acuosa o solución tampón resistente a los cambios de pH cuando se añaden ácidos o bases a la disolución o composición. Esta resistencia al cambio de pH se debe a las propiedades de tamponamiento de tales disoluciones. Por tanto, disoluciones o composiciones que presentan actividad de taponamiento se denominan tampones o disoluciones tampón. Los tampones generalmente no tienen una capacidad ilimitada para mantener el pH de una disolución o composición. Más bien, normalmente pueden mantener el pH dentro de determinados intervalos, por ejemplo, entre pH 7-9. En una realización preferida del método de la presente invención el pH de la solución de extracción se encuentra entre 7-9.

En una realización preferida, el método de la presente invención se lleva a cabo sin el uso de disolventes orgánicos. El término disolvente orgánico se refiere, sin limitación, a compuestos tales como, Trizol, cloroformo, butanol, hexano, Quiazol y fenol, entre otros.

En otra realización preferida del método de la presente invención, la cantidad de muestra de alimento o clínica de partida para llevar a cabo el método es de entre 0,1 y 25 g, preferiblemente de entre 0,25 y 4 g. Dependiendo de la matriz de la muestra que se desee analizar, la cantidad de muestra a emplear en el método será una u otra dentro de este rango dado. Por ejemplo, para muestras de hígado de cerdo fresco, la cantidad de muestra será de 0,3 a 0,5 g. Sin embargo, para embutidos secos, esta cantidad será mayor, entre 1 y 4 g. En los ejemplos el método se expone para hígado de cerdo, tomando 0,5 gramos del mismo, y para embutidos crudos curados grasos (chorizo, salchichón), tomando 2,5 gramos de los mismos.

En otra realización preferida del método de la presente invención, en la etapa a) la solución de extracción se añade en una proporción de entre 1:1 y 1:40 en peso/volumen (p/v, donde el peso es de la muestra y el volumen de la solución de extracción) con respecto a la cantidad de muestra de alimento o clínica. Preferiblemente, la solución de extracción se añade en la etapa a) en una proporción de 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:8, 1:6, 1:4, 1:2 o 1:1 en p/v respecto a la cantidad de muestra de alimento o clínica. Más preferiblemente, la solución de extracción se añade en la etapa a) en una proporción de

entre 1:1 y 1:2 en p/v respecto a la cantidad de muestra de alimento o clínica. Por ejemplo, para 0,5 g de muestra de alimento, la cantidad de solución de extracción a añadir en la etapa a) es de 0,25 ml.

- 5 En otra realización preferida del método de la presente invención, la cantidad adicional de solución de extracción de la etapa b2) se añade en una proporción de entre 2:1 y 16:1 en peso/volumen (p/v, donde el peso es de la muestra y el volumen de la solución de extracción) con respecto a la cantidad muestra de alimento o clínica. Preferiblemente la cantidad de solución de extracción de la etapa b2) se añade en una proporción de  
10 2:1, 4:1, 6:1, 8:1,10:1, 14:1, expresado en p/v, respecto a la muestra de alimento o clínica, más preferiblemente la solución extracción se añade en el paso b2) en una proporción de entre 8:1 y 14:1, expresado en p/v, respecto de la cantidad de muestra de alimento o clínica. Por ejemplo, para 0,5 g de muestra de alimento se añadirían en el paso b2) 3,75 ml de solución tampón, que con los 0,25 ml añadidos en el paso a)  
15 harían un total de 4 ml.

En una realización preferida del método de la presente invención, la separación y asilamiento de la fracción líquida de la etapa c) se lleva a cabo por métodos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo centrifugación, decantación o filtración. Tras  
20 la aplicación de cualquiera de los métodos de centrifugación, decantación o filtración, fracción líquida puede ser separada y aislada de la fracción que comprende los restos de la muestra no disueltos.

La fracción líquida se entiende como la fracción que comprende la solución de  
25 extracción que contiene los virus junto con otras moléculas procedentes de la lisis de la muestra de alimento o clínica, como, por ejemplo, proteínas (incluso también enzimas), hidratos de carbono (hidratos de carbono complejos y simples) o ácidos nucleicos.

La fracción sólida o fracción que comprende los restos de la muestra de tejido no  
30 disueltos se refiere a la fracción que comprende restos de pared celular de las células de la muestra, restos de matriz extracelular de la muestra, células que no se han lisado en la etapa de lisis o restos de tejido de la muestra que no se haya lisado o disgregado en la etapa de lisis.

En una realización preferida, la filtración se lleva a cabo usando filtros o membranas con un tamaño de poro de entre 0,05 y 0,5  $\mu\text{m}$ , preferiblemente el tamaño de poro es de entre 0,05 y 0,3  $\mu\text{m}$ ; más preferiblemente el tamaño del poro es de entre 0,1 y 0,2  $\mu\text{m}$ . El filtro o membrana puede ser de acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliamida (nylon), policarbonato, polipropileno, polietilensulfato y politetrafluoroetileno. En esta fase de filtrado pueden emplearse prefiltros con tamaño de poro superior, que retengan grandes partículas, antes de emplear el filtro final, con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ .

En una realización más preferida del método de la presente invención, la separación y asilamiento de la fracción líquida de la etapa c) se lleva a cabo mediante centrifugación.

En una realización preferida la centrifugación de la etapa c) se realiza a baja temperatura, donde dicha centrifugación se lleva a cabo a una temperatura de entre 1 y 15°C, preferiblemente de entre 2 y 10°C; y más preferiblemente a 4°C.

