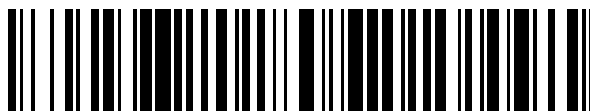


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 879**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2007 E 07823042 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2080811**

54 Título: **Procedimiento para la determinación de la fragmentación del ADN en microorganismos**

30 Prioridad:

10.11.2006 ES 200602859

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

20.10.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (100.0%)
CIUDAD UNIVERSITARIA DE CANTOBLANCO C/
EINSTEIN 3
28049 MADRID, ES**

72 Inventor/es:

**GOSÁLVEZ BERENGUER, JAIME;
FERNÁNDEZ GARCÍA, JOSÉ LUIS;
GOYANES VILLAESCUSA, VICENTE;
BAU ARÉVALO, GERMÁN;
MURIEL RÍOS, LOURDES y
CARTELLE GESTAL, MÓNICA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 509 879 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la determinación de la fragmentación del ADN en microorganismos

La presente invención se encuadra dentro del campo de la industria biotecnológica y principalmente en aquel relacionado con la microbiología, cuyo ámbito de aplicación se encuentra dentro del sector sanitario (humano, veterinario, medioambiental y básico).

En concreto, se refiere a un procedimiento de determinación de la integridad del ADN en microorganismos, dado que la muerte celular se traduce en fragmentación del ADN y de un kit para la evaluación de la integridad del ADN en microorganismos.

Estado de la técnica

Los microbios pueden morir por diversas causas. En el caso de las bacterias, que son organismos de especial interés sanitario, el mecanismo final de muerte por acción de agentes antibióticos es prácticamente desconocido, seguramente por lo obvio del problema. Los antibióticos afectan procesos celulares importantes, que tarde o temprano llevarán a la muerte de la célula. A pesar del conocimiento del mecanismo inicial de acción de un antibiótico concreto, a veces no es posible discernir claramente un efecto bacteriostático o bactericida. Este cuadro acerca de la muerte celular es especialmente complicado debido a la reciente descripción de la presencia de una pequeña proporción de células que persisten invulnerables a los antibióticos bactericidas, a pesar de ser mutantes y no crecer en presencia del antibiótico. Dichas células persistentes parecen explicar la alta resistencia de los biofilms y de los cultivos estacionarios a la muerte por agentes quimioterápicos.

Además, los estudios de perfiles de transcripción de la totalidad de los genes de *Escherichia coli*, han demostrado la existencia de un grupo de genes que se inducen y otros que se reprimen de forma común tras la acción de antibióticos, siendo el mecanismo de acción muy diferente. Esto se comprobó con la ampicilina, inhibidora de la síntesis de la pared celular y con la ofloxacina, una fluoroquinolona que bloquea la ADN girasa y la topoisomerasa IV, induciendo daño directo en el ADN (Kaldalu N, Mei R, Lewis K. Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:890-896.)

Estos conocimientos sugieren que la muerte celular en bacterias, por ejemplo tras la acción de un antibiótico bactericida, podría ser un proceso programado, al igual que el fenómeno de apoptosis, presente en los organismos superiores. Un fenómeno similar ha sido descrito en levaduras unicelulares, como respuesta a la acción de agentes fungicidas. La autólisis de las células bacterianas por autodigestión de la pared celular por autolisinas tras la exposición a antibióticos o condiciones ambientales adversas, puede ser una expresión de la muerte celular programada de organismos defectuosos (Lewis K. *Programmed Death in Bacteria. Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 503-514.)

La mayor parte de estudios de acción quimioterápica se vienen evaluando de modo rutinario, desde los inicios de la microbiología, valorando el crecimiento celular como la capacidad de producir colonias en un medio de cultivo semisólido o de producir turbidez en un medio líquido. Este sistema, además de ser relativamente largo, no evalúa el comportamiento de cada célula sino el conjunto en general y solo es aplicable a aquellos microorganismos con capacidad de ser cultivables *in vitro*. Para estudiar el estado vital de cada célula, es necesario el uso de técnicas de microscopía o citometría (Lecoer H. *Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous nucleases. Exp Cell Res* 2002; 277:1-14; Steensma DP, Timm M, Witzig TE. *Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. Methods Mol Med* 2003; 85:323-332).

Una posible evaluación, aunque no habitual, es valorar la permeabilidad de la pared celular y de la membrana celular, usando colorantes vitales. La célula solo se tiñe con el colorante vital si posee una alteración de la barrera que la aísla del exterior, lo que suele estar ligado a la lisis por choque osmótico. Sea por daño directo, a través de sistemas enzimáticos, o a través de la pérdida de la integridad de la membrana, el ADN del cromosoma del microorganismo debe fragmentarse en el proceso de muerte celular. Sin embargo, la integridad del ADN cromosómico no se ha venido evaluando como parámetro de muerte microbiana, en estudios *in situ* célula a célula. Esto se debe a la ausencia de una técnica asequible, fiable y reproducible, para determinar la integridad de un ADN cromosómico de pequeño tamaño en relación con el de las células de organismos superiores.

Existen diferentes metodologías *in situ* bien establecidas para evaluar la integridad del ADN de las células de organismos superiores en relación con el daño inducido y con la muerte celular por apoptosis o necrosis. Entre tales metodologías se destacan el etiquetado de roturas del ADN *in situ* introduciendo nucleótidos marcados en las mismas utilizando enzimas como la transferasa terminal (TUNEL) o la ADN polimerasa (traslado de la mella *in situ* ISNT) (Didenko V, ed. *In situ detection of DNA damage. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 2002.*)

Estas metodologías se basan en el empleo de enzimas sobre las células fijadas en portaobjetos, que actúan sobre extremos 3'-OH de las roturas, es decir sin modificaciones químicas. Por dicho motivo, su eficacia es irregular, resultando solo marcadas aquellas roturas que son accesibles a la enzima, lo que se traduce en una reproducibilidad relativamente baja de los resultados. Existe un único trabajo en el que se aplica de la técnica de TUNEL para la detección de roturas del ADN bacteriano, en *Escherichia coli* y la arquea *Haloferax volcanii* (Rohwer F and Azam F.

Detection of DNA Damage in Prokaryotes by Terminal Deoxyribonucleotide Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling Appl Environ Microbiol 2000; 66:1001-1006.)

Este estudio demostró la capacidad de detección de la fragmentación del ADN bacteriano tras infección por un fago. Sin embargo, las roturas originadas directamente por el peróxido de hidrógeno, en ciertas condiciones, no se detectaban. Esto puede deberse a la imposibilidad de la enzima de marcar roturas con extremo 3'-OH modificados, lo que es una dificultad de esta técnica. Además, las células deben fijarse para efectuar estas técnicas, lo que afecta a la capacidad de marcaje. Además, los reactivos son caros, por lo que estas técnicas solo se aplican en estudios de investigación, no siendo posible utilizarlas para la valoración rutinaria del daño del ADN y su degradación. Estas técnicas son relativamente largas y complejas, por lo que no se han usado de modo habitual en microbiología y no se ha descrito ningún otro trabajo en relación a las mismas.

Otra técnica de microscopía para el estudio *in situ* célula a célula de la integridad del ADN es el ensayo de cometas o electroforesis de célula única (Olive PL, Durand RE. *Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. Cytometry 2005; 66:1-8.*)

Las células eucariotas se incluyen en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y se someten a soluciones lisantes para extraer las membranas y las proteínas. Se obtienen así nucleoides es decir núcleos desproteinizados, en los que los bucles de ADN se han relajado debido a la descompactación. Los nucleoides se someten a una electroforesis en una cubeta rellena de solución tampón, de tal modo que las fibras de ADN migran hacia el ánodo, constituyendo una imagen de cometa con una cabeza y una cola en la dirección de la migración electroforética. Estos cometas se tiñen con un colorante fluorescente para ser observados mediante microscopía de fluorescencia. Si el núcleo presenta fragmentación del ADN, gran cantidad de fragmentos del mismo habrán migrado, concentrándose en la cola del cometa. Se trata de un test bastante sensible pero relativamente caro y complicado para un laboratorio clínico convencional. De hecho, requiere cierto instrumental no común: fuente y cubeta de electroforesis y un sistema de captación de las imágenes y de análisis de las mismas. Por todo ello, solo se utiliza con fines de investigación. Existe un único trabajo publicado en el que la técnica de cometas se aplica a un pH neutro en la bacteria *Escherichia coli* (Singh NP, Stephens RE, Singh H, Lai H. *Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. Mutat Res 1999; 429:159-168.*)

La técnica es larga y complicada, requiriendo múltiples incubaciones y la interpretación de las imágenes en relación con las roturas del ADN no está clara. Por lo tanto, tampoco se ha descrito ningún otro trabajo con esta técnica en bacterias.

De lo descrito anteriormente se desprende que hay aún una necesidad de un procedimiento fiable que pueda ser utilizado de una forma rutinaria y sencilla para el estudio *in situ* de la integridad de la cromatina/ADN en microorganismos. Se debe desarrollar o adaptar una metodología que sea mucho más rápida y eficaz para evaluar la muerte bacteriana, poniendo un especial énfasis en la muerte que se genera por o se traduce en la degradación del ADN. Este es así un campo en el que apenas se ha aportado alguna innovación. El procedimiento tiene que ser robusto, fácil de implementar, barato y accesible al laboratorio básico. Además, tiene que dar resultados homogéneos entre distintos laboratorios y ser susceptible de automatización. El ensayo de difusión del ADN es algo similar al ensayo de electroforesis de célula única, permitiendo evaluación de la fragmentación del mismo. Las células inmersas en un microgel de agarosa inerte, sobre un portaobjetos, se someten a lisis. Si las células tienen el ADN fragmentado, los fragmentos difunden en la matriz de agarosa a partir del núcleo inicial, mostrándose halos amplios de difusión de fragmentos de ADN periférica (Vasquez M, Tice RR. *Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCG) assay. Environ Mol Mutagen 1997; 29:53.*). Esto se ha aplicado a células eucariotas, principalmente de tipo somático. Las células que muestran difusión de fragmentos de ADN corresponden a aquellas que han muerto por un proceso de apoptosis (Singh NP. *A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. Exp Cell Res 2000; 256:328-337.*)

Algunas variantes de este ensayo se han aplicado con éxito a espermatozoides humanos y de otras especies animales por el grupo de investigación de los autores de la presente invención, siendo denominadas test de dispersión de la cromatina de los espermatozoides, o Sperm Chromatin Dispersión (SCD test), (Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. *Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. Fertil Steril 2005; 84: 843-845.*; Enciso M, López-Fernández C, Fernández JL, García P, Gosálbez A, Gosálvez J. *A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. Theriogenology 2006; 65:308-316.*)

Las principales diferencias de la variante del procedimiento de la presente invención con respecto a la técnica presentada para espermatozoides son las siguientes:

- No es necesaria la primera incubación con una solución ácida, necesitándose únicamente la lisis.
- La solución para lisar espermatozoides no es activa en microorganismos como bacterias. El Tritón X-100 no es activo para lisar estos microorganismos. Para este fin, es recomendable que la lisis contenga un detergente más fuerte con la capacidad desnaturalizante de las proteínas, como el SDS y añadiendo EDTA como un agente quelante que ayuda a desestabilizar las paredes celulares.

Técnicamente estas diferencias se traducen en la lisis de la pared bacteriana, conservando la integridad del ADN. El último punto es importante porque el ADN bacteriano al estar relativamente desprovisto de proteínas en relación con el de las células eucariotas, podría ser más susceptible de daño iatrogénico generado durante la manipulación y el procesado.

- 5 El empleo de colorantes fluorescentes de alta sensibilidad, tales como los de la familia SYBR, por ejemplo el SYBR Gold, permiten discriminar la fibra de ADN de los nucleoides del microorganismo y sobre todo visualizar con precisión los pequeños fragmentos de ADN que difunden en la agarosa en caso de fragmentación del mismo. Esto no es posible usando fluorocromos clásicos del ADN como el yoduro de propidio (IP), bromuro de etidio, naranja de acridina, Hoechst 33258 o 33342, o el DAPI.
- 10 Otra ventaja adicional es que el tiempo necesario de incubación en la lisis es mucho más corto, resultando en una metodología más rápida en comparación con la descrita en espermatozoides.

En la presente invención, es primordial estabilizar el nucleoide de ADN del microorganismo para poder visualizarlo con el microscopio de fluorescencia. Este pequeño nucleoide es muy delicado, desprendiéndose y degradándose progresiva y rápidamente en el medio líquido de tinción, al ser expuesto a la luz del microscopio de fluorescencia.

15 Este es un problema técnico fundamental que no ocurre con los nucleoides de los espermatozoides u otros tipos celulares de organismos superiores con muchísima mayor masa. En el caso de los microorganismos, para estabilizar el nucleoide y adherirlo firmemente al portaobjetos, se lleva a cabo una etapa de incubación calórica intensa en seco. Así, una vez secado el portaobjetos con los nucleoides, antes de la tinción, se incuba en un horno microondas a elevada potencia (750-1000W) durante 10 min. Posteriormente puede ser teñido y visualizado. Otra

20 posibilidad es incubar el portaobjetos en un horno a alta temperatura 80-100 °C durante horas. Sin embargo, el uso del horno microondas acelera enormemente el procedimiento, ayudando a que el protocolo técnico sea de rápida ejecución. Esta etapa de estabilización es fundamental en la invención para que el procedimiento tenga un gran valor añadido en la elaboración de un producto comercial final.

De lo expuesto anteriormente, se desprende que el procedimiento de la presente invención resulta en imágenes de nucleoides de microorganismos, pudiendo discriminar claramente aquellos que contienen el ADN fragmentado. En consecuencia, con dicho procedimiento, la determinación de los niveles de fragmentación del ADN de la muestra es sencilla y fiable, lo que hace que se pueda utilizar de forma rutinaria y a un bajo coste. Su aplicación es pertinente en distintos laboratorios microbiológicos, tanto de ámbito clínico como básico con muestras de microorganismos.