En otra realización preferida del método de la presente invención, en el paso c) la centrifugación se lleva a cabo durante al menos 5 minutos a 1500-5000 x g, preferiblemente durante 15-20 minutos a 1500-3750 x g; donde dicha centrifugación se lleva a cabo a una temperatura de entre 1 y 15°C, preferiblemente de entre 2 y 10°C; y más preferiblemente a 4°C. En una realización más preferida del método de la presente invención, en el paso c) la centrifugación se lleva a cabo durante 15-20 minutos a 1500-3750 x g; donde dicha centrifugación se lleva a cabo a una temperatura de 4°C.

La centrifugación a baja temperatura permite separar los componentes de la solución del paso b) diferenciándolos en una fracción sólida en la parte inferior, una fracción líquida que se encuentra en la parte superior de la fracción sólida y una fase de espuma y grasa que se encuentra en la parte superior de la fracción líquida. De modo que la fracción líquida obtenida en el paso c), la cual contiene los virus de la muestra, puede ser aislada de la fracción sólida y la fase de espuma y grasa. La fracción líquida obtenida en el paso c) conforma una mezcla que comprende la solución de extracción que contiene los virus junto con otras moléculas procedentes de la lisis de la muestra de alimento o clínica, como, por ejemplo, proteínas (incluso también enzimas), hidratos de carbono (hidratos de carbono complejos y simples) o ácidos nucleicos.

35

En una realización preferida, tras la centrifugación del paso d) se separa y aísla físicamente, preferiblemente mediante el empleo de micropipetas, la fracción líquida. Más concretamente se separa la fracción líquida situada entre el pellet inferior y la fase superior que comprende grasa y espuma. Dicha fracción líquida se transfiere a un nuevo  
 5 recipiente, preferiblemente a un tubo de 15 ml de polipropileno, tipo Falcon. Esta fracción líquida es sometida a un ajuste de pH mediante la adición de un ácido.

El aislamiento de virus de la etapa e) se puede llevar a cabo mediante un método conocido por un experto en la materia. En una realización preferida, en la etapa e) el  
 10 aislamiento de dichos virus a partir de la mezcla de la etapa d) se realiza mediante un método seleccionado de la lista que comprende centrifugación, precipitación, precipitación con polietilenglicol o inmunoprecipitación, filtración, filtración en gel, tamizado, electroforesis en gel, dielectroforesis, ultrasonidos y unión por afinidad, por ejemplo usando anticuerpos, lectinas, proteínas que se unen a virus, o aptámeros.

15 En otra realización preferida, en la etapa e) el aislamiento de dichos virus a partir de la mezcla de la etapa d) se realiza mediante centrifugación, donde dicha centrifugación se lleva a cabo durante al menos 5 minutos a 5000-15000 x g, preferiblemente durante 15-20 minutos, más preferiblemente durante 20 minutos a 10000-14000 x g; donde dicha  
 20 centrifugación se lleva a cabo a una temperatura de entre 1 y 15°C, preferiblemente de entre 2 y 10°C y más preferiblemente a 4°C. En una realización más preferida en la etapa e) el aislamiento de dichos virus a partir de la mezcla de la etapa d) se realiza mediante centrifugación, preferiblemente durante de entre 15 y 20 minutos a 10000-14000 x g; donde dicha centrifugación se lleva a cabo a una temperatura de entre 1 y  
 25 15°C, preferiblemente de entre 2 y 10°C; y más preferiblemente a 4°C.

En otra realización preferida del método de la presente invención, la solución de extracción de las etapas a) y b2) es seleccionado de la lista que consiste en: una solución acuosa que comprende  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , NaCl y KCl a una concentración  
 30 de 5-20 g/L, 0,4-3 g/L, 50-100 g/L, 0,5-5 g/L respectivamente; una solución acuosa que comprende  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración de 10-40 g/L, 0,4-3 g/L y 35-200g/L respectivamente; una solución acuosa que comprende  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , NaCl, KCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración de 10-40 g/L, 0,4-3 g/L, 40-100g/L, 0,5-5 g/L y 35-200 g/L respectivamente; tampón de solución salina tamponada

con fosfato (PBS); tampón de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS); tampón de solución salina tamponada con TRIS (TBS); tampón TRIS-HCl; y TRIS/EDTA (TE).

En una realización más preferida la solución de extracción de las etapas a) y b2) es  
 5 seleccionado de la lista que consiste en: una solución acuosa que comprende  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , NaCl y KCl a una concentración de 10-20 g/L, 0.5-2.5 g/L, 70-90 g/L, 1.5-2.5 g/L respectivamente; una solución acuosa que comprende  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración de 20-30 g/L, 0.4-1 g/L y 65-150g/L respectivamente; una  
 10 solución acuosa que comprende  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , NaCl, KCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración de 20-30 g/L, 0.4-1 g/L, 50-80g/L, 1-2.5 g/L y 60-90 g/L respectivamente.

La composición de las soluciones de extracción puede ser ajustados en la concentración de sus componentes para diferentes muestras. Estos están optimizados para muestras  
 15 de tejidos y cárnicas, en especial de hígado.

En otra realización preferida, el ajuste de pH del paso d) se lleva a cabo mediante la adición de un ácido, donde dicho ácido es seleccionado de la lista que consiste en ácido clorhídrico (HCl), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ácido yodhídrico (HI) y  
 20 ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ); o cualquier ácido, entendido como sustancia capaz de reducir el pH de la muestra hasta los valores indicados, preferiblemente HCl 1M. En el paso d) el pH se ajusta hasta llegar a un valor de entre 2 y 4,5. En una realización preferida el pH del paso d) se ajusta a un valor de entre 3 y 4,5. En una realización preferida el pH en el paso d) se ajusta a un valor de entre 3,3 y 4,5. En una realización  
 25 preferida el pH en el paso d) se ajusta a un valor de entre 3,3 y 3,7. Dependiendo del virus a detectar y de la matriz alimentaria o clínica, este pH puede ajustarse dentro de dicho rango. Por ejemplo, para una muestra de hígado de cerdo, el pH se ajusta en este paso a entre 3,3 – 3,7. Para muestras de alimentos cárnicos curados crudos, se ajusta a 3,4-4,5.

30

El término “lisis” se refiere al procedimiento que lleva a la rotura de la membrana de las células o la envoltura de los virus mediante medios físicos o mecánicos, y también a la rotura de los propios tejidos de la muestra, ya sea matriz alimentaria o clínica.

En una realización preferida la lisis de la etapa b), b1) y b3) se lleva a cabo mediante lisis mecánica. Los métodos de lisis mecánica en la presente invención pueden comprender, sin limitación, el uso de sonicadores, homogeneizadores de cuchilla, prensas o agitación con materiales abrasivos, u otro tipo de homogeneizadores tipo Stomacher o tipo FastPrep.

En una realización preferida del método de la presente invención, las etapas de lisis de b), b1) y b3) son etapas de lisis mecánica que se llevan a cabo mediante agitación con esferas.

En una realización más preferida las esferas son de vidrio, cerámica, metal u otros materiales conocidos en la técnica, preferiblemente las esferas son de cerámica.

En una realización aún más preferida el diámetro de las esferas es de entre 0,1 y 10 mm. Preferiblemente, el diámetro de las esferas es de entre 2 y 8 mm, preferiblemente de entre 5 y 7mm, más preferiblemente 6,35 mm.

En una realización preferida, las esferas son de cerámica con un diámetro de 6.35mm.

En otra realización preferida, la lisis mecánica de los pasos b), b1) y b3) se lleva a cabo en un tubo de polipropileno de 15 ml.

En otra realización preferida, la lisis de la muestra, preferiblemente mediante agitación con esferas, se lleva a cabo durante menos de 10 minutos, menos de 5 minutos, menos de 2 minutos, menos de 1 minuto, menos de 50 segundos, menos de 40 segundos, menos de 30 segundos o preferiblemente menos de 20 segundos.

Dicha lisis, preferiblemente mediante agitación con esferas, se lleva a cabo, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante agitación manual, agitadores orbitales, agitadores vórtex o agitadores u homogeneizadores como los comercializados por MP Biomedicals.

En una realización preferida, la lisis del paso b) se lleva a cabo en un homogeneizador (FastPrep) mediante al menos 2 ciclos de 40 segundos a 6 m/s con 300 segundos de descanso entre ciclos, para no calentar la muestra.

En una realización preferida, la lisis de la muestra del paso b1) se lleva a cabo en un homogeneizador (FastPrep) mediante 2 ciclos de 40 segundos a 6 m/s con 300 segundos de descanso entre ciclos, para no calentar la muestra. Y la lisis del paso b3) se lleva a cabo en un homogeneizador (FastPrep) mediante 3 ciclos de 40 segundos a 6 m/s con 300 segundos de descanso entre ciclos, para no calentar la muestra.

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

La mezcla resultante del paso e) debe ser utilizada rápidamente, bien para la extracción del material genético (ADN o ARN) mediante la disolución de la mezcla en el buffer de lisis de los kits indicados para tal fin, los cuales se encuentran por ejemplo comercialmente disponibles, o bien para resuspenderla en solución tampón, preferiblemente PBS, para posteriores ensayos de infección en cultivos celulares.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de virus en una muestra de alimento que comprende los pasos descritos anteriormente para el método de la presente invención y una etapa adicional f) donde se detectan y/o cuantifican las partículas víricas presentes en la mezcla resultante del paso e).

En otra realización preferida, para la detección y/o cuantificación de las partículas víricas se extrae el material genético (ADN y/o ARN) vírico presente en la mezcla resultante del paso e) y se llevan a cabo posteriormente uno o varios métodos moleculares de amplificación de ácidos nucleicos y/o ensayos inmunohistoquímicos.

Preferiblemente, los ensayos inmunohistoquímicos comprenden el uso de sondas y/o anticuerpos específicos de virus. Ejemplos de ensayos inmunohistoquímicos son, pero sin limitarnos, ensayos tipo ELISA, *Western blot*, inmunoprecipitación, *arrays* de proteínas, inmunofluorescencia, o cualquier otro método enzimático, mediante la incubación con un ligando específico, mediante RMN o cualquier otra técnica de



diagnóstico por imagen, o, por ejemplo, mediante técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas.

Preferiblemente, el método molecular de amplificación de ácidos nucleicos es PCR, más  
5 preferiblemente donde la PCR es seleccionada de la lista que consiste en: qPCR, RT-PCR, RT-qPCR o PCR digital.

El ARN y/o ADN de los virus es extraído en el paso f) para detectar y/o cuantificar  
posteriormente la presencia de virus para lo cual, dicho material genético es sometido a  
10 algún método de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, PCR. La extracción del ARN y/o ADN es llevada a cabo por métodos conocidos para la persona experta en la materia, tales como extracción en fenol-cloroformo, centrifugación en gradiente de densidad, cromatografía en celulosa de oligo dT, uso de matrices de sílice o cromatografías de intercambio aniónico, sin limitación a las opciones de la presente lista.

15 En otra realización preferida de los dos métodos de la presente invención, el virus es seleccionado de la lista que consiste en: parvovirus, sapovirus, astrovirus, coronavirus, adenovirus, enterovirus, norovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E, astrovirus, rotavirus, adenovirus, virus Norwalk / de tipo Norwalk (Caliciviridae) o  
20 cualquier combinación de estos. Preferiblemente el virus es el virus de la hepatitis E.