Sin embargo, nunca se ha aplicado un ensayo de estas características para determinar la integridad del ADN de microorganismos. Tendría un enorme interés potencial el conseguir adaptar y ajustar esta metodología para evaluar genomas de relativamente pequeño tamaño, tras conseguir previamente lisar las paredes bacterianas para permitir la difusión del ADN en caso de fragmentación de tal ADN. Se podría disponer entonces de una herramienta relativamente sencilla y rápida que permitiría valorar *in situ*, célula a célula, la presencia de roturas del ADN en bacterias y otros microorganismos, de modo reproducible. La visualización a nivel microscópico de una molécula de

35 ADN fragmentada tras la acción de agentes líticos, puede ser utilizada para analizar, de manera rápida la muerte celular bacteriana. Las interesantes y múltiples aplicaciones potenciales de dicha metodología en investigación, hospital, veterinaria o de protección del medio ambiente se detallan a continuación:

- Monitorización de agentes con capacidad potencial para dañar y fragmentar el ADN, directa o indirectamente, físicos (radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta), químicos (antisépticos, antibióticos, quimioterápicos y antimicrobianos, en general), biológicos y enzimáticos (enzimas de reparación, enzimas de restricción codificadas por módulos adicionales o fagos).
- Monitorización de susceptibilidad a fármacos antimicrobianos, tanto conocidos como nuevos.
- Determinación de la efectividad de agentes con capacidad de dañar y fragmentar el ADN en función de diferentes condiciones experimentales o ambientales.
- 45 • Monitorización del estrés a nivel de ADN en poblaciones naturales de microorganismos o en diferentes condiciones de laboratorio (nutrientes, envejecimiento, variaciones de agentes físico-químicos como temperatura, pH, presión osmótica, luz, etc.).
- Análisis de la sensibilidad a la inducción de daño del ADN de diferentes líneas salvajes y mutantes, por ejemplo cepas resistentes a antimicrobianos, así como su reparación.

50 Descripción de la invención

El objeto de la presente invención se relaciona con un procedimiento para evaluar la integridad del ADN de los microorganismos de forma simple, rápida y precisa y que pueda ser incorporado en la actividad rutinaria de cualquier laboratorio de investigación microbiológica.

55 Así pues, un primer objeto de la invención consiste en un procedimiento para evaluar la integridad del ADN de un microorganismo, que comprende las siguientes etapas:

- a) inmovilización del microorganismo sobre un portaobjetos, sin fijación, mediante inclusión del mismo en un medio inerte;
- b) tratamiento con una solución de lisis para extraer paredes celulares, membranas y proteínas, reteniendo el ADN del microorganismo;
- 5 c) estabilización del nucleoide de ADN del microorganismo, sobre el portaobjetos; y
- d) tinción y evaluación de la integridad del ADN.

Inicialmente los microorganismos se incluyen en un medio similar a una suspensión acuosa, preferentemente en un microgel inerte, especialmente en un microgel de agarosa, que se puede elaborar sobre un soporte adecuado, por ejemplo un cubreobjetos de vidrio.

10 La selección de la solución de lisis es crítica para alcanzar los objetivos de la presente invención. Es esencial usar detergentes desnaturizantes de proteínas, aniónicos o catiónicos como por ejemplo dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfonato de alquilbenceno, N-laurilsarcosina (sarcosil), sal hidratada del ácido glicocólico y sus mezclas, usando preferentemente SDS. Son detergentes que provocan una gran disrupción de membranas con efectos de lisis y a la vez son activos agentes desnaturizantes de proteínas. Se emplean en electroforesis desnaturizante en las que se somete a las proteínas a migración, asegurando la completa desnaturización (pérdida de la estructura tridimensional). Su actividad dentro de los detergentes es alta. El uso de un detergente no iónico no desnaturizante de proteínas, es decir un detergente que solubiliza las proteínas pero no las desnaturiza, es usualmente no efectivo para lisar eficazmente, en muchos microorganismos. La inclusión del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es importante, pues actúa como agente quelante de los cationes Mg^{++} , cationes que estabilizan la membrana externa de las bacterias, especialmente en la cubierta de las Gram negativas. También es posible incluir proteínas líticas, tanto de pared celular como de proteínas.

25 Se prefiere que la solución de lisis contenga otros agentes que favorezcan la desestabilización de las paredes celulares y extracción posterior. Se ha comprobado que una solución efectiva es la que contiene ditioneitol (DTT) entre 0,001 y 2M, 2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol (Tris) 0,001 y 2M, EDTA entre 0,001 y 2M y SDS entre 0,1 y 3%, a un pH entre 6,5 y 10,5. Particularmente apropiada es una solución que contiene DTT aproximadamente 0,1M, Tris aproximadamente 0,01M, EDTA aproximadamente 0,05M y SDS aproximadamente el 2%, a un pH aproximadamente 10.

30 Tras la lisis, los nucleoides de ADN deben ser estabilizados en el portaobjetos con el fin de que no se degraden y desprendan al ser expuestos a la luz del microscopio de fluorescencia. El sistema más rápido y efectivo es incubar el portaobjetos, tras haber sido deshidratado, incubando en baños de alcohol creciente y secando en un horno microondas. El calor generado adhiere firmemente el nucleoide al portaobjetos. Esta es una etapa fundamental, específica de la presente invención. Se pueden ensayar diferentes potencias durante diferentes tiempos. Una posibilidad es emplear la potencia máxima durante 2-15 min. Otra posibilidad, menos recomendable porque alarga la duración temporal de la técnica, es incubar el portaobjetos seco en una estufa u horno, a alta temperatura, 40-100°C, durante una o varias horas.

35 El procedimiento de acuerdo con la presente invención tiene una etapa de evaluación de la integridad del ADN de los microorganismos, después de las etapas a), b) y c). Aunque hay varias alternativas para esta evaluación, se prefiere que sea visual. Con este fin preferiblemente el procedimiento incluye una etapa de tinción de la muestra después de las etapas a), b) y c). Dicha tinción, dado el relativamente pequeño tamaño del ADN de los microorganismos, debe de realizarse con un colorante de alta sensibilidad usando un microscopio con un objetivo de gran aumento (normalmente 100X). Por ello, son preferibles los sistemas basados en la microscopía de fluorescencia, usando fluorocromos específicos del ADN y concretamente aquellos que proporcionen la mejor sensibilidad y estabilidad. La relación es amplia y en continuo crecimiento. Como ejemplos se pueden citar el GelRed, EvaGreen y otros derivados de cianina como las familias SYBR, las de PicoGreen, las variantes de los TOTO, YOYO, BOBO, POPO, JOJO, LOLO, SYTOX, PO-PRO, BO-PRO, YO-PRO, TO-PRO, JO-PRO, PO-PRO, LO-PRO, etc.

40 La evaluación de los resultados puede ser llevada a cabo por el observador, asignando cada nucleoide observado a una escala de daño previamente establecida. También y de modo preferible, se puede valorar empleando un sistema de captura de imágenes digitalizadas, acoplado a un software que determine el nivel de daño, de modo cuantitativo.

50 Un segundo objeto de la presente invención consiste en la fabricación de un kit para la evaluación de la integridad del ADN de los microorganismos, que comprende esencialmente:

- a) portaobjetos de vidrio pretratados, para soportar y retener el microgel con los microorganismos;
- b) una solución para mezclar e incluir los microorganismos en microgeles;
- 55 c) una solución de lisis para extraer paredes, membranas y proteínas; y

d) un fluorocromo para teñir el ADN.

El kit permite llevar a cabo el procedimiento previamente descrito.

Un tercer objeto de la presente invención, se relaciona con el desarrollo de software para la medida automatizada de los niveles de fragmentación del ADN del microorganismo.

5 Descripción de las figuras

Figura 1 muestra nucleoides procedentes de un cultivo de células de *Escherichia coli*, obtenidos tras aplicar el procedimiento descrito en la invención. Los nucleoides intactos están compactos, aplastados sobre el portaobjetos, no apreciándose soluciones de continuidad que sugieran fragmentación del ADN. Ocasionalmente se aprecia algún nucleoide con el ADN masivamente fragmentado (arriba), que procede de una célula muerta de modo espontáneo, en el cultivo.

Figura 2 muestra distintos grados progresivos de daño del ADN de *Escherichia coli*:

a: nucleoide intacto (nivel 0).

b: nucleoide con discretos fragmentos periféricos de tamaño relativamente grande, tras roturas del ADN (nivel 1, daño bajo).

c: nucleoide más relajado, ocupando mayor superficie, con discretos fragmentos periféricos de tamaño relativamente grande, tras roturas del ADN (nivel 2, daño medio).

d: nucleoide mucho más relajado y extendido, con mayor número de fragmentos periféricos, tras roturas del ADN (nivel 3, daño alto).

e: nucleoide con fragmentación masiva del ADN, formado por multitud de pequeños fragmentos que difundieron en la matriz de agarosa, tras la lisis, delimitando una superficie de difusión más amplia (nivel 4, daño masivo).

Figura 3 muestra la técnica de DBD-FISH para detectar las roturas del ADN, hibridando una sonda de ADN de *Escherichia coli*, total genómico marcada con Cy3 (A). El nucleoide con difusión de fragmentos presenta un intenso marcaje de los mismos, mientras que el resto de los nucleoides solo muestran un marcaje basal muy discreto. El ADN fue contrateñido con DAPI (B).

Figura 4 muestra la aplicación del procedimiento de la invención a una muestra de *Acinetobacter baumannii*. Se aprecian dos nucleoides intactos y otros dos con el ADN pulverizado en fragmentos.

Figura 5 muestra la fragmentación masiva del ADN de *Escherichia coli* tras exposición de las bacterias a peróxido de hidrógeno 10 mM durante 10 min.

Figura 6 muestra el daño del ADN de *Escherichia coli*, observado tras diferentes tiempos de incubación con ciprofloxacina (1 µg/ml). a: 0 min. b: 2,5 min. c: 5 min. d: 15 min. e: 40 min. Tras 5 min. ya se precia un nivel inicial de daño, incrementándose progresivamente con los tiempos superiores de incubación.

Figura 7 muestra los nucleoides de *Escherichia coli* observados tras incubación con ampicilina (300 µg/ml) durante 20 minutos (a) y tras 24 horas (b). Tras 20 min. no se aprecian fragmentos de ADN, mientras que tras 24 horas, el fondo está sembrado de fragmentos de ADN.

Figura 8 muestra las gráficas representado la evolución del promedio del área (en píxeles, eje y) del halo de difusión de fragmentos o relajación de bucles del nucleoide de *Escherichia coli* (A) y de la cápsula (B), en relación con el tiempo tras incubación con 10 microgramos/ml de ciprofloxacina, 40 min (eje x).

Figura 9 muestra el esquema de la rutina a seguir para la medida -etapa a etapa y con toma de decisiones- del proceso de la fragmentación del ADN bacteriano con generación de informe final.

Figura 10 muestra una muestra de tres procedimientos de segmentación y delimitación de las ROI realizado sobre una captura digital en la que se muestra un campo bacteriano que incluye 3 bacterias con ADN normal y 2 con ADN fragmentado (imagen superior izquierda). El resto de imágenes corresponden con filtrados electrónicos de la imagen original que pueden ser útiles como una estrategia a seguir para diferenciar con mayor facilidad ambos tipos celulares.

Figura 11 muestra la densidad integrada media en 9 series experimentales distintas en las que se eligieron bacterias con ADN no fragmentado (1) y bacterias con ADN fragmentado (2). En la parte superior de la figura se muestran las medias por experimento, mientras que en la parte inferior se muestra la media global por cada grupo de acuerdo con el criterio ADN-no fragmentado (1) frente a ADN- fragmentado (2).

50 Descripción detallada de la invención

El procedimiento y el kit de la presente invención se divulgan en las reivindicaciones adjuntas y son un sistema sencillo y fiable para determinar la frecuencia de microorganismos con ADN fragmentado.

El procedimiento de la solicitud que permite evaluar la integridad del ADN de un microorganismo, comprende las etapas de:

- 5 a) inmovilización del microorganismo sobre un portaobjetos, sin fijación, mediante inclusión del mismo en un medio inerte;
- b) tratamiento con una solución de lisis para extraer paredes celulares, membranas y proteínas;
- c) estabilización del ADN del nucleóide sobre el portaobjetos; y
- d) tinción y evaluación de la integridad del ADN.

10 A continuación se detalla el procedimiento de la invención, junto con algunas variantes y etapas opcionales. El experto en la materia entenderá que hay otros modos de realización y posibilidades siempre que se mantengan los aspectos fundamentales que se describen.

15 A) La primera etapa es la preparación de la muestra. Mediante los procedimientos habituales en este campo se obtiene y se comprueba la concentración de microorganismos en una muestra líquida. La concentración adecuada para el análisis oscila entre 0,1 y 20 millones de microorganismos por mililitro. Si la muestra estuviese excesivamente concentrada se ajusta a la concentración adecuada diluyéndola con medio de cultivo o con solución salina/fosfato tamponada (PBS) o similar, adecuada de acuerdo con el microorganismo.

20 Es recomendable llevar a cabo el procesado en condiciones de luminosidad baja, para evitar generar daño fotoinducido del ADN durante las manipulaciones e incubaciones. La muestra se debe colocar sobre un soporte para su procesado según el procedimiento de la invención y para facilitar su evaluación. El soporte preferentemente es un portabjetos de vidrio que se recubre con una película de agarosa estándar. Para ese fin, se prepara una solución de agarosa estándar entre 0,2 y 1% en agua destilada en una jarra de Coplin o similar. Se cubre con una lámina de plástico agujereada y se deposita en un horno microondas. Se regula el horno microondas a una potencia entre 300-25 1000W, preferentemente a 500W, agitando el envase ocasionalmente para una mejor disolución de la agarosa, dejándola hasta que hierva. Este procedimiento también se puede realizar utilizando un baño termostático. Cuando la solución de agarosa se vuelve totalmente transparente, ya estará preparada para depositarla en recipientes verticales de un contenido entre 10 y 250 ml. Estos recipientes deberán previamente atemperarse en un baño entre 60-100 °C, preferentemente a 70 °C, para mantener la solución de agarosa en estado líquido.