En la presente invención, la “muestra” es una muestra de alimento o clínica. El término  
“muestra” se refiere a cualquier matriz de muestra, líquida o sólida, que contenga un  
mayor o menor número de diferentes compuestos de origen principalmente orgánico,  
25 como pueden ser péptidos, polipéptidos, proteínas (incluso también enzimas), hidratos de carbono (hidratos de carbono complejos y simples), lípidos, ácidos grasos, grasa, ácidos nucleicos, etc. La “muestra” también puede contener una o más sustancias que interfieran con el aislamiento y/o la detección de los virus, por ejemplo, inhibiendo la amplificación de los ácidos nucleicos virales.

30 En otra realización preferida de los métodos de la presente invención, la muestra de alimento o alimentaria procede de un producto cárnico, huevo, lácteo, fruta, fruto seco, hortaliza, verdura, legumbre, cereal, marisco o pescado.

35 En una realización más preferida de los métodos de la invención, la muestra de alimento procede de una muestra de alto contenido proteico, más preferiblemente procede un

producto cárnico. Aún más preferiblemente, el producto cárnico es seleccionado de la lista que consiste en: hígado, riñones, cerebro, corazón, piezas cárnicas frescas, productos curados como embutidos o carnes que proceden de vacuno, cabra, cordero, ovino, cerdo, ternera, caballo, aves de corral, incluyendo pollo, pavo, pato, ganso, pichón, avestruz o emú.

En una realización preferida de los métodos de la invención, la muestra de alimento procede de un producto cárnico, preferiblemente hígado, más preferiblemente hígado de cerdo.

En otra realización preferida el producto lácteo es seleccionado de la lista que comprende, sin limitación, leche, en particular leche fresca o cruda, incluyendo la leche en polvo, yogur, queso o helado. Preferiblemente la leche es de leche de vaca, oveja, cabra, yegua, burra, camella, yak, búfala de agua y rena.

En otra realización preferida la fruta es seleccionada de la lista que comprende, bayas, fresa, frambuesa, sandía, melón, arándanos, plátano, manzana o pera.

En una realización preferida los frutos secos son seleccionados de la lista que comprende almendras, nueces y piñones, semillas oleaginosas, incluyendo semillas de girasol, colza y sésamo.

En otra realización preferida la hortaliza es seleccionada de la lista que comprende, hortaliza de raíz incluyendo patata, tapioca y nabos, hortalizas de hoja, incluyendo amaranto, espinaca y col, plantas marinas, incluyendo dulce, kombu y Alaria esculenta, hortalizas de tallo, incluyendo brotes de bambú, nopales y espárragos, plantas con inflorescencias, incluyendo alcachofas, brócoli y lirios de día, y hortalizas de fruto, incluyendo calabaza, oca y berenjena, frutas, hierbas y especias.

En otra realización preferida las legumbres son seleccionadas de la lista que comprende, guisantes, garbanzos, lentejas, soja, cacahuete, judías o frijoles.

En otra realización preferida los cereales son seleccionados de la lista que comprende arroz, cebada, centeno, maíz, trigo, cebada o centeno.

En otra realización preferida marisco es seleccionado de la lista que comprende, moluscos y crustáceos.

En otra realización preferida el pescado es seleccionado de la lista que comprende,  
5 atún, salmón, merluza, bacalao, lubina o rape.

En una realización preferida la muestra clínica es seleccionada de la lista que comprende sangre completa, heces, orina, esputo, vómito, saliva, líquido amniótico, plasma, suero, lavado pulmonar y tejidos, incluyendo, pero sin limitarse a, hígado, bazo,  
10 riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas y similares. Este tipo de muestras pueden ser tanto humanas como animales, por lo que la consideración de clínica o alimentaria es relativa (por ejemplo, la sangre de cerdo puede considerarse muestra alimentaria o clínica, según la perspectiva). También incluye cualquier tipo de homogeneizado de una o varias de las muestras anteriormente indicadas.

15

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1** Diagrama de flujo del método de la presente invención. Izquierda) Protocolo de  
20 aislamiento, purificación y concentración de virus de la hepatitis E en muestras de hígado de cerdo. Derecha) Protocolo general de aislamiento, purificación y concentración de virus en muestras de alimento o clínicas.

## EJEMPLOS

25

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de la invención.

### **Ejemplo 1. Detección del virus de la hepatitis E en muestras de hígado de cerdo.**

30

Se llevó a cabo el método de la presente invención comparándolo con otros métodos descritos.

Se partió de muestras de hígado de cerdo tomadas en diferentes mataderos,  
35 procedentes de un estudio con representación de toda la producción de porcino nacional

(España). Las muestras de hígados se mantuvieron congeladas, que previamente han sido sometidas a detección del virus de la Hepatitis E de la forma descrita en el artículo “Occurrence of Hepatitis E virus in Pigs and Pork Cuts and Organs at the time of Slaughter, Spain, 2017” (García, N. et al., (2020) *Frontiers in Microbiology*, 10, 2990) doi:10.3389/fmicb.2019.02990 (método 1). Se empleó una colección de 20 hígados que han resultado positivos.

Se comparan 3 métodos de aislamiento, purificación y concentración: el diseñado por los inventores, el descrito en el artículo mencionado anteriormente (método 1), que emplea Quiazol y cloroformo, y un método considerado de referencia, descrito en el artículo “Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method” (Szabo, K., et al. (2015). *International Journal of Food Microbiology*, 215, 149-156) <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.013> (método 2), que emplea el reactivo Trizol y cloroformo. Los métodos 1 y 2 emplean disolventes orgánicos, mientras que el método descrito por los inventores no lo hace. La extracción del RNA se lleva a cabo con el mismo kit comercial para las 3 técnicas comparadas. La detección mediante RT-qPCR se lleva a cabo exactamente igual para las 3 técnicas comparadas.

## 20 Materiales y Métodos

Las muestras de hígado fueron picadas finamente mediante el empleo de bisturís con cuchillas estériles. Una vez picadas, se tomó una porción de cada muestra para llevar a cabo los tres métodos comparados. A continuación, se describen los procedimientos de cada uno de los métodos comparados:

Método 1. Es el método descrito en García, N. et al., (2020). Se tomaron 100mg de homogenado en un tubo de 2ml de Fastprep con 200 µl de PBS y 2g de esferas de cerámica (“zirconia beads”) de 1mm, y se somete a disrupción mecánica (FastPrep 24 5G, MP Biomedicals, USA) 3 ciclos de 40s a 6m/s, con 300s de descanso entre ciclos. Después se añade 1ml de QUIazol (Qiagen, Germany), se agita en vortex durante 30 segundos y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 200 µl de cloroformo:isoamylalcohol (24:1 Sigma aldrich), se agita en vortex durante 30 segundos y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 15 minutos a 12000 x g a 4°C. El sobrenadante se emplea para la extracción de RNA.

Método 2. Es el método descrito en Szabo, K., et al. (2015) modificado para ser comparable. Se toman 300mg de hígado en un tubo de polipropileno de 15ml, se añaden 2 de esferas de cerámica ("zirconia beads") de 6.35mm de diámetro (MP Biomedicals, Germany) y 1,05ml de Trizol (Invitrogen, USA) (se mantiene la proporción del protocolo original, en el método de Szabo emplean 7ml para una muestra de 2g de hígado). Se somete a disrupción mecánica (FastPrep 24 5G, MP Biomedicals, USA) 5 ciclos de 40s a 6m/s, con 300s de descanso entre ciclos. Se realiza una centrifugación a 10000 x g 4°C 20 minutos, tras lo cual se toma el sobrenadante, y se añaden 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol. La muestra se agita en vortex durante 15 segundos y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 10000 x g 4°C 15 minutos, y el sobrenadante se emplea para la extracción de RNA.

Método 3. Es el método de la presente invención (figura 1 izquierda). Por cada muestra se tomaron 4 porciones de 300mg de hígado y se depositaron en distintos tubos de polipropileno de 15ml, por cada tubo se añadieron 2 esferas de cerámica de 6.35mm de diámetro (MP Biomedicals, Germany). En cada uno de los cuatro tubos de cada muestra se añadió uno de las soluciones de extracción de la tabla 1. Se añaden 250 µl de solución de extracción.

20

Tabla 1. Composición de las soluciones de extracción usadas en el método de la presente invención.

Solución de extracción	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	NaCl (g/L)	KCl (g/L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)
A1	11,5	2	80,6	2,2	0
A2	16,56	0,6	60,44	1,648	0
B	26,32	0,6	0	0	70,6
C	26,32	0,6	60,44	1,648	70,6

1. La composición de la solución de extracción puede ser ajustada en la concentración de sus componentes para diferentes muestras. Estos están optimizados para muestras de tejidos y cárnica, en especial de hígado. Lisis en FastPrep de 2 ciclos de 40segundos a 6m/s con 300 segundos de descanso entre ciclos para no calentar la muestra.

2. Se añaden otros 3,75ml de solución de extracción, y se somete a disrupción mecánica (FastPrep 24 5G, MP Biomedicals, USA) 3 ciclos de 40s a 6m/s, con 300s de descanso entre ciclos.
3. Centrifugación a 4°C 15 minutos a 3750 x G.
- 5 4. Sin dejar que las muestras se calienten, se recuperan 3,7ml de sobrenadante (evitando recuperar grasa superficial si la hubiera, por eso es importante que la muestra no se caliente). Separación física utilizando micropipetas de la parte acuosa entre el pellet inferior y la fase de grasa y espuma superior. Se recupera esa fase acuosa y se transfiere a un nuevo tubo de 15ml.
- 10 5. Se adiciona ácido hasta pH entre 3 y 4 (para hígado 3,4-3,6) (este pH puede ajustarse según el virus que se busque y la matriz alimentaria).
6. Se centrifuga a 4°C 20 minutos a 13250x G.
7. Se descarta el sobrenadante y se toma el pellet que contiene los virus.
- 15 A partir de este paso se emplea la misma técnica de extracción y detección del RNA viral para los 3 métodos ensayados.
8. Se emplea el kit de extracción de RNA comercial QIAamp Viral RNA mini kit de QIAGEN, para extraer el RNA del virus VHE, siguiendo las instrucciones del fabricante y tratando los precipitados como muestras de 200mg. Se realiza la elución en 60µl.
- 20 9. Se realiza la detección de RNA de VHE por RT-qPCR. Se emplea la enzima TaqMAN Fast Virus 1-step Master Mix (Applied Biosystems), con volúmenes de 10 µl por reacción, de los cuales 2,5 µl son el RNA extraído. Se realiza la RT-qPCR en termociclador Quantstudio 5 (applied biosystems) con el siguiente programa: 15 minutos de incubación a 50°C y 2 minutos de activación de la enzima a 94°C, seguidos de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se emplean los cebadores y sonda de la tabla 2.
- 25
- 30

Tabla 2. Cebadores y sonda empleados para la detección de VHE por PCR

Nombre	SEQ ID	Secuencia de nucleótidos
Cebador directo VHEj_FW (FW)	SEQ ID NO: 1	GGT GGT TTC TGG GGT GAC
Cebador reverso VHEj_RV (REV)	SEQ ID NO: 2	AGG GGT TGG TTG GAT GAA
Sonda VHEj_TP (PROBE)	SEQ ID NO: 3	FAM-TGA TTC TCA GCC CTT CGC -MGBNFQ

El sistema de cebadores y sonda es el descrito en Johtikumar N,et al. (2006) *Journal of virological methods*, 131(1), 65-71 , con ligeras modificaciones, ya que la sonda es una sonda taqman MGB (“minor groove binder”).