30 Los portaobjetos deben estar limpios. Estos se sumergen verticalmente, sujetándolos con unas pinzas por la zona esmerilada, entre 1-60 segundos, retirándolos y volviéndolos a sumergir entre una y diez veces, hasta formar una película homogénea sobre el portaobjetos. Estos se depositan horizontalmente sobre una superficie lisa y fría entre 1 y 15 °C, preferentemente a 4 °C, por ejemplo hecha de vidrio o de metal. Esta placa con los portaobjetos se introduce en la nevera a 4 °C durante un mínimo de 30 min, hasta que se comprueba que la solución de agarosa ha gelificado sobre la superficie del portaobjetos. Se retiran las bandejas de la nevera y se limpia la superficie de los 35 portaobjetos que estaba en contacto con la placa con un papel secante. Después los portaobjetos se introducen horizontalmente en un horno de secado en un rango de temperaturas de 37-100 °C, hasta que la agarosa se haya secado por completo y forme una película fina adherida al vidrio. Los portaobjetos así tratados se pueden utilizar inmediatamente o almacenar en una caja bien cerrada a temperatura ambiente durante varios meses.

40 Para facilitar el procesamiento de la muestra que contiene los microorganismos, esta se incluye en un medio con características similares a las de una suspensión, como por ejemplo un microgel de agarosa. En este caso, se prepara una solución de agarosa de bajo punto de fusión/bajo punto de gelificación a una concentración comprendida entre el 0,5 y 2% en agua destilada o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La fusión de esta agarosa se realiza utilizando un horno microondas o un baño termostático y se mantiene posteriormente entre 30 45 y 37 °C en un tubo introducido en un baño termostático u horno de secado. En un tubo Eppendorf o similar, se mezcla cuidadosamente la muestra y la solución de agarosa, de manera que esta última quede a una concentración entre 0,3 y 1%. Por ejemplo, 70 microlitros de la solución de agarosa + 30 microlitros de la muestra. Es importante que la temperatura de la agarosa no sea superior a 37 °C, para no dañar a los microorganismos.

50 Finalmente, para obtener la muestra sobre el soporte, se colocan los portaobjetos recubiertos sobre una superficie lisa y fría de vidrio o de metal, con una temperatura que oscile entre 1 y 15 °C, evitando la formación de burbujas de aire. Se recomienda depositar con una micropipeta una gota de entre 5-200 microlitros de la mezcla, colocando un cubreobjetos encima de la gota. Como precaución, se recomienda el procesamiento de cada muestra por duplicado y el uso de una muestra control cada vez que se aplique la técnica. La placa con los portaobjetos se introduce en una nevera a 4 °C, entre 2 a 30 minutos hasta que se produzca una gelificación adecuada de la agarosa. Una vez 55 que ha ocurrido la gelificación, se procede a retirar los cubreobjetos con mucha suavidad, dentro de la nevera, evitando que se dañe el microgel. B) Una vez se han preparado adecuadamente las muestras para su fácil y repetido manejo, se tratan de acuerdo al procedimiento de la invención con una etapa de tratamiento de lisis para

extraer paredes, membranas y proteínas. Para ese fin, cada portaobjetos se sumerge en una posición horizontal en un recipiente que contiene la solución lisante.

5 En una realización preferida, esta solución está formada por: ditiotreitól (DTT) entre 0,001 y 2M, preferentemente entre 0,01 y 0,8M; 2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) entre 0,001 y 2M, preferentemente entre 0,005-0,4M; ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) entre 0,001 y 2M, preferentemente entre 0,01-1M y dodecilsulfato de sodio (SDS) entre 0,1 y 3%, preferentemente entre 0,5-2,5%. Esta solución se ajusta a un pH entre 6,5 y 10,5, preferentemente 10, ajustado con NaOH, por ejemplo.

10 Existen otras soluciones de lisis alternativas, con otros aditivos extra, o se pueden variar las concentraciones y tiempos y temperaturas de incubación de la solución descrita siempre que se mantengan sus características funcionales fundamentales. Así, como alternativas al DTT, existen compuestos como el beta-mercaptoetanol y otros agentes reductores. Como alternativas al Tris, se pueden emplear otras soluciones tampón, tales como Hepes, Mops, Pipes. Como alternativa al EDTA, se pueden emplear otros agentes quelantes, como EGTA, etc. Como alternativa al SDS, se pueden emplear otros detergentes catiónicos o aniónicos, como se ha mencionado anteriormente.

15 Según la solución empleada y el tipo de muestra, las preparaciones se incuban en la solución de lisis entre 1 y 120 minutos, preferentemente entre 1 y 35 minutos, especialmente preferido es un tiempo de aproximadamente 5 minutos; y a una temperatura entre 1 y 45°C, preferentemente 18°C-40°C, especialmente preferida es una temperatura de 37°C.

20 Después del tratamiento con solución de lisis, las preparaciones se pueden lavar para eliminar los restos de estas soluciones. Para ese fin, se introducen los portaobjetos horizontalmente en una solución de lavado lo más suave posible, evitando agentes quelantes o detergentes. Por ejemplo, se sumergen en posición horizontal en un recipiente que contiene abundante agua destilada o una solución tampón o suero fisiológico durante un tiempo entre 1 y 60 minutos.

25 A continuación se deshidrata la muestra. Para ese fin, se pueden utilizar soluciones de concentración creciente de alcohol. Por ejemplo, se levantan los portaobjetos y se sumergen en posición horizontal, en recipientes con series de concentración creciente de etanol, entre 5 y 100%, durante 30 segundos a 60 minutos cada una y después las preparaciones se dejan secar al aire. La temperatura de los alcoholes puede oscilar desde -20°C a temperatura ambiente. Puede ser preferible usar alcoholes a -20°C para mejorar la precipitación del ADN, durante 5 minutos cada uno. Como alternativas a las incubaciones en series de etanol, las preparaciones se pueden deshidratar incubando en soluciones de diferentes alcoholes tales como metanol, o bien dejando secar al aire o secando en un horno de secado. Es importante que el portaobjetos esté completamente seco para que el ADN se adhiera al mismo, ya que suele desprenderse al ser expuesto al haz de luz incidente del microscopio de fluorescencia. Para ese fin, es recomendable dejarlo secar a temperatura alta durante un tiempo largo. Es recomendable, por ejemplo, incubarlo a 80°C durante al menos 60 min.

35 Una vez completamente secos, los portaobjetos ya procesados conteniendo la muestra se pueden guardar en cajas archivadoras a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante meses. Esto facilita la separación del procedimiento de tratamiento según la invención y la posterior etapa de evaluación de la integridad del ADN de los microorganismos. El archivado permite una evaluación repetida a diferentes intervalos de varias muestras de un mismo microorganismo.

40 C) Tras el secado, es crucial estabilizar y adherir firmemente el nucleoide de ADN al portaobjetos, ya que suele desprenderse al ser expuesto al haz de luz incidente del microscopio de fluorescencia. Para ello, los portaobjetos secos se incuban en un horno de microondas a una potencia entre 300-1000W, preferentemente a 500W, durante 5-10 min. Una alternativa, aunque menos recomendable por su duración, es incubar los portaobjetos en un horno o estufa una temperatura alta durante una o varias horas. Una vez bien secos, los portaobjetos ya procesados conteniendo la muestra, se pueden guardar en cajas archivadoras a temperatura ambiente, en oscuridad, durante meses. Esto facilita el procedimiento de tratamiento de acuerdo con la invención y la posterior etapa de evaluar la integridad del ADN de los microorganismos. El archivado permite una evaluación repetida a diferentes intervalos de varias muestras de un mismo microorganismo.

45 D) Una vez tratadas las muestras según el procedimiento descrito, se lleva a cabo la etapa de tinción y evaluación. Hay varios procedimientos posibles para evaluar la integridad del ADN de los microorganismos como se ha indicado anteriormente.

50 La muestra se tiñe, facilitando la evaluación visual. Eligiendo convenientemente las condiciones de tinción se puede obtener una alta calidad de las imágenes y una alta consistencia de los resultados de evaluación. Dado el tamaño relativamente pequeño del genoma de los microorganismos, la microscopía de fluorescencia es de elección para la visualización del ADN, dada su mayor sensibilidad.

Tinción para observación en microscopio de fluorescencia:

Dependiendo de la disponibilidad de filtros de fluorescencia, las muestras se pueden teñir con fluorocromos específicos para ADN del tipo DAPI, Hoechst 33258, bromuro de etidio, yoduro de propidio, etc., Sin embargo, se prefieren fluorocromos de mayor sensibilidad, tales como el GelRed, EvaGreen y otros derivados de la cianina como las familias SYBR, las de PicoGreen, las variantes de los TOTO, YOYO, BOBO, POPO, JOJO, LOLO, SYTOX, PO-PRO, BO-PRO, YO-PRO, TO-PRO, JO-PRO, PO-PRO, LO-PRO, etc. La cantidad y calidad de fluorocromos se está incrementando actualmente. Para evitar la pérdida de fluorescencia, se puede incluir un medio "antifading" (por ejemplo Vectashield-Vector H-1000, DABCO; etc.). Sin embargo, estos medios suelen producir fluorescencia difusa y un fondo claro que dificulta el contraste de la imagen. Es preferible usar un fluorocromo de alta sensibilidad y relativa fotoestabilidad, montado en una solución acuosa tamponada y evaluar la muestra con relativa rapidez, antes de su secado. Si fuese necesario, el portaobjetos se puede lavar y volver a teñir.

Finalmente, se evalúa la integridad del ADN de los microorganismos.

Las imágenes obtenidas se pueden estudiar mediante análisis visual directo o, preferiblemente, aplicando software para analizar imágenes digitalizadas obtenidas mediante cámaras analógicas o bien digitales acopladas a las plataformas de microscopía (Ejemplo 9).

Inicialmente se recomienda el estudio de un mínimo de 500-1000 microorganismos por muestra, adoptando la siguiente escala de daño del ADN (Figura 2):

1. Nivel 0: Microorganismos sin ADN fragmentado: el nucleoide de ADN se mantiene relativamente compacto, sin soluciones de continuidad.
2. Nivel 1: Microorganismos con un grado bajo de daño en el ADN: el nucleoide aparece compacto, pero con discretos fragmentos periféricos de tamaño relativamente grande, tras roturas del ADN.
3. Nivel 2: Microorganismos con un grado medio de daño en el ADN: el nucleoide más relajado, ocupando mayor superficie, con fragmentos periféricos discretos de tamaño relativamente grande, tras roturas del ADN.
4. Nivel 3: Microorganismos con un grado alto de daño en el ADN: el nucleoide aparece mucho más relajado y extendido, con mayor número de fragmentos periféricos, tras roturas del ADN.
5. Nivel 4: Microorganismos con ADN masivamente fragmentado: muestran un halo amplio y difuso de fragmentos más o menos puntiformes de ADN, que han difundido siguiendo un gradiente, en la matriz de agarosa.

El criterio para establecer la correlación entre el tamaño de los halos por difusión de fragmentos y la fragmentación de ADN deriva de los resultados obtenidos utilizando la técnica de DBD-FISH (*Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, Gosálvez J. Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. Cytogenet Cell Genet 1998; 82:251-256; Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, Gosálvez J. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. Mutat Res 2000; 453:77-82; Fernández JL, Gosálvez J. Application of FISH to detect DNA damage: DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). Methods Mol Biol 2002; 203:203-216; Fernández JL, Goyanes F; Gosálvez J. DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). En: Rautenstrauss B, Liehr T, eds. FISH technology-Springer lab manual. Heidelberg: Springer-Verlag; 2002; 282- 290).*

Este procedimiento permite la detección y cuantificación de las roturas del ADN en núcleos de células desproteinizados sometidos a desnaturalización controlada del ADN. Esta desnaturalización genera secciones de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de rotura, que se detectan mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda de ADN genómico total marcada con un fluorocromo, visible mediante microscopía de fluorescencia. Cuanto mayor es el nivel de roturas en el ADN celular, mayor es la cantidad de ADN de cadena sencilla generada por la solución desnaturalizante, mayor es la cantidad de sonda hibridada y mayor la fluorescencia observada. Las muestras procesadas según la metodología descrita en la presente invención, fueron expuestas, tras la lisis, a una solución desnaturalizante alcalina 2,5 min a 22°C. Esta solución genera secciones de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de rotura que existen en el ADN. Por lo tanto, la intensidad de la hibridación utilizando una sonda de ADN genómico total estará en relación con la cantidad de roturas presentes en el ADN bacteriano. De este modo se ha confirmado que los nucleoides relajados y con fragmentos muestran un marcaje intenso con DBD-FISH, lo que demuestra la intensa fragmentación de su ADN (Ejemplo 1 y Figura 3). El resto de nucleoides muestran niveles muy bajos de marcado con esta sonda, que se corresponden con el fondo de hibridación generado por el propio tratamiento del nucleoide.

El protocolo descrito es eficaz en la gran mayoría de bacterias Gram negativas. En dichas bacterias, la solución de lisis es suficiente para lisar la pared celular y observar el cromosoma bacteriano entero y la difusión de los fragmentos de ADN, en caso de fragmentación de tal ADN. Para analizar bacterias con pared resistente, como las Gram positivas, es necesario incubarlo en suspensión con enzimas líticos de pared previamente a la inclusión en el microgel. Por ejemplo, los estafilococos deben resuspenderse con lisostafina (20 microgramos/ml) en tampón Tris-EDTA (TE). Los enterococos deben incubarse con una mezcla de lisozima (2 mg/ml) y mutanolisina (50

microgramos/ml) en tampón Tris-EDTA (TE). Las células de levadura se incuban en un tampón conteniendo sorbitol 1M, EDTA 0,1M, betamercaptoetanol 15 mM, pH 7,5 y Zimolasa (200 U/ml), Liticasa o Glucalasa (*Ligozzi M, Fontana R. Isolation of total DNA from bacteria and yeast. Afr J Biotech 2003; 2: 251-253*).

5 Las incubaciones deben realizarse durante al menos 5-30 min. a 37°C y luego mezclar la solución de microorganismos con la agarosa de bajo punto de fusión, para incluir en un microgel. Hay otras enzimas que por el momento no son tan comunes pero que pueden ser efectivas para lisar bacterias Gram positivas, como la acromopeptidasa y especialmente la labiasa (*Niwa T, Kawamura Y, Katagiri Y, Ezaki T. Lytic enzyme, labiase for a broad range of Gram-positive bacteria and its application to analyze functional DNA/RNA. J. Microbiol Methods 2005; 61:251- 260*).

10 Otra posibilidad es incubar con lisozima (5 mg/ml) y 24% polietilenglicol 20.000 durante 2 horas a 37°C (*Maassen CBM. A rapid and safe plasmid isolation method for efficient engineering of recombinant lactobacilli expressing immunogenic or tolerogenic epitopes for oral administration. J Immunol Method 1999; 223: 131-136*). La lisis en gel podría ser alcalina. El empleo de solventes orgánicos (acetona, butanol, tolueno, etc.) puede también ayudar a deshacer la pared bacteriana (*Harrison STL. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. Biotech Adv 1991; 9:217-240*). El empleo de sistemas mecánicos de rotura de la pared celular mediante sonicación o agitación con partículas disruptoras, no es aconsejable pues pueden dañar el ADN del microorganismo.

20 La presente invención también contempla un kit para la valoración de la fragmentación del ADN en microorganismos. Este kit contiene una solución de lisis y un fluorocromo. El kit contiene también el soporte pretratado con agarosa, por ejemplo, así como una solución para la preparación de un medio con características similares a las de una suspensión que contendrá la muestra, por ejemplo, una solución de agarosa de bajo punto de fusión que permite la preparación de un microgel.

A continuación se detalla el contenido y modo de empleo de un kit de acuerdo con una realización de la invención.

Descripción del contenido del kit

- 25 Portaobjetos pretratados*
- Tubos Eppendorf conteniendo 140 microlitros de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % en agua destilada o PBS, gelificada
- Tubos con solución de lisis*. Composición: Tris 0,01M, EDTA 0,05M, DTT 0,1M, SDS 2%, pH 10 (ajustado con NaOH).
- 30 Fluorocromo
- Recipiente con tapa, para incubación horizontal con la solución de lisis
- Lanceta
- Flotadores para tubos Eppendorf
- *Preparados tal y como se menciona en la descripción
- 35 **Material y equipo requerido**
- Microscopio de fluorescencia (recomendable objetivo de inmersión)
- Nevera a 4 °C
- Horno de secado a 37 °C
- Horno de secado o placa a 80 °C (opcional)
- 40 Baño de incubación a 37 °C
- Guantes de plástico
- Cubreobjetos de vidrio (18x18 mm, 22x22 mm o 24x60 mm)
- Micropipetas
- 4 cajas para incubaciones en horizontal
- 45 Agua destilada

Etanol 70%, 90%, 100%

Instrucciones de uso

Preparación de una muestra por portaobjetos:

- 1) Poner solución de lisis en recipiente de incubación horizontal, en un horno de secado a 37°C, tapado.
- 5 2) Diluir la muestra de microorganismos en medio de cultivo o PBS, a una concentración de 5-10 millones por mililitro.

Preparación del microgel de agarosa

- 3) Introducir el tubo Eppendorf con agarosa gelificada en el flotador, dejándolo al nivel de la tapa y dejar flotando 5 minutos en agua a 90-100°C hasta que la agarosa se funda. La fusión de la agarosa se puede realizar alternativamente en un horno microondas.
- 10 4) Transferir el tubo Eppendorf con el flotador a un baño termostático a 37°C y dejar 5 minutos hasta equilibrar la temperatura.
- 7) Añadir 60 microlitros de la muestra de microorganismos al contenido del tubo Eppendorf y resuspender, usando la micropipeta.
- 15 8) Colocar un portaobjetos pretratado en una superficie fría, a 4°C (por ejemplo, una lámina metálica o de vidrio).
- 9) Una vez se ha enfriado el portaobjetos, depositar la suspensión de microorganismos con agarosa y poner un cubreobjetos de vidrio, evitando formación de burbujas de aire. Se recomienda depositar una gota de 12, 20 o 50 microlitros, para un cubreobjetos de 18x18mm, 22x22mm, o 24x60mm, respectivamente.
- 20 10) Introducir la lámina fría con el portaobjetos en la nevera y dejar gelificar la muestra durante 5 minutos.

Procesado de las muestras

- 11) Usando guantes, retirar el cubreobjetos deslizándolo con suavidad e inmediatamente introducir el portaobjetos en horizontal en el recipiente con la solución de lisis, tapando y dejando incubar durante 5 minutos en la estufa o baño a 37°C.
- 25 12) Levantar el portaobjetos con ayuda de la lanceta usando guantes. Sujetarlo en horizontal y depositarlo en horizontal en una caja conteniendo abundante agua destilada o solución tampón para lavar la solución de lisis. Dejar incubar durante 5 minutos.
- 13) Introducir el portaobjetos en horizontal en una caja con etanol 70% (5 minutos), luego en otra caja con etanol 90% (5 minutos) y finalmente en etanol 100% (5 minutos), a -20°C.
- 30 14) Dejar secar al aire e incubar en horno microondas a 500-1000W durante 3-10 minutos, o en su defecto, en horno de secado a 80°C durante una hora como mínimo o toda la noche. Una vez secos, los portaobjetos procesados se pueden guardar en cajas archivadoras, a temperatura ambiente, en oscuridad, durante meses.

Tinción de las muestras para observación en microscopio de fluorescencia

- 35 Dependiendo de la disponibilidad de filtros de fluorescencia, las muestras se pueden teñir con fluorocromos específicos para ADN del tipo EvaGreen o (verde) o GelRed (rojo). Los fluorocromos de la familia SYBR, concretamente el SYBR Gold, permiten una buena resolución, con cierta fotoestabilidad.

Almacenamiento y estabilidad

Almacenar a temperatura ambiente.

- 40 Periodo de caducidad: los reactivos y materiales son estables por un periodo mínimo de 6 meses. Se recomienda que la solución de lisis se mantenga en posición vertical y bien cerrada. Los ejemplos que a continuación se exponen, se describen como un soporte de aspectos particulares de la invención y en ningún caso para limitar el ámbito de la misma.

Ejemplo 1: Confirmación de la presencia de roturas del ADN en los nucleoides que presentan difusión de fragmentos.

En una muestra de *Escherichia coli*, cepa TG1 en una fase de crecimiento exponencial en medio LB, a 37°C, se aplicó la metodología descrita para producir los halos de difusión de segmentos de ADN de modo espontáneo en

aquellas con ADN fragmentado. Para ese fin, la muestra se diluyó a una concentración de 10-20 millones por mililitro, en PBS o medio LB se mezcló con agarosa líquida de bajo punto de fusión al 1% para obtener una concentración final de esta última del 0,7%. Tras gelificar el microgel sobre el portaobjetos, la muestra se incubó en la solución de lisis formada por Tris 0,01M, EDTA 0,05M, DTT 0,1M, SDS 2%, pH 10 (ajustado con NaOH) durante 5 minutos a 37°C. Los portaobjetos se lavaron en suero fisiológico durante 5 minutos. Posteriormente de forma secuencial y sobre las mismas células, se procedió a efectuar DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hybridization; Fernández et al., 1998; 2000; 2002; Fernández y Gosálvez, 2002) utilizando una sonda de ADN genómico total de *Escherichia coli*. Este procedimiento permite la detección y cuantificación de las roturas del ADN en núcleos de células inmersos en microgeles de agarosa, desproteinizados y sometidos a una desnaturalización controlada del ADN. Esta desnaturalización genera tramos de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de rotura que son detectados mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda de ADN genómico total de *Escherichia coli*, marcada con un fluorocromo que emite fluorescencia roja (Cy3). Cuanto mayor es el nivel de roturas en el ADN, mayor es la cantidad de ADN de cadena sencilla generado por la solución desnaturalizante, mayor es la cantidad de sonda hibridada y mayor la fluorescencia roja obtenida. Las muestras procesadas, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, contienen ADN de cadena sencilla generado por la solución desnaturalizante a partir de los posibles extremos de rotura que existen en el ADN. Por lo tanto la intensidad de la hibridación utilizando una sonda de ADN genómico total estará en relación con la cantidad de roturas presentes en el nucleóide de *Escherichia coli*.

Se contabilizaron 250 células obtenidas al azar. Las imágenes de tinción mediante DAPI de los halos de dispersión de la cromatina se capturaron utilizando una cámara CCD refrigerada empleando dos filtros para la visualización simultánea de los halos de dispersión, visibles en azul y de la señal de hibridación, visible en rojo. El propósito era confirmar que los nucleoides con difusión de fragmentos de ADN poseen roturas de tal ADN. Los resultados demostraron que aquellos nucleoides con difusión de fragmentos de ADN tenían una alta intensidad de marcado de las roturas del ADN mediante DBD-FISH (Figura 3).

En consecuencia, la simple determinación de la difusión de los fragmentos de ADN, obtenidos mediante el presente procedimiento, ofrecen una estimación simple y directa de la fragmentación del ADN.

Ejemplo 2: Evaluación de la fragmentación espontánea del ADN en diferentes especies bacterianas.

Se tomaron nueve especies bacterianas creciendo en placa y se procedió a la determinación de la frecuencia de bacterias con fragmentación del ADN en dichas muestras. Se procesaron las siguientes especies bacterianas: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*.

Cada muestra se incluyó en un microgel de agarosa, realizándose tres microgeles de 18x18mm en cada portaobjetos, cada uno correspondiendo a una especie distinta. Uno de los microgeles de cada portaobjetos correspondía al mismo cultivo de *Escherichia coli*, como un resultado y como control de procesamiento. Los portaobjetos se incubaron en la solución de lisis, se lavaron, se deshidrataron y se dejaron secar a 80°C durante 3 horas, se tiñeron con SYBR Gold y se examinaron con el microscopio de fluorescencia. Se contabilizaron 1.000 células por especie bacteriana. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La lisis fue efectiva para obtener nucleoides en todas las especies analizadas (Figura 4). Además se observaron células con nucleoides cuyo ADN estaba masivamente fragmentado (nivel 4), difundiendo en la matriz de agarosa, en todas las especies. Esta fragmentación era de modo espontáneo, basal, en el cultivo, no inducida por ningún agente, siendo su frecuencia variable de un cultivo a otro.

Tabla 1

Distribución de los porcentajes de células con ADN fragmentado en 6 especies bacterianas.	
Microorganismo	Fragmentación ADN
<i>Escherichia coli</i>	5,24
<i>Proteus mirabilis</i>	5,91
<i>Acinetobacter baumannii</i>	39,59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,35
<i>Salmonella spp.</i>	5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6,29

Ejemplo 3: Evaluación de la fragmentación del ADN tras la incubación con diferentes agentes antimicrobianos. Daño por agentes exógenos.

- Como ejemplo ilustrativo, se presenta un estudio tratando de determinar el posible daño del ADN inducido por tres antibióticos: ampicilina, gentamicina y ciprofloxacina y un agente generador de radicales hidroxilo, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), aplicados sobre cultivos de la cepa TG1 de *Escherichia coli*, que es sensible a todos ellos, creciendo en fase exponencial, en medio LB. Los agentes empleados tienen diferentes mecanismos de acción antimicrobiana. La ampicilina es un antibiótico beta-lactámico que afecta a la síntesis del peptidoglicano de la pared celular tras unirse a PBP (penicillin binding proteins) y activar autolisinas. La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido que afecta a la síntesis proteica, a nivel de la subunidad 30S, uniéndose a la proteína p10, de los ribosomas bacterianos. La ciprofloxacina es un antibiótico de la familia de las quinolonas, que induce roturas de cadena doble del ADN como resultado de inhibir la ADN girasa y la topoisomerasa IV. Los agentes se mezclaron en el medio de cultivo líquido LB, a las concentraciones y tiempos de incubación especificados en la Tabla 2. Tras dichos tiempos de incubación, las bacterias se procesaron según el procedimiento de la presente invención para determinar el porcentaje de bacterias con el ADN fragmentado.
- Simultáneamente, otra alícuota de las mismas se incubó con una tinción vital. Este es un test de exclusión de colorante, usando un fluorocromo verde (SYBR Green II) que se une al ADN y que penetra en todas las células, mezclado con un fluorocromo rojo, el yoduro de propidio (IP), que solo penetra en aquellas células con funcionalismo deficiente de la membrana, presuntamente "muertas". De este modo las células "vivas" se tiñen de verde al excluir el colorante rojo, mientras que las "muertas" no pueden expulsar el colorante rojo y se tiñen con el IP. Los resultados se presentan en la Tabla 2. Tras estudiar 5.000 bacterias en cada punto experimental, se observó que la gentamicina, la ciprofloxacina y el peróxido de hidrógeno inducían solamente un incremento muy discreto de células con membrana permeable al IP, mientras que dicho incremento era espectacular con la ampicilina. Pero la ampicilina apenas aumentaba el porcentaje de células con ADN fragmentado, al igual que la gentamicina. Sin embargo, la ciprofloxacina y el H₂O₂ a dosis altas inducían la fragmentación masiva del ADN de todas las células examinadas (nivel 4, Figura 5). Este resultado demuestra que la valoración de la permeabilidad de la membrana no es un parámetro universal como indicador de vitalidad y que el estudio del ADN puede aportar información valiosa complementaria, no proporcionada por dicha tinción y viceversa.