### Resultados

Comparación estadística de los métodos de extracción:

Los resultados del ANOVA multifactorial con interacción, tomando como factores el método y la muestra, indican que ambos factores son significativos para un nivel de confianza del 95%, y que la interacción de ambos factores también es significativa (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Análisis de varianza- Suma de los cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de los cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Val
<b>Efectos principales</b>					
<b>A:Metodo</b>	104,801	5	20,9602	95,51	0,0000
<b>B:Muestra</b>	7773,14	20	388,657	1771,00	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	701,64	100	7,0164	31,97	0,0000
<b>RESIDUAL</b>	55,303	252	0,219457		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	8634,88	377			

El test de homogeneidad de los grupos respecto al método, con un nivel de confianza del 95%, arroja los mismos resultados para el método LSD, Tuckey HSD, Scheffe, Bonferroni, Student-Newman-Keuls y Duncan, que son los siguientes:

Tabla 4. Prueba de rango múltiple para valor por método

<b>Método</b>	<b>Conteo</b>	<b>LS Media</b>	<b>LS Sigma</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>3 A1</b>	63	31,0084	0,0590206	X
<b>3 A2</b>	63	31,1574	0,0590206	X
<b>1</b>	63	31,1657	0,0590206	X
<b>2</b>	63	31,6366	0,0590206	X
<b>3 C</b>	63	31,724	0,0590206	X
<b>3 B</b>	63	32,5653	0,0590206	X

\*Método: 95,0 % mínima diferencia significativa (LSD).

- 5 No hay diferencia estadísticamente significativa entre los métodos 1, y los métodos 3 A1 (método 3 usando solución de extracción A1 de la tabla 1) y 3 A2 (método 2 usando solución de extracción A2). Sí existe diferencia significativa entre el método 1 y el método 2 (a favor del método 1), así como entre el método 1 y los métodos 3 B2 y 3 C (que corresponden al método desarrollado empleando las soluciones de extracción B2 y C de la tabla 1, respectivamente). Existe una diferencia estadísticamente significativa, a favor del método desarrollado con 3 A1 y 3 A2, respecto al método 2. No existe diferencia significativa entre los métodos 2 y el método desarrollado empleando el buffer C (método 3C).
- 10
- 15 Tabla 5. Diferencias entre métodos.

<b>Comparación de métodos</b>	<b>Significativo</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
<b>1 - 2</b>	*	-0,470917	0,164384
<b>1 - 3 A1</b>		0,157339	0,164384
<b>1 - 3 A2</b>		0,00831541	0,164384
<b>1 - 3 B</b>	*	-1,39961	0,164384
<b>1 - 3 C</b>	*	-0,558238	0,164384
<b>2 - 3 A1</b>	*	0,628256	0,164384
<b>2 - 3 A2</b>	*	0,479232	0,164384
<b>2 - 3 B</b>	*	-0,928692	0,164384
<b>2 - 3 C</b>		-0,0873208	0,164384
<b>3 A1 - 3 A2</b>		-0,149023	0,164384
<b>3 A1- 3 B</b>	*	-1,55695	0,164384
<b>3 A1- 3 C</b>	*	-0,715576	0,164384
<b>3 A2 - 3 B</b>	*	-1,40792	0,164384
<b>3 A2 - 3 C</b>	*	-0,566553	0,164384
<b>3B - 3C</b>	*	0,841371	0,164384

\* Denota diferencia estadísticamente significativa

- 20 Las referencias 3A1, 3A2, 3B y 3C corresponden al método de la presente invención llevado a cabo con cada una de las soluciones de extracción de la tabla 1.



Respecto al análisis del efecto significativo de la interacción, se realizó una regresión múltiple normalizada con un modelo  $y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$  para estudiar la interacción significativa resultante del ANOVA multifactorial, pero el modelo obtenido no es válido para explicar la interacción. Por último se realizó un ANOVA de un factor para agrupar las muestras en grupos homogéneos, y en cada grupo de muestras homogéneo se realizó un ANOVA multifactorial con interacción. En cada uno de estos grupos homogéneos de muestras la interacción de los factores método y muestra es estadísticamente significativa.

Como conclusiones, el método desarrollado, con los buffers A1 y A2, obtiene resultados similares al método de extracción 1, y significativamente diferentes, a su favor respecto al método 2. Por lo tanto, el nuevo método desarrollado es válido, mejora al método 2 e iguala al método 1, evitando el empleo de disolventes orgánicos.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento y concentración de virus a partir de una muestra de alimento o clínica, donde dicho método comprende los siguientes pasos:
  - a) Adición de una solución de extracción a la muestra;
  - b) Lisar la mezcla del paso a);
  - c) Separar y aislar la fracción líquida de la mezcla del paso b);
  - d) Adicionar ácido a la fracción líquida obtenida en el paso c) hasta alcanzar un pH de entre 2 y 4.5;
  - e) Aislar dichos virus a partir de la mezcla del paso d).
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa de lisis b) comprende:
  - b1) una primera etapa de lisis de la mezcla del paso a);
  - b2) adicionar una cantidad adicional de la solución de extracción empleada en el paso a) al producto resultante de la primera etapa de lisis b1);
  - b3) segunda etapa de lisis de la mezcla resultante del paso b2).
3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la cantidad de muestra de alimento o clínica de partida para llevar a cabo el método es de entre 0,1 y 25 g, preferiblemente de entre 0,25 y 4 g.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde en la primera etapa a) la solución de extracción se añade en una proporción de entre 1:1 y 1:40 con respecto a la cantidad de muestra de alimento o clínica, preferiblemente la solución de extracción se añade en la etapa a) en una proporción de entre 1:1 y 1:2 respecto a la cantidad de muestra de alimento o clínica, donde la proporción se encuentra expresada en p/v.
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la cantidad adicional de solución de extracción de la etapa de b2) es de entre 2:1 y 16:1 con respecto a la cantidad muestra de alimento o clínica, preferiblemente de entre 8:1 y 14:1 respecto de la cantidad de muestra de alimento o clínica, donde la proporción se encuentra expresada en p/v.