Tabla 2

Porcentajes de bacterias <i>Escherichia coli</i> teñidas por la tinción vital y porcentaje de bacterias con ADN fragmentado, tras la acción de diferentes agentes antimicrobianos.			
Agente	Tinción Vital		Fragmentación ADN
	Permeables	Cápsulas Vacías	
Control	0,50	0,05	0,30
Ampicilina [300 µg/ml] (40 min)	50,00	5,00	4,20
Gentamicina [300 µg/ml] (40 min)	10,00	0,50	3,70
Ciprofloxacina [25 µg/ml] (40 min)	5,00	0,30	100,00
H ₂ O ₂ [10 mM] (10 min)	5,00	0,30	100,00

Ejemplo 4: Evaluación de la sensibilidad o resistencia de un microorganismo a un determinado agente.

- Se muestra un estudio del efecto de la ciprofloxacina a nivel del ADN en una cepa sensible (TG1) y en otra resistente a este antibiótico de *Escherichia coli*, creciendo en fase exponencial.
- La concentración media inhibitoria del crecimiento (CMI) fue de 0,012 microgramos/ml. Por el contrario, la cepa resistente no estaba afectada en su crecimiento por la concentración máxima empleada en el test comercial (CMI>32 microgramos/ml). Se estudiaron 6 concentraciones de ciprofloxacina aplicadas a cultivos en medio LB durante 40 min y se procedió al estudio de la tinción vital de modo similar al descrito en el ejemplo anterior (Tabla 3) y del nivel de daño del ADN de acuerdo con el protocolo de la invención. En la cepa sensible, se mostró un muy discreto incremento de células permeables al IP y con una cápsula vacía a medida que se aumentaba la dosis del antibiótico al nivel de las dosis más altas empleadas. La tinción vital no detectó ningún efecto en la cepa resistente.

Tabla 3

Porcentajes de bacterias <i>Escherichia coli</i> teñidas por la tinción vital, tras la exposición a dosis crecientes de ciprofloxacina, en una cepa sensible y otra resistente al antibiótico.				
Dosis Ciprofloxacina	Tinción Vital			
	Cepa Sensible		Cepa Resistente	
	Permeables	Cápsulas Vacías	Permeables	Cápsulas Vacías
Control (0,00 µg/ml)	0,40	0,00	0,66	0,03
0,50 µg/ml	0,95	0,05	0,65	0,00
1,00 µg/ml	1,04	0,00	0,72	0,10
2,50 µg/ml	2,60	0,15	0,87	0,10
5,00 µg/ml	2,67	0,24	1,08	0,10
10,00 µg/ml	3,60	0,48	0,82	0,15

5 El daño a nivel del ADN fue observado en la cepa sensible y a la concentración más baja empleada en el experimento (0,5 µg/ml). Además, con esta concentración, el nivel de daño correspondía al tipo 4, es decir, el máximo en la escala establecida previamente (Figura 2). Todos estos microorganismos mostraban el ADN masivamente fraccionado, con un halo amplio y difuso de fragmentos puntiformes de ADN, que han difundido en la matriz de agarosa de acuerdo con un gradiente a partir del área central del nucleóide. Las dosis mayores de 0,5 µg/ml no parecían modificar las imágenes de fragmentación, observándose quizás una ligera mayor difusión, especialmente en el área central del nucleóide. Esto podría indicar un efecto próximo a la saturación del daño del ADN por la ciprofloxacina.

Ejemplo 5: Determinación del posible efecto de dosis bajas de ciprofloxacina, próximas a la CMI, sobre la integridad del ADN.

15 Una vez determinado que ciprofloxacina a concentraciones elevadas induce fragmentación masiva del ADN, es interesante determinar si la técnica puede discriminar algún efecto a nivel de la integridad del ADN tras exposición de la cepa sensible de *Escherichia coli* (TG1) a concentraciones bajas del antibiótico, por encima, por debajo y al nivel de la CMI (0,012 microgramos/ml). Las dosis empleadas se muestran en la Tabla 4, siendo el tiempo de incubación de 40 minutos en fase de crecimiento exponencial, en medio LB. La Tabla 4 muestra los resultados de la tinción vital. Aunque hay una tendencia a incrementar el porcentaje de células permeables al BP y con cápsula vacía a medida que se incrementa la dosis, esto no es significativo con las dosis bajas empleadas

20

Tabla 4

Porcentajes de bacterias <i>Escherichia coli</i> teñidas por la tinción vital, tras la exposición a dosis bajas, crecientes, de ciprofloxacina, en una cepa sensible.		
Dosis Ciprofloxacina	Tinción Vital	
	Cepa Sensible	
	Permeables	Cápsulas Vacías
Control (0,00 µg/ml)	1,30	0,60
0,003 µg/ml	1,50	0,70
0,006 µg/ml	2,10	0,76
0,012 µg/ml	2,30	1,06
0,100 µg/ml	2,40	1,40

El nivel de daño del ADN se determinó mediante el procedimiento objeto de la presente invención. La dosis más alta

5 (0,1 microgramos/ml), por encima de la CM3, evidenció daño en todas las células analizadas. Tal daño tendía a ser homogéneo entre las distintas células, teniendo una menor magnitud que la pulverización masiva descrita en el ejemplo anterior, con dosis de 0,5 microgramos/ml y superiores. Sin embargo, el grado de daño era importante, similar al nivel 3 (Figura 2). Este nivel se califica como un grado alto de daño en el ADN. El nucleoide aparece muy relajado y extendido, con un alto número de fragmentos periféricos, tras roturas del ADN.

La dosis similar a la CMI también originó daño claro y homogéneo entre los distintos nucleoides, pero de magnitud similar al nivel 2 de la escala (Figura 2). Corresponde a un grado medio de daño en el ADN. El nucleoide aparece relajado, ocupando mayor superficie que en el control sin tratamiento, con fragmentos periféricos discretos de tamaño relativamente grande, tras roturas del ADN.

10 La dosis de 0,006 microgramos/ml, la mitad de la CMI, también indujo daño claro y homogéneo entre los distintos nucleoides, siendo su magnitud intermedia entre el nivel 1 y 2, en la escala arbitraria de daño (Figura 2).

Finalmente, la dosis de 0,003 microgramos/ml, un tercio de la CMI, también indujo un daño evidente, homogéneo, pero de nivel 1. Este corresponde a un grado bajo de daño en el ADN, donde el nucleoide aparece compacto, pero con discretos fragmentos periféricos de tamaño relativamente grande, tras roturas del ADN (Figura 2).

15 En conclusión, el procedimiento objeto de la presente invención tiene una gran resolución, de tal modo que puede detectar incluso daño inducido por concentraciones muy bajas de ciprofloxacina, por debajo de la CMI, que no llegan a inhibir notoriamente el crecimiento bacteriano ni a afectar a la "viabilidad" determinada por la tinción vital. Es posible que los niveles bajos de daño sean reparables por la maquinaria enzimática de reparación del ADN, permitiendo la viabilidad celular.

20 **Ejemplo 6: Determinación del tiempo mínimo de incubación con ciprofloxacina que permite detectar daño en el ADN de la cepa sensible de *Escherichia coli*.**

La cepa TG1 de *Escherichia coli*, en crecimiento exponencial en medio LB, se incubó durante tiempos decrecientes: 40 minutos, 15 minutos, 5 minutos, 2,5 minutos y 0 minutos, con una dosis de 1 microgramo/ml de ciprofloxacina. También se incluyó un control sin ciprofloxacina. El tiempo medio necesario para la inclusión en microgel y enfriamiento en una nevera se estimó en 1,5 minutos. Durante este tiempo es presumible que el antibiótico esté funcionando, por lo tanto el tiempo de 1,5 minutos debería ser sumado a cada uno de los tiempos ensayados.

30 Tras 40 min., todas las bacterias mostraron el ADN masivamente pulverizado (nivel 4; Figura 6). También se demostró un efecto con un tiempo de 15 minutos. En este caso, el daño también tendía a ser homogéneo entre los diferentes nucleoides, pero teniendo mucha menos magnitud de un grado medio (nivel 2) (Figura 6). El tiempo mínimo en el que se detectó un daño evidente del ADN fue el de 5 minutos, siendo un grado bajo de daño (nivel 1), aunque con 2,5 minutos parecía visualizarse un ligero incremento en la relajación del nucleoide con respecto al de 0 min. y al control, pero era de difícil valoración.

35 En consecuencia, la técnica objeto de la invención permite reconocer que el daño del ADN originado por una dosis letal de ciprofloxacina, es acumulativo con el tiempo y no instantáneo o generado en un relativamente corto espacio temporal. El tiempo mínimo de incubación para detectar un mínimo efecto a nivel del ADN empleando una dosis de 1 microgramo/ml, fue de 5 minutos + 1,5 minutos = 6,5 minutos.

Ejemplo 7: Visualización de daño del ADN tras el cultivo con antibióticos que no actúan a nivel del ADN, incubando 24 horas.

40 Se trata de observar si, a pesar de no ver daño inicialmente a nivel del ADN, la muerte celular se traduce en fragmentación tardía del mismo. Para ese fin, la cepa TG1 de *Escherichia coli*, creciendo en fase exponencial, en medio líquido LB, se incubó 24 horas con ampicilina (300 microgramos/ml). Este antibiótico beta-lactámico afecta a la síntesis del peptidoglicano de la pared celular tras unirse a PBP (proteínas de unión a penicilina) y activar autolisinas. Para la comparación, una alícuota del cultivo se procesó tras 40 minutos de tratamiento, tanto para la tinción vital como para la determinación del daño del ADN mediante la técnica de la invención. La Tabla 5 muestra los datos de la tinción vital. Tras 20 min. de incubación con el antibiótico beta-lactámico, aumentó claramente el porcentaje de células con una pared alterada, permeable, o con aspecto de cápsula vacía. Tras un día de incubación, el incremento fue espectacular, especialmente las de aspecto de cápsula vacía, apareciendo muertas la casi totalidad, desde el punto de vista de la tinción vital.

Tabla 5

Porcentajes de bacterias <i>Escherichia coli</i> teñidas mediante la tinción vital tras incubación con ampicilina.				
Agente	Tinción Vital			
	20 minutos		24 horas	
	Permeables	Cápsulas Vacías	Permeables	Cápsulas Vacías
Control	0,32	0,20	0,90	25,10
Ampicilina	5,22	0,67	17,29	75,97

La determinación del daño del ADN de acuerdo con la técnica de la invención demostró que tras 20 minutos de incubación no se apreciaban diferencias con respecto al control. Sin embargo, tras 24 horas la densidad de nucleoides era escasa y mostraban un aspecto relajado, sin un área central bien definida. Lo más llamativo era la presencia masiva de fragmentos de ADN degradados puntiformes homogéneamente distribuidos por el fondo de la preparación (Figura 7). El procedimiento objeto de la presente invención demuestra que la muerte celular, aunque no se deba inicialmente a daño directo del ADN, puede desembocar indirectamente con el tiempo en daño masivo del ADN.

Ejemplo 8: Visualización de la evolución de daño del ADN generado por ciprofloxacina en una cepa sensible de *Escherichia coli*. Aplicación de sistemas de análisis de imagen digital para la evaluación del daño.

La cepa TG1 de *Escherichia coli*, en crecimiento exponencial en 400 microlitros de medio LB, se incubó con 10 microgramos/ml de ciprofloxacina, durante 40 minutos. Posteriormente las bacterias se centrifugaron y se resuspendieron en 400 microlitros de medio sin ciprofloxacina. Esta operación se repitió otra vez para lavar el antibiótico. Las bacterias se incubaron durante 0, 15, 30, 60 y 90 minutos tras lo que fueron procesadas según el procedimiento de la invención. En cada tiempo se procesó simultáneamente en el mismo portaobjetos un control sin tratamiento antibiótico.

Tras la tinción con SYBR Gold, las imágenes se capturaron con una cámara CCD KX32ME refrigerada de alta sensibilidad (Apogee Instruments, Roseville, CA). Posteriormente se realizó el análisis de las imágenes mediante una macro diseñada con el programa Visilog 5.1 (Noesis, Francia). Esto permitía la segmentación y corrección del fondo y diferencias de luminosidad en el campo. Los resultados de la superficie total de la tinción bacteriana, del área de la cápsula residual y del halo de fragmentos o bucles dispersos del ADN (área total-área de la cápsula), en píxeles, se transcribieron a una tabla Excel. Finalmente se realizó un estudio estadístico de dichos datos mediante el programa SPSS 12.5, empleando los test no paramétricos de la U de Mann-Whitney y H de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Los resultados demostraron que las roturas de doble cadena del ADN originadas por la ciprofloxacina se pueden reparar si el antibiótico es eliminado del medio. Inmediatamente tras el tratamiento, se puede ver fragmentación alta (nivel 3-4). Tras 15 minutos se empieza a detectar de un modo estadísticamente significativo un decremento en la superficie del halo de difusión de fragmentos, teniendo tales fragmentos siendo un mayor tamaño. Este halo sigue decreciendo más lentamente durante los 30 y 60 minutos, presentando crecientemente menos fragmentos, decreciendo de modo significativo, más ampliamente, después de los 90 min. (Figura 8A). En este caso ya no se aprecian fragmentos sino más bien bucles de relajación del ADN sin diferencias con respecto a los controles sin tratamiento (nivel 0). De este modo se ha obtenido una cinética de reparación de las roturas del ADN, estando tal ADN totalmente reparado en apariencia tras 90 minutos de incubación. Sin embargo, esto no significa que la reparación haya sido siempre correcta. Bastante curiosamente, el tamaño de las cápsulas bacterianas se incrementa alrededor del doble, en promedio, tras los tiempos finales de 60 y 90 minutos, con respecto al resto de tiempos ensayados (Figura 8B). Este incremento es irregular, heterogéneo, entre las diferentes bacterias.

El procedimiento objeto de la presente invención demuestra un hecho de gran trascendencia clínica, esto es, la importancia de mantener las dosis correctas del antibiótico durante tiempos prolongados. Si se retira tal antibiótico prematuramente, el daño originado inicialmente en la bacteria puede ser revertido.

Ejemplo 9: Desarrollo de software para la medida automatizada de los niveles de fragmentación del ADN

Utilizando la metodología contemplada en el ejemplo 6 de la presente invención, se ha diseñado una metodología básica que fija las bases para la caracterización morfológica de las imágenes generadas por bacterias que tienen ADN fragmentado y ADN no fragmentado utilizando sistemas convencionales de análisis de imagen. El procedimiento permite discriminar entre ambos tipos de bacterias de forma automática y por lo tanto objetiva.

El procedimiento global comprende el diseño de dos estrategias:

- 1) un modelo de captura interactiva de imágenes y toma de decisiones en base al número de elementos

analizados (Figura 9).

2) una rutina de segmentación para seleccionar las ROI (Regions Of Interest) (Figura 10).

5 En este ejemplo práctico, se utilizó captura directa en microscopio de fluorescencia (x100) utilizando una cámara CCD refrigerada monocroma de 12 bits de profundidad de color. Las imágenes se guardaron como .tiff y se procesaron utilizando el programa *Scion Image* (NIH IMAGE USA) de dominio público. Este programa contiene las herramientas mínimas necesarias para realizar operaciones de segmentación y es capaz de medir densidades integradas de fluorescencia en las imágenes que se procesan. La densidad integrada relaciona la suma de los distintos niveles de grises en la AOI con el área realizando una sustracción del fondo. Utilizando esta herramienta, se procesaron 9 series de experimentos en los que se capturaron 100 bacterias que contenían ADN no fragmentado y 100 bacterias con ADN fragmentado. Los resultados muestran que se generan valores muy similares entre cada una de las series cuando el criterio de agrupación y comparación es: bacterias que presentan ADN fragmentado *frente a* bacterias que no presentan ADN fragmentado.

10 Por lo tanto es posible discriminar los dos tipos de estados de ADN bacteriano en base a apreciaciones objetivas realizadas en base a entornos de análisis de imágenes.

15 Aunque en este caso se han medido solo áreas de fluorescencia y las intensidades de las áreas seleccionadas, existen otros criterios en relación con las texturas generadas por cada tipo de imagen, por lo tanto se podrían caracterizar y discriminar ambas poblaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para evaluar la integridad del ADN de los microorganismos que comprende las siguientes etapas secuenciales:
 - 5 a) inmovilización del microorganismo sobre un portaobjetos, sin fijación, mediante inclusión del mismo en un medio inerte;
 - b) tratamiento con una solución de lisis no desnaturalizante del ADN, que tiene un pH comprendido entre 6,5 y 10,5 para extraer paredes, membranas y proteínas celulares, en el que el detergente comprendido en dicha solución de lisis es un detergente desnaturalizante de proteínas iónico;
 - 10 c) estabilización del nucleóide de ADN del microorganismo sobre el portaobjetos *secundo la muestra* por medio de calor seco, incubando el portaobjetos con la muestra lisada en un horno de microondas y
 - d) tinción con un *colorante fluorescente altamente sensible* y evaluación de la integridad del ADN.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el detergente iónico es un detergente seleccionado del grupo del dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfonato de alquilbenceno, laurilsarcosina (sarcosil), sal hidratada del ácido glicocólico y sus mezclas.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la solución de lisis comprende ditioneitol (DTT) entre 0,001 y 2M; 2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) entre 0,001 y 2M; ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) entre 0,001 y 2M y dodecilsulfato de sodio (SDS) entre 0,1 y 3%.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la solución de lisis comprende preferentemente dithiothreitol (DTT) 0,1M; (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) 0,01M; ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0,05M y dodecilsulfato de sodio (SDS) 2%.
- 20 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la solución de lisis es ajustada a pH aproximadamente 10 con NaOH.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra que contiene los microorganismos está incluida en un microgel inerte, preferentemente en un microgel de agarosa.
- 25 7. Un procedimiento de evaluación de la integridad del ADN de los microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la evaluación se realiza mediante un análisis visual directo.
8. Un procedimiento de evaluación de la integridad del ADN de los microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la evaluación se realiza en una forma automatizada mediante la aplicación de software para analizar imágenes digitalizadas, obtenidas mediante cámaras acopladas a plataformas de microscopía.
- 30 9. El uso de un kit para llevar a cabo el procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo dicho kit:
 - a) portaobjetos pretratados;
 - b) solución de agarosa;
 - c) solución de lisis que comprende un agente desnaturalizante de proteínas iónico; y
 - d) fluorocromo.
- 35 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la solución de lisis comprende ditioneitol (DTT) entre 0,001 y 2M; 2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) entre 0,001 y 2M; ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) entre 0,001 y 2M y dodecilsulfato de sodio (SDS) entre 0,1 y 3%.
11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones **9 y 10**, en el que la solución de lisis es ajustada a pH entre 6,5 y 10,5.
- 40 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la solución de lisis comprende preferente ditioneitol (DTT) 0,1M; (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) 0,01M; ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0,05M y dodecilsulfato de sodio (SDS) 2%.
13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la solución de lisis es ajustada a pH de aproximadamente 10 con NaOH.

45

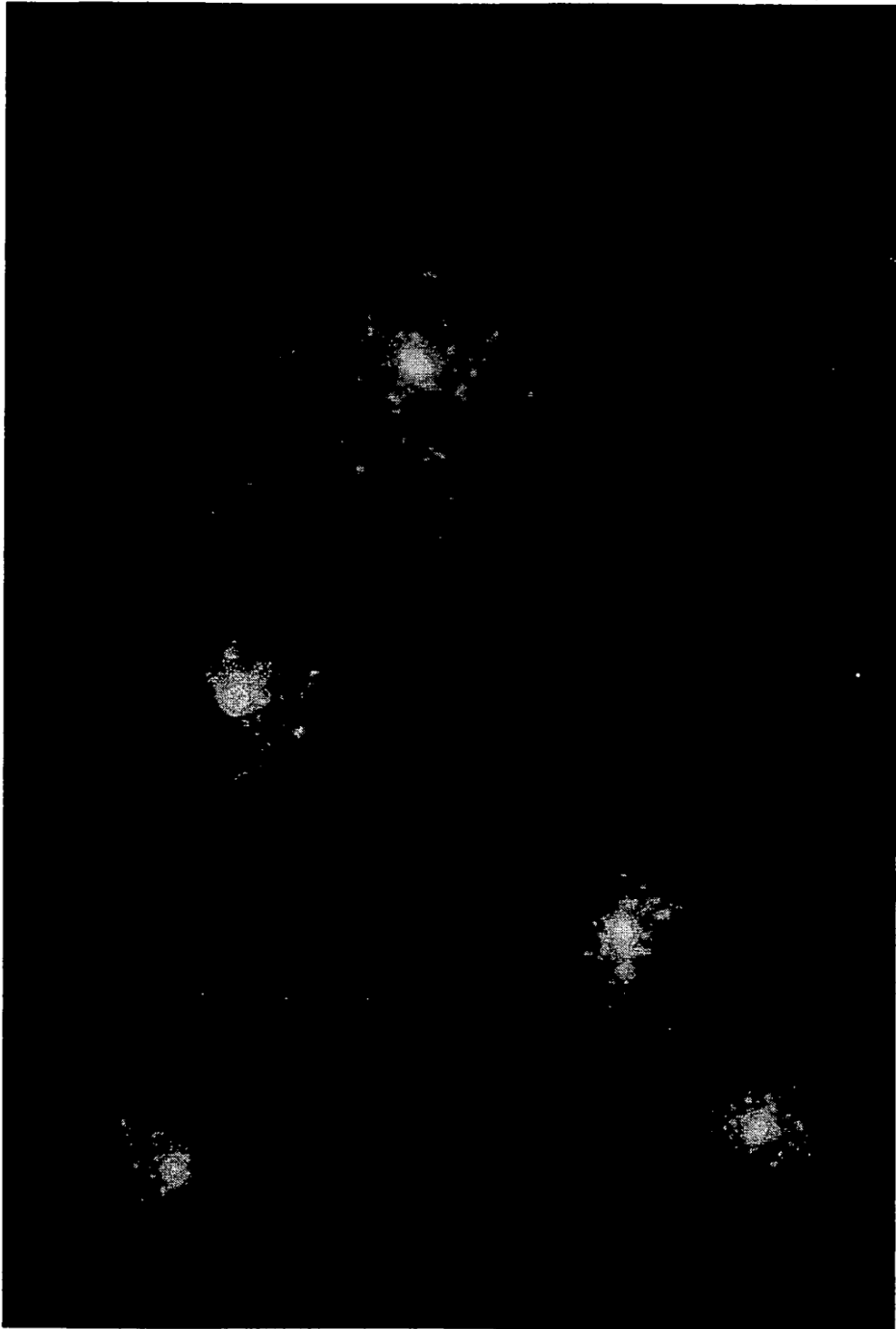


FIG. 1

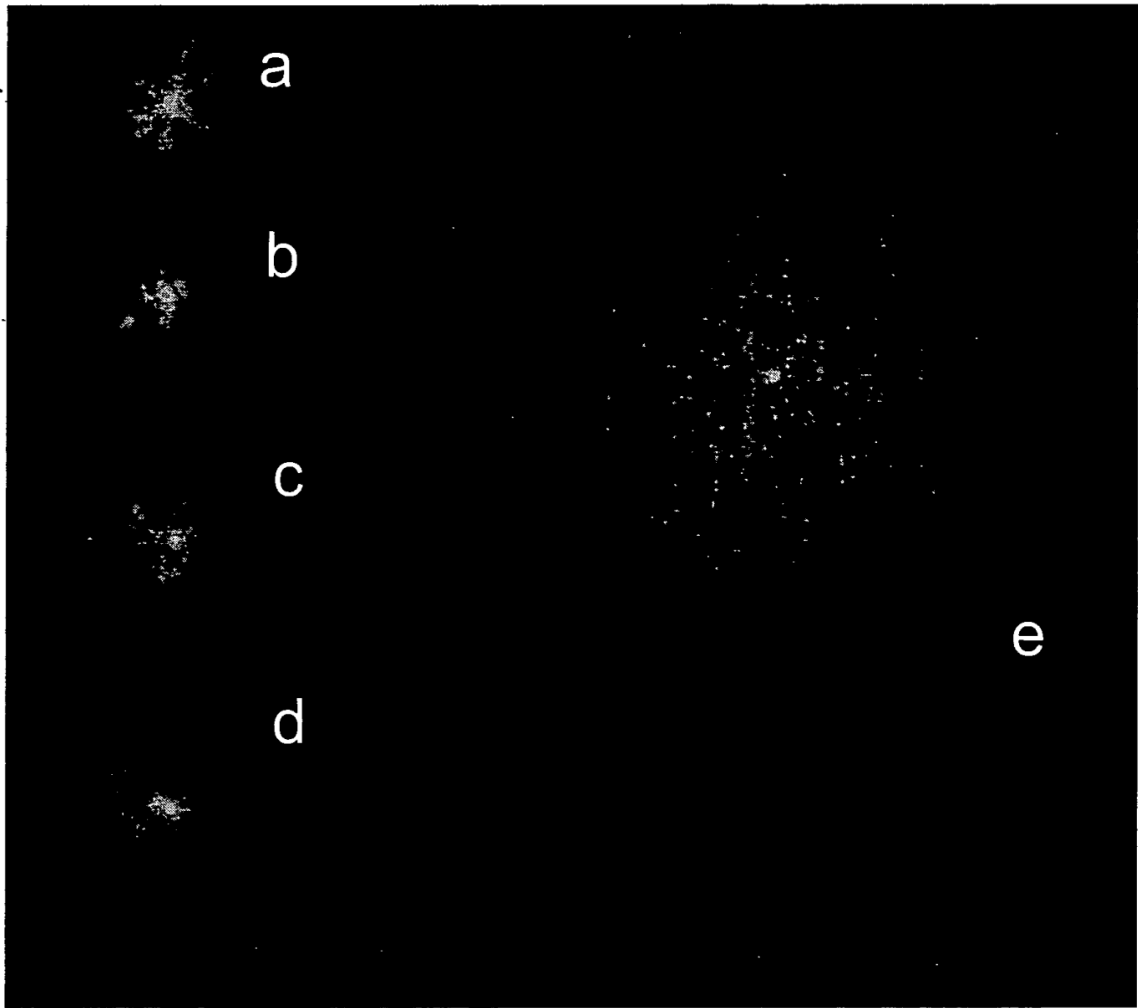


FIG. 2

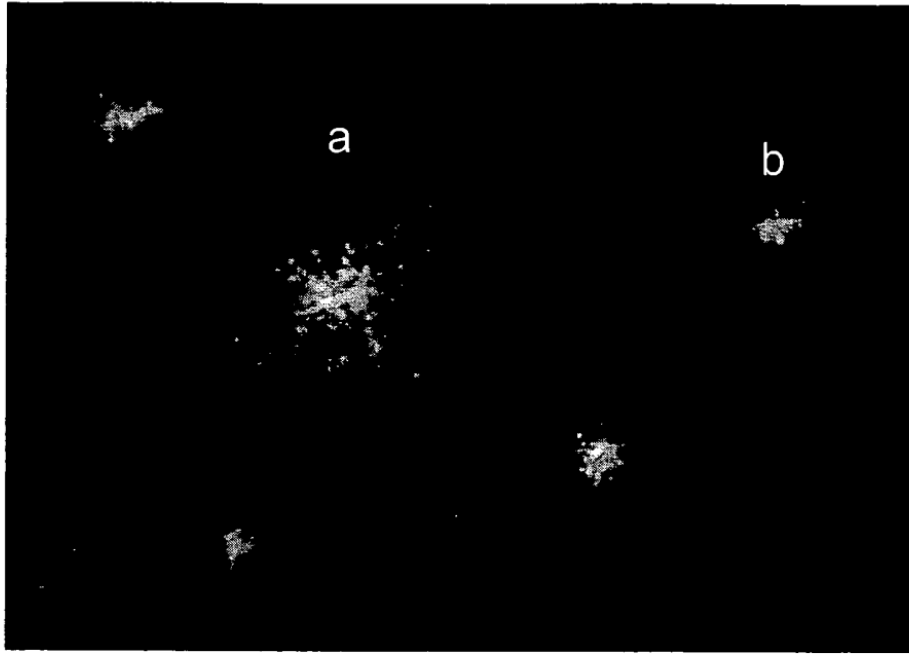


FIG. 3

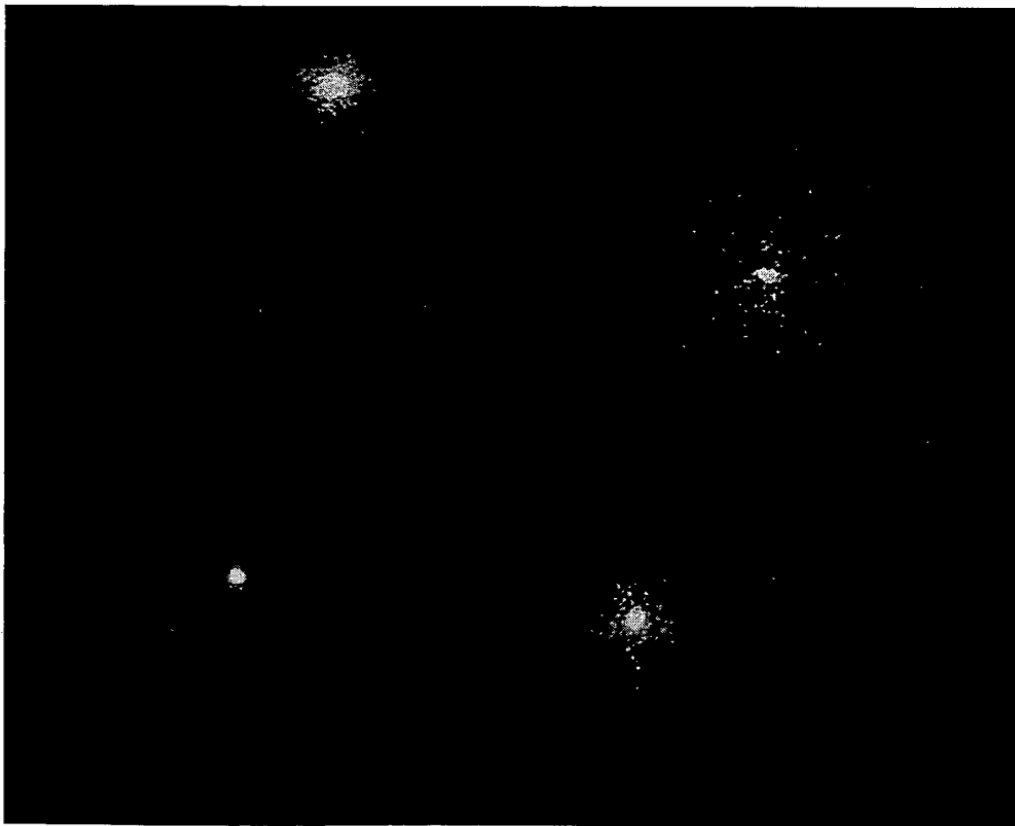


FIG. 4

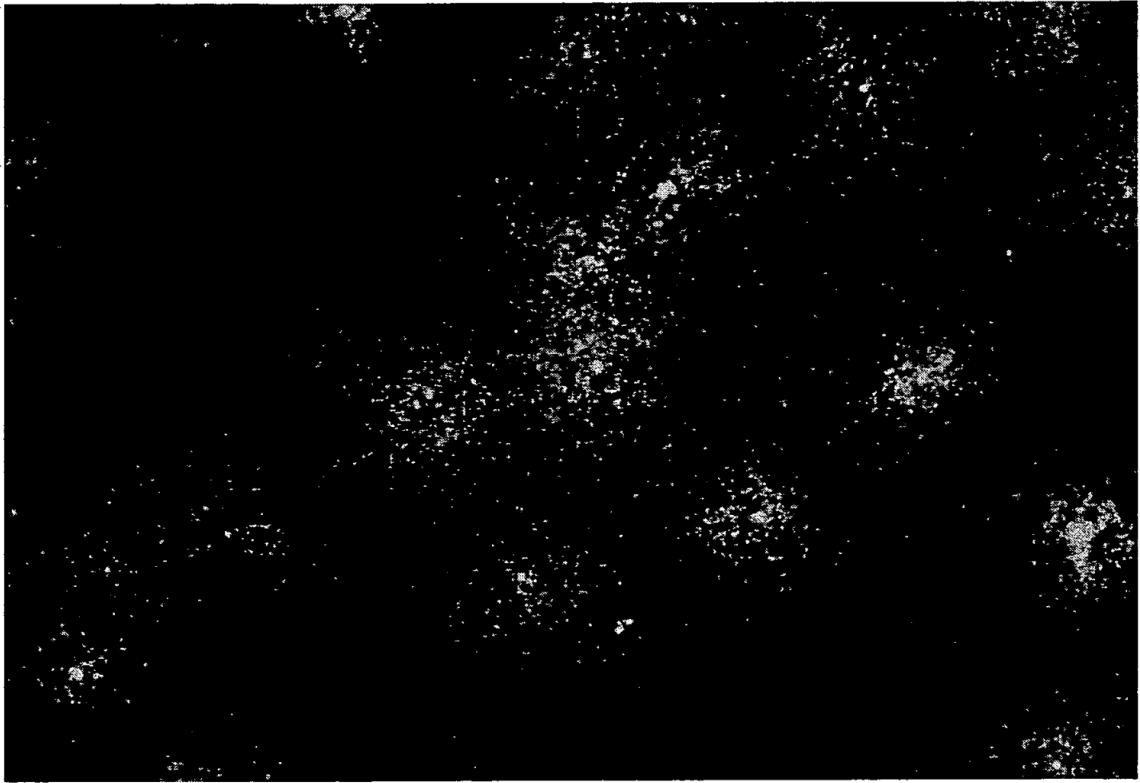


FIG. 5

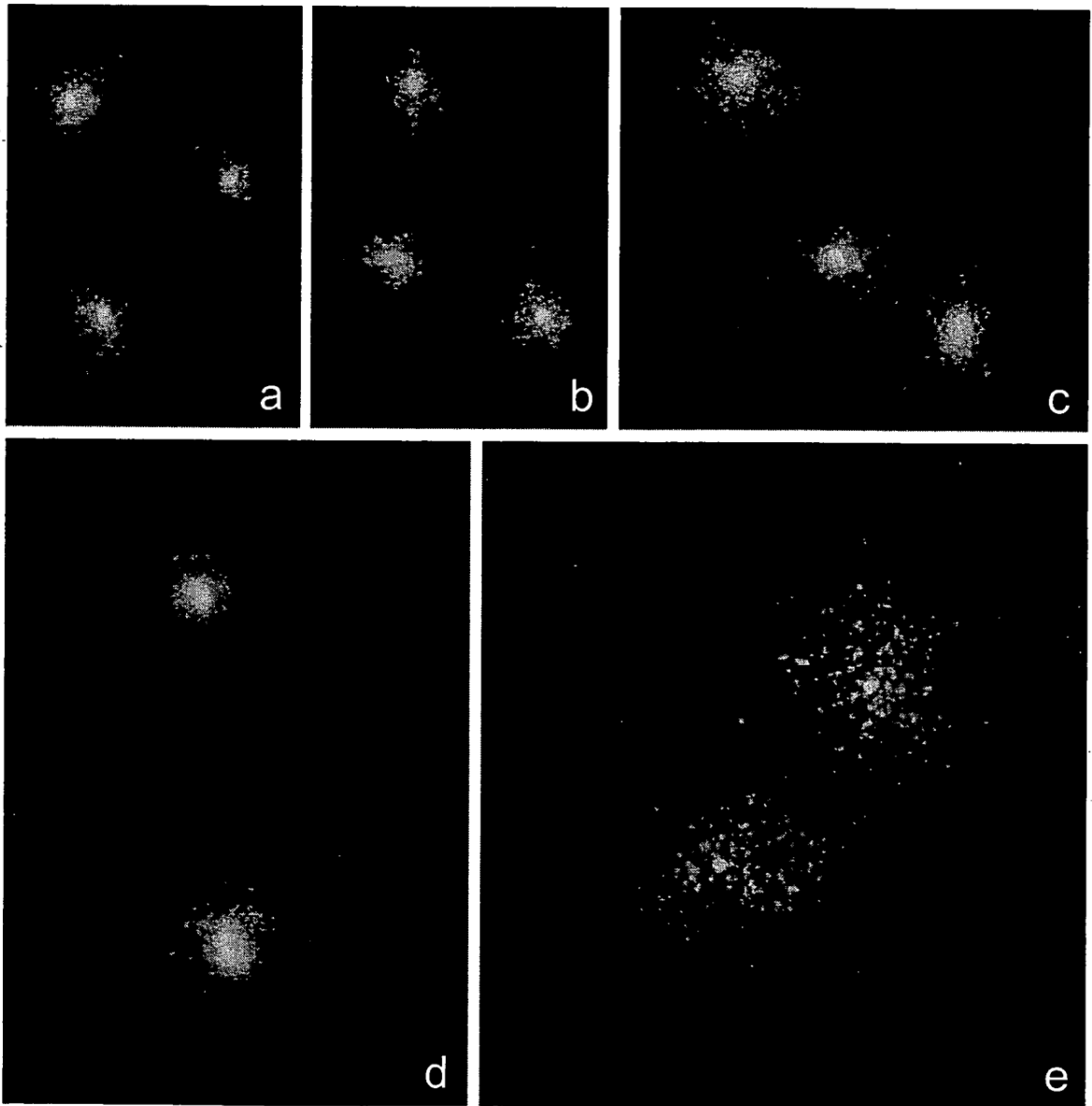


FIG. 6

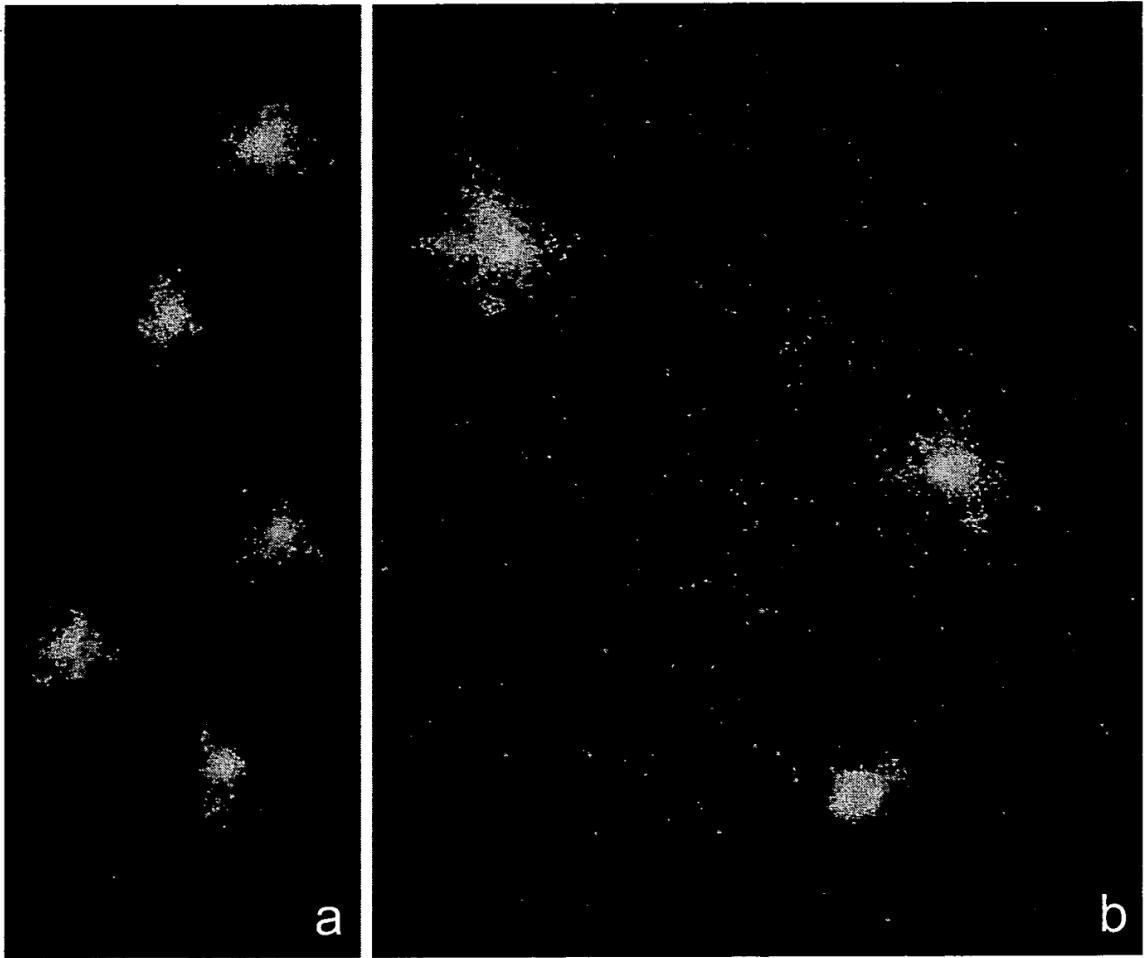
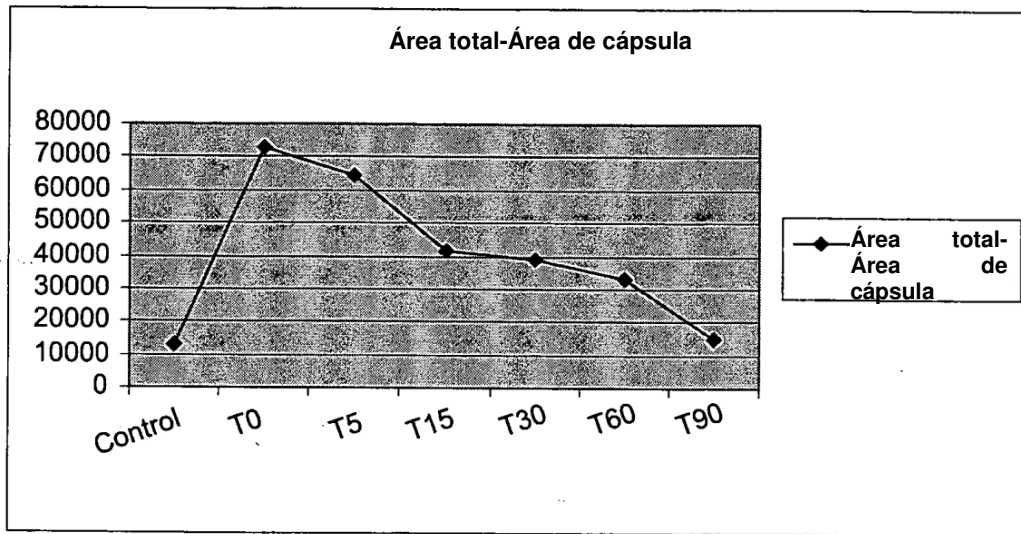
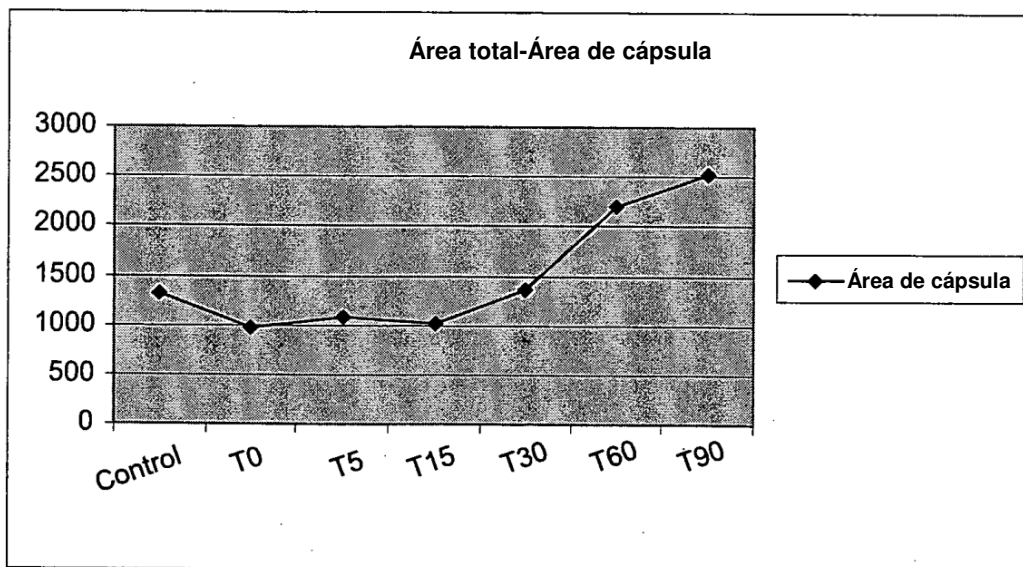


FIG. 7



A



B

FIG. 8

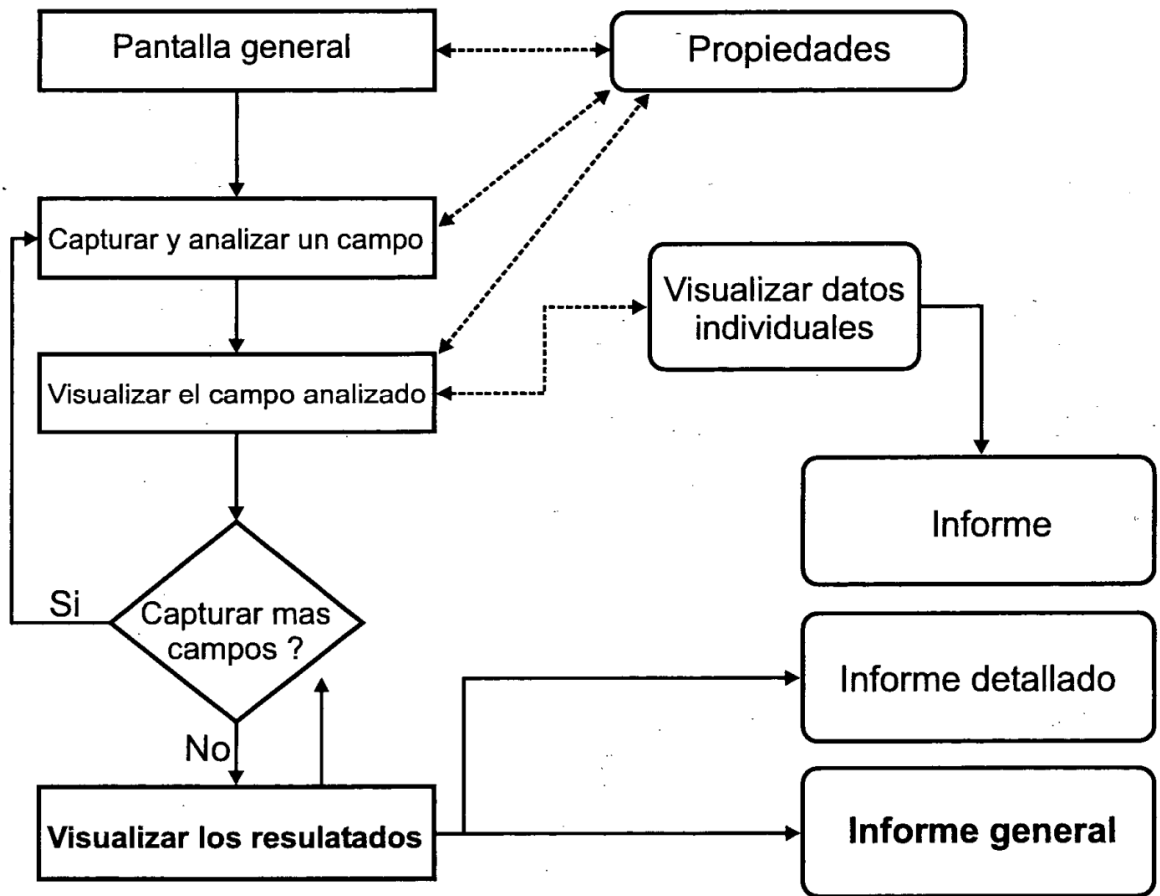


FIG. 9

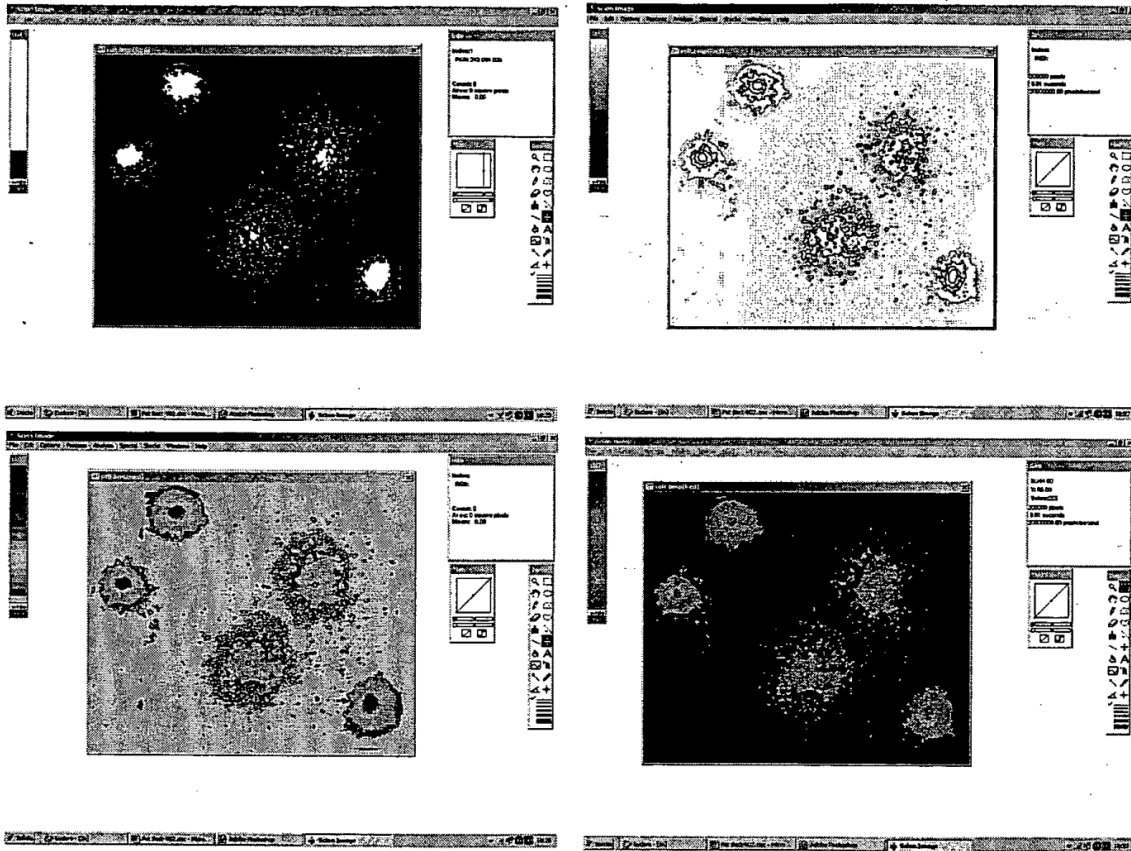


FIG. 10

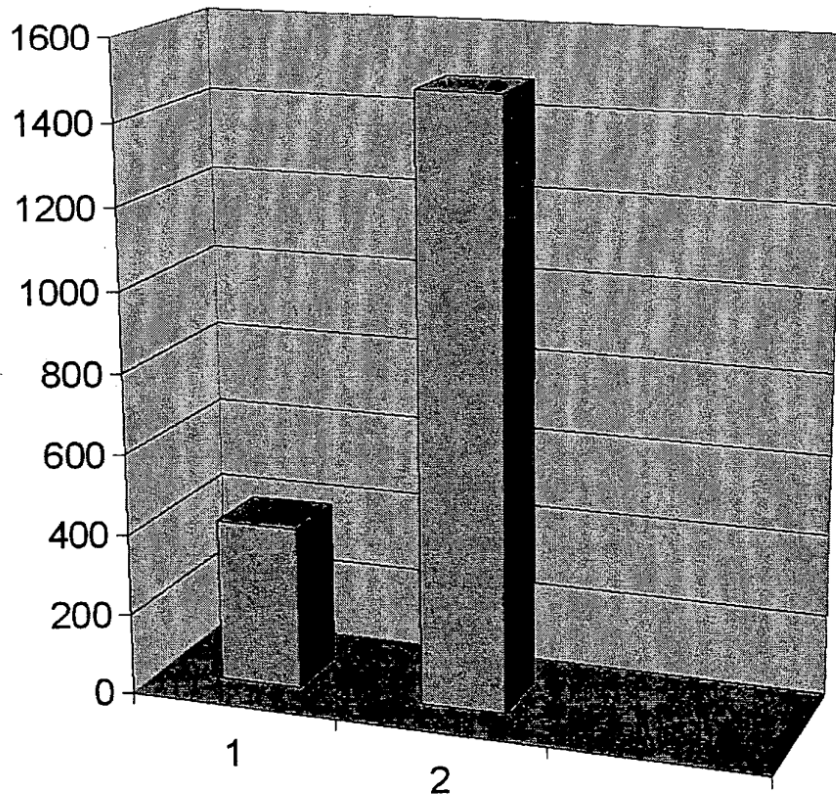
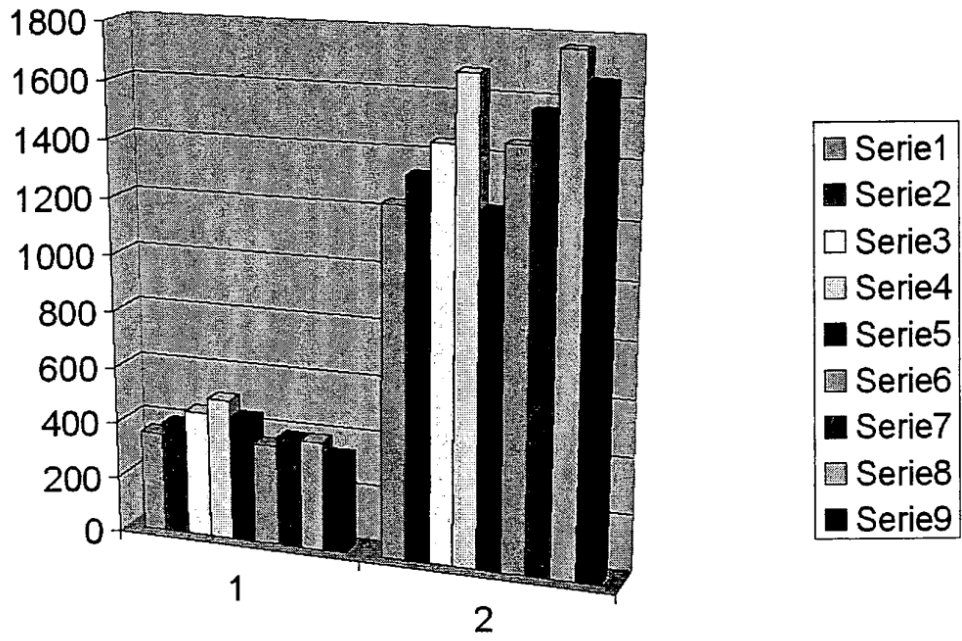


FIG. 11