6. *Método de acuerdo con cualquiera* de las reivindicaciones 1 a 5, donde el ácido es seleccionado de la lista que consiste en ácido clorhídrico (HCl), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido yodhídrico (HI) y ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH).
- 5 7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la separación y asilamiento de la fracción líquida de la etapa c) se lleva a cabo mediante centrifugación, decantación o filtración.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la separación  
10 y asilamiento de la fracción líquida de la etapa c) se lleva a cabo mediante centrifugación.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, donde la centrifugación del paso c) se lleva a cabo durante 15-20 minutos a 1500-3750 x g donde, dicha centrifugación se  
15 lleva a cabo a una temperatura de entre 1 y 15°C; preferiblemente de entre 2 y 10°C; más preferiblemente a 4°C.
10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde en la etapa e) el aislamiento de dichos virus a partir de la mezcla de la etapa d) se realiza mediante  
20 un método que se selecciona de la lista que comprende centrifugación, precipitación, precipitación con polietilenglicol o inmunoprecipitación, filtración, filtración en gel, tamizado, electroforesis en gel, dielectroforesis, ultrasonidos y unión por afinidad.
11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde en la etapa  
25 e) el aislamiento de dichos virus a partir de la mezcla de la etapa d) se realiza mediante centrifugación, donde la centrifugación del paso e) se lleva a cabo durante 15-20 minutos a 1000-14000 x g, donde dicha centrifugación se lleva a cabo a una temperatura de entre 1 y 15°C; preferiblemente de entre 2 y 10°C; más preferiblemente a 4°C.
- 30 12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la solución de extracción de las etapas a) y b2) es seleccionado de la lista que consiste en: una solución que comprende Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl y KCl a una concentración de 5-20 g/L, 0,4-3 g/L, 50-100 g/L, 0,5-5 g/L respectivamente; una solución que  
35 comprende Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> a una concentración de 10-40 g/L, 0,4-

3 g/L y 35-200g/L respectivamente; una solución que comprende  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración de 10-40 g/L, 0,4-3 g/L, 40-100g/L, 0,5-5 g/L y 35-200 g/L respectivamente; tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS); tampón de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS); tampón de  
5 solución salina tamponada con TRIS (TBS); tampón TRIS-HCl; y TRIS/EDTA (TE).

13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde las etapas de lisis b), b1) y b3) son etapas de lisis mecánica que se llevan a cabo mediante agitación con esferas.  
10

14. Método de acuerdo con la reivindicación 13 donde las esferas son de vidrio, cerámica o metal, preferiblemente las esferas son de cerámica.

15. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 donde el diámetro de las esferas es de entre 0,1 y 10 mm.  
15

16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde la lisis mecánica de los pasos b), b1) y b3) se lleva a cabo en un tubo de 15 ml.

17. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde la lisis mecánica de los pasos b) y b1 se lleva a cabo en un homogeneizador durante 2 ciclos de 40 segundos a 6 m/s con 300 segundos de descanso entre ciclos; y donde la lisis mecánica de los pasos b3) se lleva a cabo en un homogeneizador durante 3 ciclos de 40 segundos a 6 m/s con 300 segundos de descanso entre ciclos.  
20

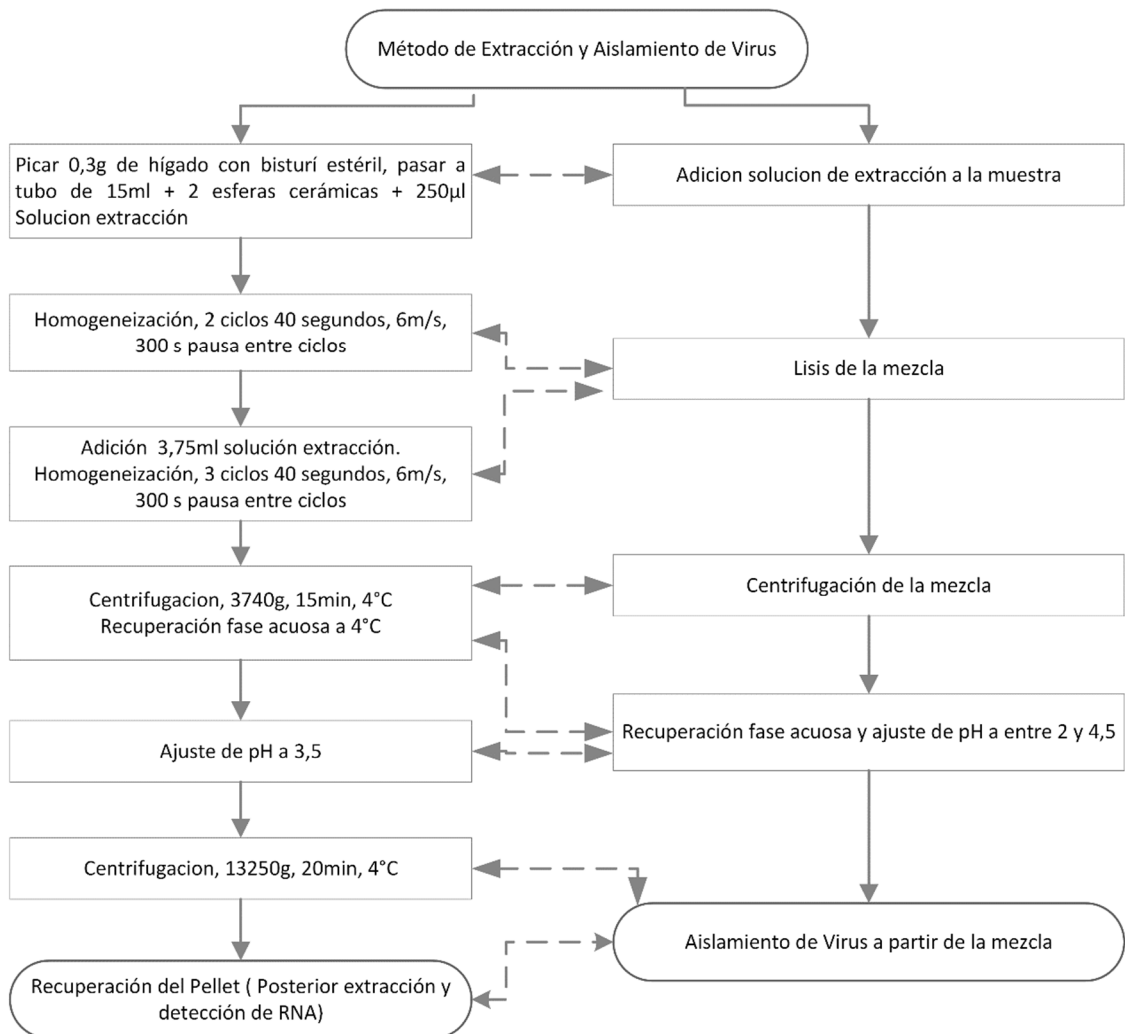
18. Un método para la detección y/o cuantificación de virus en una muestra de alimento o clínica que comprende los pasos descritos en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y una etapa adicional f) donde se detectan y/o cuantifican las partículas víricas presentes en la mezcla resultante del paso e).  
25

19. Método según la reivindicación 18, donde para la detección y/o cuantificación de las partículas víricas se extrae el material genético presente en la mezcla resultante del paso e) y se llevan a cabo posteriormente uno o varios métodos moleculares de amplificación de ácidos nucleicos y/o ensayos inmunohistoquímicos.  
30

35

20. Método según la reivindicación 19, donde los ensayos inmunohistoquímicos comprenden el uso de sondas y/o anticuerpos específicos de virus.
- 5 21. Método de acuerdo con la reivindicación 19, donde el método molecular de amplificación de ácidos nucleicos es seleccionado de la lista que consiste en: qPCR, RT-PCR, RT-qPCR o PCR digital.
- 10 22. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde el virus es seleccionado de la lista que consiste en: parvovirus, sapovirus, astrovirus, coronavirus, adenovirus, enterovirus, norovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E, rotavirus, adenovirus, virus Norwalk / de tipo Norwalk o cualquier combinación de estos.
- 15 23. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 donde el virus es el virus de la hepatitis E.
- 20 24. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 donde la muestra de alimento procede de un producto cárnico, huevo, lácteo, fruta, fruto seco, hortaliza, verdura, legumbre, cereal, marisco o pescado.
- 25 25. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 donde la muestra de alimento procede de un producto cárnico, preferiblemente hígado, más preferiblemente hígado de cerdo.
- 30 26. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 donde la muestra clínica es seleccionada de la lista que consiste en: sangre completa, heces, orina, esputo, vómito, saliva, líquido amniótico, plasma, suero, lavado pulmonar y tejidos, incluyendo hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo y páncreas.

Fig. 1





- ②① N.º solicitud: 202230844  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.09.2022  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **C12N7/02** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ZHAO MITCHIE Y et al. Optimization and Implementation of the Virus Extraction Method for Hepatitis E Virus Detection from Raw Pork Liver.. Food and environmental virology United States. 28/02/2021, Vol. 13, Nº 1, Páginas 74 - 83, ISSN 1867-0342 (Electronic), <DOI: doi:10.1007/s12560-020-09452-y pubmed:33449335>. Materiales y métodos, figura 1 y 2.	1-26
Y	KATZENELSON E et al. Organic flocculation: an efficient second step concentration method for the detection of viruses in tap water. Applied and Environmental Microbiology 1976, 30/11/1975, Vol. 32, Nº 4, Páginas 638 - 639, ISSN 0099-2240 (print), <DOI: doi:10.1128/aem.32.4.638-639.1976 pubmed:10841>. Página 638, tabla 1.	1-26
A	GARCIA NEREA et al. Occurrence of Hepatitis E Virus in Pigs and Pork Cuts and Organs at the Time of Slaughter, Spain, 2017. Frontiers in Microbiology, 28/01/2020, Vol. 10, Páginas Article No.: 2990, ISSN 1664-302X(print) ISSN 1664-302X(electronic), <DOI: doi:10.3389/fmicb.2019.02990>. todo el documento.	1-26
A	SZABO KATHRIN et al. Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method.. International journal of food microbiology Netherlands, 23/12/2015, Vol. 215, Páginas 149 - 156, ISSN 1879-3460 (Electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.013 pubmed:26433460>. todo el documento.	1-26
A	HENNECHART-COLLETTE CATHERINE et al. Evaluation of methods for elution of HEV particles in naturally contaminated sausage, figatellu and pig liver. Food Microbiology (London)c, 30/11/2019, Vol. 84, Páginas Article No.: 103235, ISSN 0740-0020(print) ISSN 1095-9998(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.fm.2019.05.019>. todo el documento.	1-26
A	WO 2021242854 A1 (OMNI INT INC) 02/12/2021, todo el documento.	1-26

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
15.06.2023

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET