

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 222**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07D 221/12 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007 E 07751663 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2004843**

54 Título: **Uso de derivados de fenantridio para diferenciar entre células intactas y con membrana comprometida usando técnicas moleculares a base de ácido nucleico**

30 Prioridad:

28.02.2006 US 776927 P

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

14.10.2015

73 Titular/es:

**MONTANA STATE UNIVERSITY (100.0%)
304 MONTANA HALL
BOZEMAN, MT 59717-2460, US**

72 Inventor/es:

**NOCKER, ANDREAS y
CAMPER, ANNE K.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 548 222 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

Uso de derivados de fenantridio para diferenciar entre células intactas y con membrana comprometida usando técnicas moleculares a base de ácido nucleico

5

Antecedentes

La diferenciación de las células vivas y muertas es un reto importante en el diagnóstico microbiano. La actividad metabólica y reproductiva y, en el caso de los microorganismos patógenos, el potencial riesgo para la salud, están limitados a la parte viva de una población microbiana mixta. Mediante citometría de flujo usando tinciones fluorescentes se diferencian cuatro estados fisiológicos: células reproductivamente viables, metabólicamente activa, intactas y permeabilizadas. Dependiendo de las condiciones, todas las etapas, excepto las células permeabilizadas, pueden tener el potencial de recuperación tras reanimación y, por lo tanto, tienen que considerarse potencialmente vivas⁸. Debido a la persistencia relativamente larga del ADN después de la muerte celular en el intervalo de días a 3 semanas^{4,6}, los diagnósticos basados en el ADN tienden a sobrestimar el número de células vivas. El ADN extraído de una muestra se puede originarse a partir de células en cualquiera de los cuatro estados fisiológicos mencionados, incluyendo las células permeabilizadas muertas. Sin embargo, no se desea detectar este último.

10

15

El criterio más importante para diferenciar entre células viables e irreversiblemente dañadas es la integridad de la membrana. La clasificación del ruido derivado de las células con la membrana comprometida ayuda a asignar actividades metabólicas y los riesgos para la salud de la parte intacta y viable de las comunidades bacterianas. Las células vivas con membranas intactas se diferencian por su capacidad para excluir colorantes que se unen al ADN de los que penetran fácilmente en las células muertas o con la membrana comprometida. Este principio se aplica de forma rutinaria a la discriminación microscópica de células muertas-vivas y cada vez más en la citometría de flujo. El colorante impermeable a la membrana más frecuente es el yoduro de propidio.

20

25

En los últimos años, se ha informado que la EMA-PCR es una alternativa fácil de usar para diferenciar, al microscopio o con citometría de flujo, entre células vivas y muertas^{11,13,14}. Este método de diagnóstico, basado en el ADN, combina el uso de un colorante de discriminación de vivos-muertos con la velocidad y la sensibilidad de la PCR en tiempo real. La monoazida de etidio (EMA) es un colorante de intercalación en el ADN con el grupo azida que permite la unión covalente de la sustancia química al ADN tras la exposición a luz visible brillante (máximo de absorbancia a 460 nm). Las células se expusieron a EMA durante 5 minutos de modo que se permitió que el colorante penetrara en las células muertas con paredes/membranas celulares comprometidas y que se uniera a su ADN. La fotólisis de EMA usando luz visible brillante produce un nitreno que puede formar un enlace covalente con el ADN y otras moléculas^{1,2}. Se ha notificado que la reticulación inducida inhibía la amplificación por PCR del ADN de las células muertas. En una publicación reciente se pudo demostrar que la reticulación por EMA del ADN en realidad hizo que el ADN fuera insoluble y llevó a su pérdida, junto con restos de células durante la extracción de ADN genómico¹⁰. La EMA no unida, que permanece libre en solución, se inactiva simultáneamente mediante la reacción con moléculas de agua². La hidroxilamina resultante ya no es capaz de unirse covalentemente al ADN³. El ADN de células viables, protegido de EMA reactiva antes de la exposición a la luz por una pared/membrana celular intacta, por lo tanto no está afectado por la EMA inactivado después de la lisis celular. El tratamiento con EMA de cultivos bacterianos comprendidos por una mezcla de células viables y muertas conduce a la extracción selectiva de ADN de las células muertas. Las especies analizadas fueron *E. coli* 0157:H7¹¹, *Salmonella typhimurium*¹¹, *Listeria monocytogenes*^{11,13,14} y *Campylobacter jejuni*¹³. Sin embargo, estos estudios no investigaron la pérdida selectiva de ADN a partir de células muertas.

30

35

40

45

Aunque esta técnica es prometedora, se encontró que el uso de EMA antes de la extracción de ADN presentaba un inconveniente importante. En el caso de *E. coli* 0157:H7, aunque se eliminó todo el ADN genómico de las células muertas, el tratamiento también tuvo como resultado la pérdida de aproximadamente el 60 % del ADN genómico de las células viables recolectadas en la fase log¹⁰. En este estudio se observó que la EMA también penetra fácilmente en las células viables de otras especies bacterianas, lo que tiene como resultado la pérdida parcial de ADN. La falta de selectividad y de la aplicabilidad general llevó a probar un producto químico alternativo recién desarrollado: monoazida de propidio (PMA). La PMA es idéntica a la PI excepto porque la presencia adicional de un grupo azida permite la reticulación con el ADN tras la exposición a la luz. Dado que el PI es altamente impermeable a la membrana y generalmente excluido de células viables, se ha utilizado ampliamente para identificar las células muertas en las poblaciones mixtas. Al atravesar las membranas celulares comprometidas, el PI se une al ADN por intercalación entre las bases con poca o ninguna secuencia de preferencia y con una estequiometría de una molécula de colorante por 4-5 pares de bases de ADN.¹⁷

50

55

El documento WO01/77379 describe métodos basados en PCR para diferenciar células vivas y muertas, en los que se utilizan sondas de viabilidad, tales como monoazida de etidio, para modificar ácido nucleico en las células muertas, de forma que se inhibe de manera selectiva la amplificación de ácido nucleico a partir de las células muertas.

60

65

La mayor carga de la molécula de PMA (2 cargas positivas en comparación con sólo una en el caso de EMA) y el hecho de que la tinción selectiva de las células no viables con yoduro de propidio (PI) se ha realizado con éxito en

una amplia variedad de tipos de células, dio confianza de que el uso de PMA podría mitigar los inconvenientes observados con EMA.

5 La invención examinó la idoneidad de PMA para eliminar selectivamente la detección del ADN genómico de las células muertas de cultivos bacterianos con porciones definidas de células vivas y muertas. Debido a que esta es una molécula de nuevo desarrollo, la optimización de los métodos era necesaria. El tiempo de exposición a la luz para la unión al ADN y la inactivación simultánea de la PMA libre no unida se optimizó mediante el uso de ADN purificado. La concentración de PMA y el tiempo de incubación se optimizaron con un organismo gramnegativo y uno grampositivo antes de aplicar estos parámetros al estudio de un amplio espectro de diferentes especies bacterianas.

Sumario de la invención

15 La invención comprende un método para limitar el diagnóstico molecular a la parte de una comunidad microbiana con las membranas celulares intactas. Esto se consigue mediante la exposición de una mezcla de células intactas y de membrana comprometida a PMA. En una forma de realización, dicho PMA es fenantridio, dicloruro de 3-amino-8-azido-5-[3-(dietilmetilamonio)propil]-6-fenilo. En otra forma de realización, dicho método comprende aislar el ADN genómico a partir de dicha mezcla. En otra forma de realización, en la que se realiza la PCR utilizando ADN genómico a partir de la mezcla como un molde.

20 La invención también comprende un método de analizar la eficacia del tratamiento con un desinfectante y/o antibiótico, exponer un cultivo de células a un candidato desinfectante y/o antibiótico; exponer adicionalmente dicho cultivo celular a PMA; exponer dicha muestra que contiene PMA -a una fuente de luz; aislar ADN genómico de dicha muestra; y realizar la PCR en dicho ADN aislado, a continuación, comparar los resultados de la PCR entre dichos cultivos tratados desinfectantes con cultivos no tratados.

30 En una forma de realización, el cultivo comprende un organismo del grupo que consiste en *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *Mycobacterium avium*. En otra forma de realización, dicha mezcla de células comprende más de un organismo. En otra forma de realización, dicho método se puede aplicar a una amplia gama de especies bacterianas y cualquier otra célula en la que la perforación de la membrana celular permite la captación del colorante intercalante de ácido nucleico.

35 La invención también comprende un método de analizar un desinfectante y/o antibiótico que comprende exponer un cultivo de células a un candidato desinfectante y/o antibiótico; exponer adicionalmente dicho cultivo celular a PMA; exponer dicho cultivo celular que contiene PMA a una fuente de luz; aislar ARN de dicho cultivo celular; y realizar la PCR-RT en ARN aislado, a continuación, comparar los resultados de la RT-PCR entre dichos cultivos tratados desinfectantes con cultivos no tratados.

40 La invención también comprende un método de perfilado genotípico de una muestra; exponer dicha muestra a PMA; exponer dicha muestra que contiene PMA a una fuente de luz; aislar el ADN genómico de dicha muestra; y realizar la PCR en dicho ADN aislado. En otra forma de realización, se selecciona dicha muestra a partir del grupo que consiste en suelo, agua, aguas residuales, alimentos, productos agrícolas, productos farmacéuticos y cosméticos (en general, cualquier muestra que comprende una mezcla de células potencialmente muertas y vivas). Se cree que el método funciona con cualquier organismo para el que el yoduro de propidio y sus derivados trabajan para evaluar la integridad de la membrana. Esto incluiría células eucariotas y hongos.

Breve descripción de las figuras

50 **Figura 1.** Efecto del aumento del tiempo de exposición a la luz sobre la inhibición de la amplificación por PCR por PMA. Se añadió PMA a concentraciones de 3 y 30 μM a 1 ng/ μl de ADN genómico extraído de *E. coli* 0157:H7, seguido de exposición a la luz hasta 2 minutos. La reducción de la señal se determinó mediante PCRc que detecta diferencias relativas en las copias amplificables *del gen stx1*. Los valores de C_t derivados de las muestras tratadas con PMA se restaron de los correspondientes valores de C_t de muestras idénticas no tratadas con PMA. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes.

55 **Figura 2.** Efecto del aumento del tiempo de exposición a la luz sobre la inactivación con PMA. PMA a concentraciones de 3 y 30 μM se expusieron a la luz hasta 2 minutos antes de la adición del ADN genómico de *E. coli* 0157:H7 (concentración final de 1 ng/ μl). Después de mezclar, la reticulación del resto de PMA activo al ADN se logró con una exposición a la luz adicional de 1 minuto. La reducción de la señal se determinó mediante PCRc que detecta diferencias relativas en las copias amplificables *del gen stx1*. Los valores de C_t derivados de las muestras tratadas con PMA se restaron de los correspondientes valores de C_t de muestras idénticas no tratadas con PMA. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes.

60 **Figura 3.** Efecto del aumento del tiempo de incubación con PMA a diferentes concentraciones de PMA sobre el rendimiento de ADN genómico de *E. coli* 0157:H7 (A) y *Streptococcus sobrinus* (B).vivas y muertas con isopropanol. Las células fueron expuestas a PMA a concentraciones de 3, 30 y 240 μM durante 1, 5 o 15 minutos. El rendimiento de ADN genómico se expresó como un porcentaje de las correspondientes muestras no tratadas con PMA (vivas o muertas). Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones

independientes.

Figura 4. Efecto del tratamiento con PMA sobre el rendimiento de ADN genómico y cuantificación mediante PCR de proporciones definidas de células viables y muertas por calor. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes. (A) Tabla que muestra las proporciones de *E. coli* 0157:H7 viable y muertas con calor. Los números representan volúmenes en μl . (B) ADN genómico de las mezclas no tratadas por PMA (parte superior) y tratadas con PMA (parte inferior) visualizado en un gel de agarosa. (C) Rendimiento de ADN genómico en porcentaje del valor más alto obtenido. El ADN se cuantificó usando un fluorómetro. (D) Valores de C_t del ADN genómico amplificado mostrados como una función del porcentaje de células viables. La PCR se realizó utilizando cebadores específicos del gen *stx1*. (E) Correlación entre el logaritmo natural de las concentraciones de ADN normalizadas y los correspondientes valores de C_t obtenidos a partir de la amplificación de *stx1*. Se indica el valor R^2 de la línea de tendencia lineal.

Figura 5. Comparación de las características de la permeabilidad de la membrana con PMA y EMA y evaluación del ensayo con vivas/muertas con PMA con 9 especies bacterianas mediante microscopía de fluorescencia. (A) Comparación microscópica de la porción de colorante por *E. coli* 0157:H7 vivas y muertas teñidas con combinaciones de SYTO9/PMA y SYTO9/EMA (imágenes combinadas), respectivamente. El color verde indica la captación de tan solo SYTO9, el color rojo indica permeabilidad de la membrana para PMA o EMA. (B) Efecto del tratamiento con PMA y EMA sobre el rendimiento relativo de ADN genómico de células vivas (columnas blancas) y muertas (columnas grises) de 8 especies bacterianas y el examen microscópico de la permeabilidad de la membrana después de la tinción con SYTO9/PMA o SYTO9/EMA. Los rendimientos de ADN medidos en un fluorómetro TBS-380 se muestran en relación con los de las correspondientes muestras no tratadas (definidos como 100 %). El ADN genómico se visualizó además en geles de agarosa. Los colorantes se incubaron a concentraciones de 50 μM durante 5 minutos en la oscuridad antes de la exposición a la luz durante 2 minutos. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes.

Figura 6. Monitorización de la exposición de *Salmonella* a concentraciones crecientes de hipoclorito (en ppm). Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes. (A) Pérdida de la capacidad de cultivo según se determina mediante recuento de placas. C representa células de exposición control a 40 ppm del tiosulfato utilizadas para la decoloración de la muestra con la mayor concentración de hipoclorito. (B) Tubos de matriz de lisis con restos celulares se sedimentados para concentraciones crecientes de hipoclorito después del tratamiento previo con PMA. Lo tubos de matriz de lisis se muestran después de la centrifugación durante 5 minutos a 14.000 g con los restos celulares hacia arriba. (C) ADN genómico de las células no tratadas por PMA (parte superior) o tratadas con PMA (parte inferior) visualizado en un gel de agarosa. (D) Reducción de la señal como se determina mediante PCR de detección de diferencias relativas en las copias del gen de la invasina A (*invA*). Los valores C_t derivados de los cultivos tratados con PMA se restaron de los correspondientes valores C_t para los cultivos no tratados.

Figura 7. Monitorización de la exposición de *Listeria monocytogenes* a concentraciones crecientes de cloruro de benzalconio (en ppm). Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes. (A) Pérdida de la capacidad de cultivo según se determina mediante recuento de placas. (B) Tubos de matriz de lisis con restos celulares se sedimentados para concentraciones crecientes de benzalconio después del tratamiento previo con PMA. Lo tubos de matriz de lisis se muestran después de la centrifugación durante 5 minutos a 14.000 g con los restos celulares hacia arriba. (C) ADN genómico de las células no tratadas por PMA (parte superior) o tratadas con PMA (parte inferior) visualizado en un gel de agarosa. (D) Reducción de la señal como se determina mediante PCR de detección de diferencias relativas en las copias del gen de listeriolisina O (*hly*). Los valores C_t derivados de las alícuotas de cultivos tratados con PMA se restaron de los correspondientes valores C_t para los cultivos no tratados.

Figura 8. Monitorización de la exposición a UV de UV *E. coli* 0157:H7 para periodos de tiempo crecientes. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes. (A) Aumento de los valores de C_t de alícuotas tratadas y no tratadas con PMA determinados por PCR detectando las diferencias relativas en las copias del gen de la toxina de tipo Shiga 1 (*stx1*). (B) ADN genómico de las células no tratadas por PMA (parte superior) y tratadas con PMA (parte inferior) visualizado en un gel de agarosa.

Figura 9. Monitorización de la exposición de *Mycobacterium avium* a diferentes temperaturas durante 15 minutos. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes. (A) Pérdida de la capacidad de cultivo según se determina mediante recuento de placas. (B) Reducción de la señal como se determina mediante PCR de detección de diferencias relativas en las copias del gen de trehalosa sintasa (*treS*). Los valores C_t derivados de las alícuotas de cultivos tratados con PMA se restaron de los correspondientes valores C_t para los cultivos no tratados.

Figura 10. Efecto de PMA sobre los perfiles genotípicos de mezclas bacterianas definidas de aislados bacterianos vivos y muertos de patos de estanques. Los resultados de la búsqueda BLAST de secuencias de ARNr 16S parciales obtenidas de aislados individuales se dan junto con grados de similitud a sus correspondientes vecinos filogenéticos más cercanos. Se mezclaron volúmenes idénticos de alícuotas de cultivos puros no tratados o muertos por isopropanol de acuerdo con el esquema dado. Las mezclas I - VI estaban tratadas con PMA o no, seguido de la extracción de ADN genómico y amplificación de los genes de ARNr 16S parciales. Los perfiles DGGE de productos de PCR obtenidos a partir de mezclas se comparan con las bandas obtenidas a partir de aislados individuales puros.

Figura 11. Análisis de las muestras del afluente WWTP (*Wastewater Treatment Plant*) enriquecidas con 10^7 células *E. coli* 0157:H7 con proporciones crecientes de células vivas. (A) Perfiles de DGGE de las muestras que se sometieron a tratamiento con PMA o no. Los perfiles de genes de ARNr 16S de muestras enriquecidas se

comparan con los correspondientes perfiles de las muestras no enriquecidas. La banda obtenida a partir de un cultivo puro de *E. coli* 0157: H7 sirve como una referencia. (B) Reducción de la señal como se determina mediante PCRc de detección de diferencias relativas en las copias del gen de la toxina de sigla 1 (*stx1*). Los valores de C_t derivados de las muestras enriquecidas tratadas con PMA se restaron de los correspondientes valores de C_t de muestras enriquecidas no tratadas con PMA. La reducción de la señal que se muestra en el presente documento es el promedio de dos ciclos de PCRc utilizando el mismo molde.

Figura 12. Perfiles de DGGE de genes de ARNr 16S parciales amplificados de muestras de lodo aireado, de sedimentos bentónicos y marinos sin y con tratamiento previo con PMA. La flecha indica una diferencia causada por PMA en el perfil del benton de estuarios.

Figura 13. Perfiles de DGGE de genes de ARNr 16S parciales amplificados de una muestra de sedimento de agua no expuesta al calor o calentada a 55 °C durante 15 minutos. Las muestras fueron tratadas con PMA o no antes de la extracción de ADN y la amplificación por PCR. Las flechas indican las diferencias más visibles en los patrones de bandas.

Figura 14. Perfiles de DGGE de genes de ARNr 16S parciales amplificados de una muestra de sedimento de agua no expuesta al calor o calentada a las temperaturas indicadas durante 15 minutos. Todas menos una muestra fueron tratadas con PMA antes de la extracción de ADN y la amplificación por PCR. Las flechas indican bandas que se someten a un cambio visible inducido por la temperatura en la intensidad de los perfiles.

Descripción detallada

Se ha desarrollado un nuevo método para diferenciar entre células vivas y muertas. Consiste en realizar un tratamiento rápido y fácil en una muestra con un nuevo producto químico (monoazida de propidio, PMA) que limita el análisis de diagnóstico a la fracción viva de comunidades mixtas que comprenden células tanto vivas como muertas. Esta diferenciación es esencial, por ejemplo, en el diagnóstico de patógenos microbianos dado que el riesgo potencial de los patógenos normalmente se limita a la porción viva de una comunidad bacteriana. La definición de la diferenciación entre vivas-muertas se basa en la integridad de la membrana, que es un criterio bien aceptado para diferenciar a las células vivas de las muertas: las células con membranas celulares intactas se consideran "vivas" (ya que tienen el potencial de llevar a cabo reacciones metabólicas o de replicarse), las células con membranas comprometidas se consideran "muertas".

Tradicionalmente, la evaluación del riesgo se ha realizado utilizando abordajes basados en métodos de cultivo o recuentos de placas. Cuanto mayor era el recuento de colonias, mayor era el cálculo de patógenos presentes en la muestra original. No obstante, se plantean problemas por los largos tiempos de incubación (en el intervalo de días), lo que hace que este método se inadecuado para la advertencia oportuna y la acción preventiva. Además, recientemente se ha descubierto mediante investigación que algunos organismos pueden, en determinadas circunstancias, perder la capacidad para replicarse a pesar de que todavía son viables. Estas bacterias 'viables pero no cultivables' (VPNC) no pueden detectarse utilizando el cultivo tradicional, pero podrían recuperar su capacidad para crecer si se transfieren a un medio ambiente más apropiado. Estos dos inconvenientes podrían resolverse teóricamente mediante la aplicación de abordajes moleculares basados en la detección de material genético/ADN de estos organismos. Los recientes avances en el diagnóstico molecular permiten a los investigadores analizar la presencia o ausencia de ADN diana en un plazo de horas en lugar de días. Estas técnicas también pueden dirigirse a las bacterias en el estado VPNC. No obstante, uno de los principales inconvenientes es la incapacidad de los métodos basados en ADN para discriminar entre bacterias vivas y muertas. Este problema se ha obstaculizado la aplicación de estos métodos en muchos campos. Debido a la persistencia de ADN después de la muerte celular, la cuantificación basada en el ADN puede conducir a una sobreestimación sustancial del riesgo patogénico o proporcionar resultados falsos positivos. La detección de una versión más lábil de material genético, ARN, superaría este problema ya que el ARN se degrada rápidamente después de la muerte celular, pero la misma inestabilidad tiene como resultado problemas técnicos si se usa como una diana molecular. Sería óptimo combinar la identificación rápida de bacterias usando técnicas moleculares con la capacidad para diferenciar entre organismos vivos y muertos. La presente invención proporciona nuevos productos químicos y métodos para excluir selectivamente ADN de las células muertas de una mezcla que contiene células vivas y muertas de la detección molecular. En otras palabras: la presente invención permite limitar selectivamente los diagnósticos moleculares a la porción de células mixtas que tiene membranas celulares intactas no comprometidas.

La presente invención utiliza derivados de fenantridio (PMA) que son altamente selectivos en lo referente a la penetración únicamente en células bacterianas "muertas" con compromiso de la integridad de la membrana pero no en las células vivas con membranas/paredes celulares intactas.

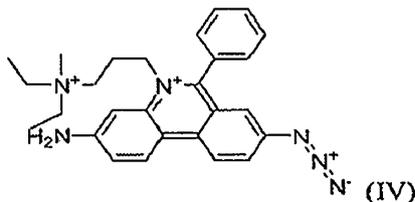
El compuesto puede ser fenantridio, dicloruro de 3-amino-8-azido-5-[3-(dietilmetilamonio)propil]-6-fenilo. Una característica importante de los compuestos utilizados en la presente invención es que puede modificar los ácidos nucleicos como el ADN. Se cree que la naturaleza de esta modificación es reticulación covalente, pero también podría ser de cualquier otra naturaleza que interfiera en la amplificación por PCR de dichos ácidos nucleicos modificados. Esta modificación tiene el potencial también de interferir con otros procesos enzimáticos en los que participa el ADN (o ARN).

Por lo tanto, una forma de realización de la invención comprende un método para diferenciar las células muertas de

las células vivas que comprende exponer una mezcla de células vivas y muertas a PMA o a una sal mono o bis de haluro de la misma.

5 Por tanto, dicha PMA se puede seleccionar del grupo que consiste en yoduro de 3-amino-8-azido-5-(3-dietilmetilamonio)propil)-6-fenilfenantridio, dibromuro de 3-amino-8-azido-5-(3-(dietilmetilamonio)propil)-6-fenilfenantridio y dicloruro de 3-amino-8-azido-5-(3-(dietilmetilamonio)propil)-6-fenilfenantridio.

PMA (monoazida de propidio) se representa mediante la fórmula siguiente:



10

En otra forma de realización, dicho método comprende aislar el ADN genómico a partir de dicha mezcla. En otra forma de realización, se realiza PCR de dicha mezcla. En otra forma de realización, dicho método comprende aislar el a partir de dicha mezcla. En otra forma de realización, la RT-PCR se realiza con dicho ARN aislado.

15

Tras la intercalación en el ADN de las células muertas, el grupo azida fotoinducible permite que la PMA se reticule covalentemente mediante exposición a la luz brillante. Este proceso puede hacer que el ADN sea insoluble y tiene como resultado su pérdida durante la posterior extracción de ADN genómico o el tratamiento con PMA puede dar lugar a una modificación del ADN de las células con membranas comprometidas que se traduce en la inhibición de su amplificación por PCR. Por tanto, someter a una población de células compuesta por células tanto vivas como muertas a tratamiento con PMA tiene como resultado ADN indetectable de las células muertas. La presente invención proporciona pruebas de que el método se puede aplicar a una amplia gama de especies en el reino bacteriano que presentan una gran ventaja sobre la monoazida de etidio (EMA). Aunque recientemente se ha demostrado que el mismo principio general funciona con EMA, su aplicación global se ve obstaculizada por el hecho de que el producto químico también puede penetrar en las células vivas de algunas especies bacterianas. A pesar de las bombas de transporte que exportan activamente la EMA hacia fuera de las células metabólicamente activas, el nivel de EMA restante puede conducir a la pérdida sustancial de ADN de estas células. La mayor carga de PMA podría ser la razón de la impermeabilidad más alta a través de las membranas celulares intactas, lo que evita la pérdida de ADN.

30

La presente invención tiene aplicaciones en todos y cada uno de los métodos, procedimientos y procesos relacionados con el diagnóstico con ADN. Ejemplos de tales aplicaciones incluyen, entre otras, aquellas que implican alimentos, seguridad del agua, bioterrorismo, sustancias medicinales/medicamentos y/o cualquier cosa que implica la detección de patógenos. La presente invención también proporciona métodos de uso de PMA para vigilar la eficacia de la desinfección de patógenos modelo utilizando cloro y tiene importantes aplicaciones en la industria del agua. En la industria alimentaria, la presente invención se puede utilizar para controlar la eficacia de los conservantes. El método se puede aplicar a todos los tipos celulares siempre y cuando una membrana intacta impida que el derivado de fenantridio entre en la célula y siempre y cuando el derivado de fenantridio pueda entrar en células con membranas celulares comprometidas. Dado que se ha demostrado que el yoduro de propidio funciona con células animales, fúngicas y parasitarias, el método de la invención tiene el potencial de aplicarse a todas las células. Aunque las células bacterianas se ilustran en los ejemplos, los métodos de la invención se van a aplicar a otros tipos de células.

35

40

La invención también se puede utilizar para la identificación de sustancias que pueden romper las membranas y/o destruir a las células, por ejemplo, células bacterianas. La identificación de nuevos desinfectantes y/o antibióticos son ahora una prioridad, ya que los organismos de múltiples resistencias han florecido y se han extendido en las instituciones de salud y por los pacientes. Por lo tanto, la invención abarca un método para analizar un desinfectante y/o antibiótico que comprende,

45

- 50 a. exponer un cultivo celular a un candidato desinfectante y/o antibiótico;
- b. exponer adicionalmente dicho cultivo celular a PMA;
- c. exponer dicha muestra que contiene PMA a una fuente de luz;
- d. aislar el ADN genómico de dicha muestra; y
- 55 e. realizar la PCR sobre dicho ADN aislado;

55

a continuación, comparar los resultados de la PCR entre dichos cultivos tratados con desinfectantes con los cultivos no tratados. En una forma de realización, dicho cultivo celular es un cultivo de células bacterianas, cultivo de células fúngicas o cultivo de células animales. La concentración de PMA se puede ajustar de acuerdo con la naturaleza de la muestra (en función del número de células, el tipo de célula, las características de la membrana de las células, la

pureza, la permeabilidad de la muestra para el producto químico, etc.). El tiempo de incubación se puede ajustar de acuerdo con la naturaleza de la muestra (en función del número de células, el tipo de célula, las características de la membrana de las células, la pureza, la permeabilidad de la muestra para el producto químico, etc.). En una forma de realización, se añaden de aproximadamente 20 a aproximadamente 240 μM de PMA a dicho cultivo celular. En otra forma de realización, se añaden aproximadamente 50 μM de PMA a dicho cultivo celular. En otra forma de realización, dicho cultivo celular se expone a PMA durante de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 60 minutos. En otra forma de realización, dicho cultivo celular se expone a PMA durante aproximadamente 5 minutos (o durante algún período de tiempo diferente dependiendo de la naturaleza de la muestra). Cualquier fuente de luz utilizada debería comprender las longitudes de onda que son necesarias para la activación del producto químico. En otra forma de realización, dicha fuente de luz es una lámpara halógena de 650 vatios. En otra forma de realización, la distancia de dicha fuente de luz está en el intervalo de distancia mínima de 100 cm desde dicho cultivo celular. En otra forma de realización, dicho cultivo celular puede comprender un patógeno. En otra forma de realización, dicho cultivo celular comprende un organismo del grupo que consiste en *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y *Mycobacterium avium*. En otra forma de realización, dicho cultivo celular comprende más de un organismo. En otra forma de realización, dichos desinfectante y/o antibióticos compromete la integridad de la membrana.

El método, en combinación con la PCR cuantitativa como una herramienta, puede identificar rápidamente y con éxito el impacto de un desinfectante y/o antibiótico sin tener que gastar tiempo en cultivar las células y esperar a que crezcan. En algunos casos, los organismos pueden tardar días o semanas en cultivarse, y, por lo tanto, puede ser necesario bastante tiempo para ver si la sustancia candidata ha sido capaz de destruir a las células, al igual que los microorganismos. En otros casos, determinados organismos no crecerán en cultivo celular, lo que hace difícil determinar si una sustancia fue eficaz. Por lo tanto, la aplicación de métodos de la invención ahorra tiempo y recursos para la identificación de nuevos desinfectantes y/o antibióticos. El método de la invención ha vigilado con éxito la eficacia de desinfección de hipoclorito, benzalconio y del calor en varios patógenos modelo (véase más adelante).

Además de modificar el ADN, se ha demostrado que la PMA se modifica el ARN. Por lo tanto, una forma de forma de realización de la invención comprende un método de ensayo de un desinfectante que comprende,

- a. exponer un cultivo celular a un candidato desinfectante y/o antibiótico;
- b. exponer adicionalmente dicho cultivo celular a PMA;
- c. exponer dicho cultivo celular que contiene PMA a una fuente de luz;
- d. aislar el ARN del cultivo celular; y
- e. realizar RT-PCR en ARN aislado;

a continuación, comparar los resultados de la RT-PCR entre dichos cultivos tratados con desinfectantes con los cultivos no tratados. En una forma de realización, dicho cultivo celular es un cultivo de células bacterianas, cultivo de células fúngicas o cultivo de células animales.

La concentración de PMA se puede ajustar de acuerdo con la naturaleza de la muestra (en función del número de células, el tipo de célula, las características de la membrana de las células, la pureza, la permeabilidad de la muestra para el producto químico, etc.). En una forma de realización, se añaden de aproximadamente 20 μM a aproximadamente 240 μM de PMA a dicho cultivo celular. En otra forma de realización, se añaden aproximadamente 50 μM de PMA a dicho cultivo celular. El tiempo de incubación se puede ajustar de acuerdo con la naturaleza del cultivo celular (en función del número de células, el tipo de célula, las características de la membrana de las células, la pureza, la permeabilidad de la muestra para el producto químico, etc.). En una forma de realización, dicho cultivo celular se expone a PMA durante de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 60 minutos. En otra forma de realización, dicho cultivo celular se expone a PMA durante aproximadamente 5 minutos (o durante algún período de tiempo diferente dependiendo de la naturaleza de la muestra). Cualquier fuente de luz utilizada debería comprender las longitudes de onda que son necesarias para la activación del producto químico. En una forma de realización, dicha fuente de luz es una lámpara halógena de 650 vatios. En otra forma de realización, la distancia de dicha fuente de luz está en el intervalo de distancia mínima de 100 cm desde dicha muestra. En otra forma de realización, dicho cultivo celular comprende un organismo del grupo que consiste en *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y *Mycobacterium avium*. En otra forma de realización, dicho cultivo celular comprende más de un organismo. En otra forma de realización, dicho desinfectante interrumpe la integridad de la membrana. El método, en combinación con la RT-PCR cuantitativa como una herramienta, puede identificar rápidamente y con éxito un desinfectante y/o antibiótico sin tener que gastar tiempo en cultivar las células y esperar a que crezcan.

Una ventaja de los métodos de acuerdo con la invención es la facilidad de uso. Por ejemplo, mediante el uso de estos métodos, grandes cantidades de muestras pueden analizarse fácilmente para detectar la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Los métodos de acuerdo con la invención se pueden usar de varias maneras. Por ejemplo, las muestras de alimentos (por ejemplo, aves de corral, carne fresca, leche, queso, verduras, frutas, pescado, etc.) pueden analizarse para detectar la presencia de bacterias potencialmente vivas con las membranas celulares intactas. En otra forma de realización, las muestras ambientales pueden analizarse para detectar la presencia de células viables, por ejemplo, bacterias. Estas muestras pueden recogerse, por ejemplo, del suelo o ser

partes de plantas. El método de acuerdo con la invención además puede usarse para analizar aguas residuales tratadas antes y después de la liberación.

5 El método de acuerdo con la invención puede usarse además para el análisis de muestras medicinales, por ejemplo, muestras de heces, cultivos de sangre, esputo, muestras de tejido (también cortes), material de heridas, orina, muestras del tracto respiratorio, implantes y superficies del catéter.

10 Otro campo de aplicación del método de acuerdo con la invención es el control de los productos alimentarios. En otras realizaciones, las muestras de alimentos se obtienen de la leche o de productos lácteos (yogur, queso, queso dulce, mantequilla y suero de leche), agua potable, bebidas (limonadas, cerveza y zumos), productos de panadería o productos cárnicos. El método de la invención puede determinar si los conservantes en los alimentos o el tratamiento antimicrobiano de los alimentos (tal como la pasteurización) han impedido el crecimiento celular. Un campo adicional de aplicación del método de acuerdo con la invención es el análisis de productos farmacéuticos y cosméticos, por ejemplo, pomadas, cremas, tinturas, zumos, soluciones, gotas, etc.

15 Por lo tanto, en otra forma de realización, la invención comprende un método de realización del perfil microbiano de una muestra que comprende,

- 20 a. recoger una muestra;
- b. exponer dicha muestra a PMA;
- c. exponer dicha muestra que contiene PMA a una fuente de luz;
- d. aislar el ADN genómico de dicha muestra; y
- e. realizar la PCR sobre dicho ADN aislado;

25 En otra forma de realización, dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en suelo, agua, aguas residuales, alimentos, productos agrícolas, productos farmacéuticos y cosméticos.

30 La concentración de PMA se puede ajustar de acuerdo con la naturaleza de la muestra (en función del número de células, el tipo de célula, las características de la membrana de las células, la pureza, la permeabilidad de la muestra para el producto químico, etc.). En una forma de realización, se añaden de aproximadamente 20 μM a aproximadamente 240 μM de PMA a dicha muestra. En otra forma de realización, se añaden aproximadamente 50 μM de PMA a dicha muestra. El tiempo de incubación se puede ajustar de acuerdo con la naturaleza de la muestra (en función del número de células, el tipo de célula, las características de la membrana de las células, la pureza, la permeabilidad de la muestra para el producto químico, etc.). En una forma de realización, dicha muestra se expone a PMA durante de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 60 minutos. En otra forma de realización, dicha muestra se expone a PMA durante aproximadamente 5 minutos (o durante algún período de tiempo diferente dependiendo de la naturaleza de la muestra). Cualquier fuente de luz utilizada debería comprender las longitudes de onda que son necesarias para la activación del producto químico. En una forma de realización, dicha fuente de luz es una lámpara halógena de 650 vatios. En otra forma de realización, la distancia de dicha fuente de luz está en el intervalo de distancia mínima de 100 cm desde dicha muestra. En otra forma de realización, dicha muestra comprende un organismo del grupo que consiste en *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y *Mycobacterium avium*. En otra forma de realización, dicha muestra comprende más de un organismo. El método se puede usar para una rápida detección de organismos viables en suelo, agua, aguas residuales, alimentos, productos agrícolas, productos farmacéuticos y cosméticos

45 El método de la invención resuelve el problema de los largos tiempos de incubación (en el intervalo de días), lo que hace que los métodos más antiguos sean inadecuados para la advertencia oportuna y la acción preventiva. Además, los métodos basados en PCR modernos pueden dar falsos positivos (resultado positivo para un organismo aunque el organismo no es viable). Además, recientemente se ha descubierto mediante investigación que algunos organismos pueden, en determinadas circunstancias, perder la capacidad para replicarse a pesar de que todavía son viables. Estas bacterias 'viables pero no cultivables' (VPNC) no pueden detectarse utilizando el cultivo tradicional, pero podrían recuperar su capacidad para crecer si se transfieren a un medio ambiente más apropiado. Estos inconvenientes se resuelven mediante la aplicación de abordajes moleculares basados en la detección de material genético/ADN de estos organismos en combinación con los métodos de la invención. Por lo tanto, los resultados rápidos y precisos en relación con organismos viables es una muestra, por ejemplo, agua contaminada, aguas residuales, alimentos, productos farmacéuticos y/o cosméticos, pueden evitar que los productos contaminados se liberen al público. Los métodos de la invención pueden ahorrar recursos, reduciendo al mínimo los falsos positivos (resultados positivos para un patógeno, aunque el patógeno no sea viable) y análisis rápido de las muestras, en comparación con los métodos actuales que requieren mucho tiempo.

60 Además, el método de la invención puede identificar los miembros potencialmente viables de una comunidad microbiana para estudios ecológicos, la salud de suelos específicos para sistemas agrícolas y/o ecológicos. Tradicionalmente, la identificación de una comunidad bacteriana se ha realizado utilizando abordajes basados en métodos de cultivo o recuentos de placas. Cuanto mayor era el recuento de colonias, mayor era el cálculo de bacterias presentes en la muestra original. No obstante, se plantean problemas por los a veces largos tiempos de incubación (en el intervalo de días), lo que hace que este método sea inadecuado para la obtención de resultados a

tiempo y precisos. Estos inconvenientes se resuelven mediante la aplicación de abordajes moleculares basados en la detección de material genético/ADN de estos organismos con los métodos de la invención.

En otra forma de realización, la invención comprende un método de realización del perfil microbiano de una muestra que comprende,

- 5 a. recoger una muestra;
- b. exponer dicha muestra a PMA;
- c. exponer dicha muestra que contiene PMA a una fuente de luz;
- 10 d. aislar el ARN de dicha muestra; y
- e. realizar RT-PC en dicho ARN aislado.

En otra forma de realización, dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en suelo, agua, aguas residuales, alimentos, productos agrícolas, productos farmacéuticos y cosméticos.

- 15 En otra forma de realización, se añaden de aproximadamente 20 μM a aproximadamente 240 μM de PMA a dicha muestra. En otra forma de realización, se añaden aproximadamente 50 μM de PMA a dicha muestra. En otra forma de realización, dicha muestra se expone a PMA durante de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 20 minutos. En otra forma de realización, dicha muestra se expone a PMA durante aproximadamente 5 minutos. En otra forma de realización, dicha fuente de luz es una lámpara halógena de 650 vatios. En otra forma de realización, dicha
- 20 fuente de luz está de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 100 cm de dicha muestra. En otra forma de realización, dicho cultivo celular comprende un organismo del grupo que consiste en *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y *Mycobacterium avium*.

- 25 Ejemplos no limitantes de bacterias que se pueden usar para analizar desinfectantes y/o antibióticos candidatos y/o para detectar la potencial viabilidad en una muestra usando el método de la invención comprenden: *B. pertussis*, *Leptospira pomona*, *S. paratyphi* A y B, *C. diphtheriae*, *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. feseri* y otras bacterias de gangrena gaseosa, *B. anthracis*, *P. pestis*, *P. multocida*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Hemophilus influenzae*, *Actinomyces* (por ejemplo, Norcardia), *Acinetobacter*, *Bacillaceae* (por ejemplo, *Bacillus anthracis*), *Bacteroides* (por ejemplo, *Bacteroides fragilis*), *Blastomycosis*, *Bordetella*, *Borrelia* (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*), *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Coccidioides*, *Corynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*), *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enterohemorrágica), *Enterobacter* (por ejemplo, *Enterobacter aerogenes*), *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia*, *Yersinia*, *Shigella*), *Erysipelothrix*, *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus influenzae* de tipo B), *Helicobacter*, *Legionella* (por ejemplo, *Legionella pneumophila*), *Leptospira*, *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), *Micoplasma*, *Micobacterias* (por ejemplo, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*), *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae*), *Pasteurellaceae*, *Proteus*, *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), *Rickettsiaceae*, espiroquetas (por ejemplo, *Treponema* spp., *Leptospira* spp., *Borrelia* spp.), *Shigella* spp., meningococos, neumococos y estreptococos (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* y los estreptococos de los Grupos A, B, C), *Ureaplasmas*, *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella haemolytica*, toxoide de *Corynebacterium diphtheriae*, polisacárido de meningococos, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, toxoide de *Clostridium tetani* y *Mycobacterium bovis*. La lista anterior pretende ser ilustrativa y de ningún modo pretende limitar la invención a la detección de dichos organismos bacterianos.
- 30
- 35
- 40

- 45 Una forma de realización para la detección de microorganismos es mediante PCR. Los procedimientos generales para la PCR se enseñan en la patente de EE.UU. N° 4.683.195 (Mullis et al.) y la patente de EE.UU. N° 4.683.202 (Mullis et al.). Sin embargo, las condiciones óptimas de PCR utilizadas para cada reacción de amplificación generalmente se determinan de forma empírica o se estiman con programas informáticos de uso habitual por los expertos en el campo. Una serie de parámetros influyen sobre el éxito de una reacción. Entre ellos se encuentran la temperatura y el tiempo de hibridación, el tiempo de extensión, la concentración de Mg^{2+} , el pH y la concentración
- 50 relativa de los cebadores, moldes y desoxirribonucleótidos. Generalmente, el ácido nucleico molde se desnaturaliza mediante calentamiento hasta al menos aproximadamente 95 °C durante de 1 a 10 minutos antes de la reacción de la polimerasa. Se ejecutan aproximadamente 20-99 ciclos de amplificación utilizando desnaturalización a un intervalo de 90 °C a 96 °C durante de 0,05 a 1 minuto, hibridación a una temperatura comprendida entre 48 °C a 72 °C durante de 0,05 a 2 minutos, y extensión a 68 °C a 75 °C durante al menos 0,1 minutos con un ciclo final óptimo.
- 55 En una forma de realización, una reacción de PCR puede contener aproximadamente 100 ng de ácido nucleico molde, 20 μM de cebadores aguas arriba y aguas abajo, y de 0,05 a 0,5 mm de dNTP de cada clase, y de 0,5 a 5 unidades de ADN polimerasas termoestables disponibles en el mercado.

- 60 Una variación de la PCR convencional es la reacción de PCR con transcripción inversa (RT-PCR), en la que una transcriptasa inversa convierte primero las moléculas de ARN en moléculas de ADNc monocatenarias, que después se emplean como molde para la posterior amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa. El aislamiento del ARN es bien conocido en la técnica. Al llevar a cabo la RT-PCR, la transcriptasa inversa se añade generalmente a la muestra de reacción después de que el ácido nucleico diana se desnaturaliza con calor. Después, la reacción se mantiene a una temperatura adecuada (por ejemplo, de 30-45 °C) durante una cantidad suficiente de tiempo (10-60 minutos) para generar el ADNc molde antes de que se produzcan los ciclos programados de amplificación. Un
- 65 experto en la técnica apreciará que si se desea un resultado cuantitativo, se debe tener cuidado y utilizar un método

que mantenga o controle las copias relativas del ácido nucleico amplificado. Los métodos de amplificación "cuantitativa" son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la PCR cuantitativa puede implicar coamplificar simultáneamente una cantidad conocida de una secuencia de control usando los mismos cebadores. Esto proporciona un patrón interno que puede usarse para calibrar la reacción de PCR.

5 Otra alternativa de la PCR es la PCR cuantitativa (PCRc), la PCRc puede ejecutarse mediante técnicas competitivas que emplean un control interno homólogo que difiere en tamaño de la diana por una pequeña inserción o deleción. Sin embargo, también se puede usar PCR cuantitativa no competitiva y cinética. Combinación de detección por PCR cinética en tiempo real junto con un control homólogo interno que se puede detectar de forma simultánea junto con las secuencias diana.

15 Los cebadores para PCR, RT-PCR y/o PCRc se seleccionan dentro de regiones o bacterias específicas que solo amplificarán una región de ADN que se selecciona de dicho organismo específico. Como alternativa, se seleccionan cebadores que hibridarán y amplificarán una sección de ADN que es común para todos los organismos. La selección y la construcción de cebadores generalmente se conocen en la técnica. En general, un cebador se encuentra en cada extremo de la secuencia a amplificar. Tales cebadores normalmente tendrán entre 10 a 35 nucleótidos de longitud y tienen una longitud preferida de entre 18 a 22 nucleótidos. La secuencia más pequeña que puede amplificarse tiene aproximadamente 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, un cebador directo e inverso, ambos de 20 nucleótidos de longitud, cuya ubicación en las secuencias está separada por al menos 10 nucleótidos). Se pueden amplificar secuencias mucho más largas. Un cebador se denomina "cebador directo" y está situado en el extremo izquierdo de la región a amplificar. El cebador directo es idéntico en secuencia a una región en la cadena superior del ADN (cuando un ADN de cadena doble se representa utilizando la convención, en la que la hebra superior se muestra con la polaridad en la dirección 5' a 3'). La secuencia del cebador directo es tal que hibrida con la hebra del ADN que es complementaria a la cadena superior del ADN. El otro cebador se denomina "cebador inverso" y está situado en el extremo derecho de la región a amplificar. La secuencia del cebador inverso es tal que es complementaria en secuencia a, es decir, es la complementaria inversa de una secuencia en, una región en la cadena superior del ADN. El cebador inverso hibrida con el extremo superior del ADN.

30 Los cebadores para la PCR también deben elegirse según una serie de otras condiciones. Los cebadores para PCR deben ser suficientemente largos (preferiblemente de 10 a 30 nucleótidos de longitud) para minimizar la hibridación a más de una región en el molde. Los cebadores con ciclos largos de una sola base se deben evitar, si es posible. Los cebadores deben tener, preferiblemente, un porcentaje del contenido de G + C de entre 40 y 60 %. Si es posible, el porcentaje del contenido de G + C del extremo 3' del cebador debe ser mayor que el porcentaje del contenido de G + C del extremo 5' del cebador. Los cebadores no deben contener secuencias que pueden hibridarse a otra secuencia dentro del cebador (es decir, palíndromos). Dos cebadores utilizados en la misma reacción de PCR no deben ser capaces de hibridar entre sí. Aunque los cebadores para PCR se eligen preferentemente según las recomendaciones anteriores, no es necesario que los cebadores se ajusten a estas condiciones. Otros cebadores pueden funcionar, pero tienen una menor probabilidad de producir buenos resultados.

40 Los cebadores para PCR que pueden usarse para amplificar el ADN dentro de una secuencia dada se pueden elegir usando uno de un número de programas de ordenador que están disponibles. Tales programas eligen cebadores que son óptimos para la amplificación de una secuencia determinada (es decir, estos programas eligen cebadores según las condiciones establecidas anteriormente, además de otras condiciones que puedan maximizar la funcionalidad de los cebadores para PCR). Un programa de ordenador es el paquete de análisis Genetics Computer Group (GCG recientemente se convirtió en Accelrys) que tiene una rutina para la selección de cebadores para PCR.

50 Los cebadores y las sondas oligonucleotídicos que se describen a continuación se pueden fabricar de numerosas formas. Una manera de hacer estos oligonucleótidos es sintetizarlos utilizando un sintetizador de ácidos nucleicos disponible comercialmente. Existen diversos sintetizadores de este tipo y es bien conocido por los expertos en la técnica.

55 Otra alternativa a la PCR es el ensayo de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos para la detección de dianas de ADN o ARN específicas. Ejemplos no limitantes para la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos son la amplificación por desplazamiento de hebra en tiempo real, la amplificación homogénea por círculo rodante basado en ADN de Phi29 de moldes para la secuenciación de ADN, la amplificación por círculo rodante de secuencias de ADN dúplex asistida por agentes de apertura de PNA o la amplificación isotérmica mediada por bucles de analitos de ADN.

60 El ácido nucleico también puede detectarse por métodos de hibridación. En estos métodos, se puede añadir ácido nucleico marcado a un sustrato que contiene sondas de ácidos nucleicos marcadas o sin marcar. Como alternativa, se puede añadir ácido nucleico marcado o sin marcar a un sustrato que contiene sondas de ácidos nucleicos marcados. Los métodos de hibridación se divulgan en, por ejemplo, Micro Array Analysis, Marc Schena, John Wiley and Sons, Hoboken N.J. 2003.

65 Los métodos de detección de ácidos nucleicos pueden incluir el uso de un marcador. Por ejemplo, los marcadores radiactivos se pueden detectar usando una película fotográfica o *phosphoimager* (para detectar y cuantificar la

incorporación de fosfato radiactivo). Los marcadores fluorescentes pueden detectarse y cuantificarse usando un fotodetector para detectar la luz emitida (véase la patente de EE.UU. N° 5.143.854). Los marcadores enzimáticos se detectan normalmente proporcionando la enzima con un sustrato y midiendo el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato. Los marcadores colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado.

En una forma de realización, las moléculas de ácido nucleico amplificadas se visualizan mediante tinción directa de los productos amplificados con un colorante de intercalación en ácido nucleico. Como es evidente para un experto en la técnica, los colorantes de ejemplo incluyen, entre otros, verde SYBR, azul SYBR, DAPI, yoduro de propidio, Hoeste, oro SYBR y bromuro de etidio. La cantidad de colorantes luminiscentes intercalados en las moléculas de ADN amplificadas es directamente proporcional a la cantidad de los productos amplificados, que puede cuantificarse convenientemente mediante un FluorImager (Molecular Dynamics) u otros dispositivos equivalentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una variación de este enfoque es la electroforesis en gel de los productos amplificados seguida de tinción y visualización del colorante intercalante seleccionado. Como alternativa, se pueden usar sondas de hibridación de oligonucleótidos marcadas (por ejemplo, sondas fluorescentes, tales como sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) y sondas colorimétricas) para detectar la amplificación. Cuando se desee, una amplificación específica de las secuencias del genoma representativas de la entidad biológica que se están analizando puede verificarse mediante secuenciación o demostrando que los productos amplificados tienen el tamaño predicho, exhiben el patrón de digestión de restricción predicho o se hibridan con las secuencias nucleotídicas clonadas correctas.

La invención también comprende kits. Por ejemplo, el kit puede comprender cebadores útiles para amplificar la molécula de ácido nucleico correspondiente a los organismos específicamente o, en general, un derivado de fenantridio (por ejemplo, PMA), tampones y reactivos para el aislamiento de ADN, y reactivos para PCR. El kit también puede incluir oligonucleótido marcado de forma detectable, que hibrida con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido correspondiente a organismos de interés. El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que pueden analizarse y compararse con una muestra de ensayo contenida. Cada componente del kit puede estar contenido dentro de un recipiente individual y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un solo envase, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados usando el kit.

La presente invención se ilustra además con los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse como limitantes. Los contenidos de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud, así como las figuras y el listado de secuencias, se incorporan en el presente documento por referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Las cepas bacterianas utilizadas para este estudio comprenden 4 especies gramnegativas y 5 grampositivas y se enumeran junto con los medios y temperaturas de crecimiento correspondientes de la Tabla 1. Las colonias individuales de placas de agar de raspado normalmente se transfirieron a tubos de cultivo de 50 ml que contenían aproximadamente 10 ml del medio correspondiente. Los cultivos se hicieron crecer hasta la fase logarítmica en un agitador a 180 rpm a la temperatura de crecimiento dada. Para los experimentos que implican PCRc, las densidades ópticas de los cultivos de *E. coli*0157: H7 se ajustaron a una DO₆₀₀ de 1 por dilución con caldo LB.

Condiciones de destrucción. Se mató a las células en alícuotas de 500 µl mediante exposición a isopropanol (concentración final del 70 %) durante 10 minutos. El isopropanol se retiró mediante la recolección de las células por medio de centrifugación a 5000 g durante 5 minutos antes de la resuspensión en 500 µl del medio correspondiente. Como una alternativa al tratamiento con isopropanol, las células de *Mycobacterium avium* y *Micrococcus luteus* murieron por calentamiento durante 15 minutos a 85 °C y 72 °C, respectivamente. Para estudiar el efecto de PMA sobre proporciones definidas de células viables y muertas (Fig. 4) *E. coli*01 57: H7 se mató con calor mediante la exposición a 72 °C durante 15 minutos antes de mezclar en proporciones definidas con células no tratadas. La pérdida de viabilidad se investigó sembrando mediante raspado 5 µl de suspensión sobre las correspondientes placas de agar, seguido de incubación a la temperatura de crecimiento óptima.

Reticulación con PUMA y EMA. La PMA (fenantridio, dicloruro de 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmetilamonio)propil]-6-fenilo; Biotium, Inc., Hayward, California) y la EMA (fenantridio, bromuro de 3-amino-8-azido-5-etil-6-fenilo; Biotium, Inc., Hayward, California) se disolvieron en 20 % de DMSO para crear una concentración madre de 20 mM o diluciones de ella y se almacenó a -20 °C en oscuridad. Se añadió PMA a alícuotas de cultivo de 500 µl a concentraciones finales de 3, 30, 50 o 240 µM. El contenido de DMSO de las diluciones de PMA se eligió de un modo tal que las concentraciones finales de DMSO eran idénticas para las células expuestas. Tras un periodo de incubación de 1 a 15 minutos en la oscuridad con mezclado ocasional, las muestras se expusieron a la luz durante de 5 segundos a 2 minutos usando una fuente de luz halógena de 650 W colocada a 20 cm de los tubos de muestra. Durante la exposición, las muestras se colocaron en hielo para evitar el calentamiento excesivo. Después de la

reticulación fotoinducida, las células se sedimentaron a 5.000 g durante 5 minutos antes del aislamiento del ADN. Después de completados los experimentos de optimización, se añadió PMA a una concentración final de 50 μM y se incubó durante 5 minutos antes de la exposición a la luz durante 2 minutos. Se aplicó la misma concentración (50 μM) y procedimiento a los experimentos con EMA para realizar resultados comparables con los experimentos de PMA.

Aislamiento y cuantificación de ADN. El ADN genómico se extrajo utilizando el kit suelo Qbiogene (Qbiogene, Carlsbad, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lisis celular de cultivos puros se logró mediante batido con esferas usando una máquina FastPrep (Qbiogene) durante 25 segundos a una velocidad ajustada de 4,5 m/s. El ADN se cuantificó utilizando la solución de cuantificación PicoGreen (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregón, EE.UU.) y un fluorómetro TBS-380 (Turner Biosystems Inc., Sunnyvale, CA, EE.UU.) utilizando ADN genómico de *E. coli* O157: H7 como patrón (con un contenido de GC de intervalo medio). Los resultados de cuantificación obtenidos con el fluorómetro se compararon con las intensidades de banda de ADN genómico de alto peso molecular visualizado sobre bromuro de etidio teñido en geles de agarosa al 1 %. De siete a diez por ciento del total de los correspondientes volúmenes del eluato se cargaron en los geles.

PCR cuantitativa. Para la cuantificación relativa del ADN extraído de los cultivos de *E. coli* O157:H7, el gen *stx1* que codifica la toxina similar a Shiga 1 se utilizó como diana genética. Se realizó PCRc en un volumen total de 25 μl que contenía 1 μl de ADN genómico extraído y concentraciones finales de 1 x tampón AmpliTaq GOLD (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) MgCl_2 5,5 mM, 0,3 μM del cebador directo *stx1* (5'-GACTGCAAAGACGTATGTAGATTCG-3'; 16, SEC ID N° 1), 0,3 μM del cebador inverso *stx1* (5'-ATCTATCCCTCTGACATCAACTGG 3'; 16, SEC ID N° 2), 0,15 μM de la sonda *stx1* (5'-TGAATGTCA TICGCTCTG CAATAGGTACTC -3'; 16, SEC ID N° 3) y 2,5 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). La sonda *stx1* tenía 6-FAM como indicador 5' y BHQ1 como el inactivador en 3'. Los parámetros de ciclado fueron: 8 minutos a 95 °C, seguido por 45 ciclos de 20 segundo a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 25 segundos a 72 °C.

La PCRc y el análisis de los datos se realizaron con un SmartCycler 11 (Cepheid, Sunnyvale, CA). Los valores umbral (C_t) del ciclo se calcularon automáticamente mediante el programa informático SmartCycler usando el segundo método derivado.

Análisis estadístico. Las barras de error en los diagramas representan desviaciones estándar de tres repeticiones independientes.

Microscopia de fluorescencia. Las células se tiñeron para microscopia mediante la adición de 1,25 μl del colorante Sot09 (3,34 mM en DMSO; Molecular Probes) en combinación con 1,25 μl de PMA o EMA (ambos 20 mM en DMSO al 20 %; Biotium Inc.) a alícuotas de cultivo de 500 μl . SYTO9 generalmente tiñe todas las bacterias en una población de color verde, mientras que la PMA y la EMA las tiñen de color rojo si los colorantes pueden atravesar las paredes/membranas celulares. Después de mezclar, las muestras se montaron en portaobjetos de microscopio. Cinco minutos después de la adición de los colorantes, se realizaron microfotografías en un microscopio Nikon E800 usando un objetivo con aceite NA de 100x 1,4 NA conjuntos de filtro de fluorescencia FITC y TRITC (ex480/30, DM505, em535/40 y ex546/10, DM575, gem590, respectivamente). El programa informático utilizado para la visualización fue MetaVue, versión 6.1 (Universal Imaging, Downingtown, Pa., EE.UU.).

Ejemplo 2. Optimización de la reticulación con PMA/ADN utilizando ADN puro

Se añadió PMA a una solución de ADN genómico extraído de *E. coli* O157:H7, seguido de exposición a la luz para durante periodos de tiempo crecientes que van desde 0 segundos a 120 segundos. Se usó 1,0 μl de la solución de ADN ngli1 1.0 como molde para la PCR cuantitativa (PCRc) usando cebadores y una sonda dirigida al gen *stx1*. El aumento del tiempo de exposición a la luz condujo ciclos de umbral más alto (valores C_t), lo que significa que eran necesarios más ciclos para detectar una señal por encima del fondo. Este aumento en los valores de C_t indicó un aumento de la inhibición de la amplificación por PCR. La Fig. 1 ilustra la reducción de la señal del ADN tratado con PMA como una función de tiempo de exposición a la luz en comparación con la amplificación del ADN no tratado. El aumento más fuerte de la reducción de la señal se observó hasta 30 segundos de exposición a la luz con aplanamiento de la curva de inhibición con tiempos de exposición más largos. Se observaron tendencias idénticas para las concentraciones de PMA de 3 y 30 μM . El hecho de que la PMA 3 μM conducía a una mayor inhibición de la amplificación por PCR que la PMA 30 μM dependía únicamente de la concentración de Mg^{2+} . Diferentes concentraciones de Mg^{2+} tuvieron un gran impacto sobre los valores de C_t para esta reacción de PCR en particular (datos no mostrados). Las concentraciones de PMA de 60 μM y mayores dieron como resultado la inhibición completa de la reacción de PCR con independencia del tiempo de exposición a la luz (datos no mostrados).

La eficiencia de la fotólisis (es decir, la inactivación de la PMA libre no unida a ADN) se investigó mediante exposición a la luz de soluciones de PMA de 3 y 30 μM para aumentar los periodos de tiempo antes de la adición del ADN. Después de la adición del ADN, la mezcla se expuso a la luz durante otro minuto para lograr la reticulación de la PMA activa restante al ADN, seguido de PCRc. El incremento de los tiempos de inactivación de PMA libre dio como resultado la disminución de la reducción de la señal con respecto a las muestras idénticas sin PMA (Fig. 2). En el caso de 3 μM , un período de inactivación de 120 segundos disminuyó la diferencia entre las muestras que

contienen PMA y que no contienen PMA.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se eligió un tiempo de exposición a luz de 120 segundos para garantizar la unión máxima de PMA al ADN y al mismo tiempo para lograr la inactivación máxima de PMA libre que no se unió al ADN. Esto último es importante en el tratamiento de las células con PMA para asegurarse de que no hay PMA activa en solución, que podría unirse al ADN procedente de células viables después de la etapa de lisis celular.

Ejemplo 3. Optimización del ensayo con PMA usando células

Se eligieron *E. coli* 0157:H7 (como representante de bacteria gramnegativa) y *Streptococcus sobrinus* (como representante de bacteria grampositiva) como organismos modelo para optimizar la concentración de PMA y el tiempo de incubación para el tratamiento de las células. Los cultivos en fase logarítmica se dividieron, sometiéndose una mitad a isopropanol al 70 % que dio como resultado la pérdida completa de viabilidad. La eficacia de la destrucción se examinó mediante siembra en el medio apropiado junto con un control positivo viable. Se añadió PMA a concentraciones finales de 3, 30 o 240 μM . Mientras que 30 μM corresponde a la concentración PI utilizada en el kit de tinción de células vivas-muertas BacLight (Molecular Probes). 240 μM equivale a la concentración de EMA utilizada en estudios previos^{10,11,13,14}. Las Fig.3A y 3B muestran el rendimiento de ADN de las alícuotas de cultivo tratadas con PMA, en relación con el rendimiento de ADN de las correspondientes alícuotas vivas o muertas sin tratar. Aunque 30 y 240 μM eliminaron con eficacia el ADN de las células muertas, todavía había un fondo significativo de ADN con 3 μM . El tiempo de incubación (1, 5 o 15 minutos) no afectó al rendimiento de ADN genómico en gran medida, aunque 15 minutos parecían tener como resultado una pérdida moderada de ADN en el caso de la exposición de *E. coli* 0157:H7 vivas a PMA 240 μM . Para los siguientes experimentos se eligió una concentración de PMA de 50 μM y un tiempo de incubación de 5 minutos.

Ejemplo 4. Efecto de la PMA en proporciones definidas de células viables y muertas

Para aclarar la relación entre la proporción de células viables, el rendimiento de ADN y las señales de la PCRc después de tratamiento con PMA, se usaron mezclas con proporciones definidas de células viables y muertas. Una alícuota de *E. coli* 0157:H7 se sometió a tratamiento térmico a 72 °C durante 15 minutos dando como resultado una disminución de los recuentos de células cultivables a cero. Las células muertas por calor se mezclaron con el cultivo original sin tratar a proporciones definidas, representando las viables cultivables 0, 0,1, 1, 10, 50 y 100 % de las células bacterianas totales, respectivamente (Fig.4A). Considerando que los rendimientos de ADN a partir de mezclas I a VI eran comparables sin tratamiento con PMA, las proporciones crecientes de las células viables sin agresión y viables produjeron un aumento sustancial en el rendimiento del ADN genómico (Fig.4B y 4C) y a la disminución de los valores de C_t en la PCRc (fig.4D) después de la exposición a PMA. El valor de C_t más alto, es decir la reducción de la señal más alta, se observó para la muestra I que contiene sólo *E. coli* 0157: H7 destruida con calor. Un gráfico del logaritmo natural del rendimiento de ADN (en porcentaje del valor más alto) frente a los valores de C_t reveló una correlación lineal con un valor de R^2 de 0,9742 de la línea de tendencia correspondiente (Fig.4E). Esto sugirió que todo el ADN de células vivas parecía ser amplificable.

Ejemplo 5. Comparación entre PMA y EMA y evaluación del ensayo con PMA de vivos/muertos con más especies

La eliminación eficiente de ADN genómico de las células muertas mediante tratamiento con PMA y EMA se ha descrito para *E. coli* 0157:H7 en este y en un estudio previo, respectivamente¹⁰. La diferencia entre los dos productos químicos radica principalmente en su selectividad. Mientras que el tratamiento con EMA de *E. coli* 0157:H7 vivas condujo a una pérdida de más del 60 % del ADN genómico¹⁰, la PMA parece eludir este problema. Los resultados fueron corroborados por observaciones microscópicas utilizando una combinación de los colorantes SYTO9/PMA o SYTO9/EMA (Fig.5A). Se sabe que SYTO9 tiñe todas las células de color verde, tanto células intactas como células con membranas comprometidas. El color verde se mezcla con el color rojo que procede de EMA o PMA cuando las células captan el colorante correspondiente. Las células muertas se tiñeron de color rojo tanto con PMA como con EMA. Las células vivas, por el contrario, mostraron una diferencia en que la exposición de 5 minutos a EMA condujo a tinción de color rojo, mientras que las células estaban todavía de color verde después del tratamiento con PMA. Esto sugiere que las membranas celulares de *E. coli* 0157:H7 intactas pueden excluir de manera eficiente la PMA, pero no la EMA. Esto explica la pérdida de ADN de células vivas después del tratamiento con EMA, mientras que PMA no afecta al rendimiento.

Para examinar aún más la aplicación del método a un espectro más amplio de especies bacterianas, el efecto de PMA (en comparación con EMA) se analizó en células vivas y muertas para las bacterias mostradas en la Tabla 2. Para todas las especies analizadas, la PMA no afectó al rendimiento de ADN de células vivas, mientras que el ADN de las células muertas se retiró de manera eficiente durante el procedimiento de extracción de ADN (Fig.5B). Por otro lado, la EMA era igualmente eficaz en la retirada del ADN de las células muertas, aunque también redujo parcialmente el rendimiento de ADN de las células vivas en comparación con las células tratadas con PMA o no tratadas.

Las células muertas de todas las especies examinadas se tiñeron de forma eficiente de color rojo con PMA o con

EMA (datos no mostrados). Las imágenes microscópicas obtenidas de células vivas tratadas con una combinación de SYTO9/PMA o con una combinación de SYTO9/EMA mostraron que la PMA no penetraba en las células vivas en ninguna de las especies analizadas (Fig.5B). Por otro lado, la EMA pudo penetrar parcialmente en las células tanto muertas como vivas (como se ve con el color rojo), aunque la tinción parecía ser más eficiente en el caso de las células muertas. *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas syringae* eran las especies más resistentes a la captación de EMA. Las células vivas de las especies teñidas con SYTO9/EMA aparecieron de color verde después de 5 minutos.

La presente invención introduce una versión modificada químicamente de yoduro de propidio con un grupo azida añadido al anillo de fenantridina, lo que permite la reticulación química de moléculas orgánicas tras una exposición breve a la luz visible brillante. De forma análoga al PI, la PMA no parece atravesar las membranas de las células vivas, mientras que es captada de forma eficiente por las células permeabilizadas. Una vez dentro de las células, el colorante se intercala en ácidos nucleicos de doble cadena. Tras la unión, la reticulación fotoinducida hace que el ADN sea insoluble y tiene como resultado la pérdida durante el procedimiento de extracción de ADN junto con los restos celulares o el tratamiento de PMA puede tener como resultado una modificación del ADN de las células con membranas comprometidas que se traduce en la inhibición de su amplificación por PCR. En el caso de mezclas de bacterias que contienen células vivas y muertas, el ADN restante de células vivas es susceptible de análisis aguas abajo que incluyen cuantificación, PCR o, posiblemente, análisis de micromatrices.

Aunque el análisis selectivo del ADN de células vivas se describió por primera vez para EMA usando *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni* como organismos modelo^{11,13,14}, la PMA tiene la ventaja sobre EMA en términos de mayor selectividad. Las células vivas de la mayoría de las diversas especies bacterianas analizadas en este estudio se tiñeron de color rojo con EMA usando una concentración de EMA aproximadamente 4,8 veces menor que la utilizada en los estudios anteriores^{11,13,14}. Este hallazgo destaca que, en general, la EMA no puede considerarse que es impermeable a la membrana. Aunque se ha informado de que penetra exclusivamente solo en las células muertas o dañadas^{11,13,14}. Esto puede ser cierto únicamente para especies bacterianas seleccionadas con tiempos de exposición cortos. Los datos presentados en el presente documento son compatibles con los resultados anteriores que muestran que el tratamiento con EMA de células *E. coli* 0157:H7 vivas conduce a una pérdida de más de 60 % del ADN genómico durante el procedimiento de extracción de ADN¹⁰. Además, recientemente se ha demostrado que la EMA es inadecuada para la diferenciación de células vivas-muertas de *Anoxybacillus*¹². Se observó inhibición por PCR después de tratar células viables de *Anoxybacillus* con EMA y la posterior extracción de ADN, lo que indica que el agente ha atravesado la membrana de estas células y se ha reticulado covalentemente con el ADN durante la fotólisis. Como se trata en el presente documento, además, una pérdida significativa de ADN debido al tratamiento con EMA de células vivas para *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium avium* y *Streptococcus sobrinus*.

La captación de EMA por las células vivas es compatible con los estudios que examinan la captación de bromuro de etidio (EB) estructuralmente idéntico en *E. coli* de tipo salvaje. Se demostró que EB también es captado por las células viables aunque la captación neta alcanzó sólo un pequeño porcentaje de la de las células permeabilizadas totalmente⁴. La razón se ve en la actividad de una bomba de eflujo metabólicamente dirigida. Se demostró que los inhibidores metabólicos reducen la actividad de eflujo. La exposición de las células a choque frío (0 grados durante 30 minutos) en presencia de TRIS o EDTA condujo a una captación neta de EB similar a la de las células permeabilizadas totalmente⁴. Por esta razón en los estudios de citometría de flujo se usa EB para identificar bacterias metabólicamente activas que pueden realizar la exclusión activa del producto químico^{8,9}.

Suponiendo el mismo mecanismo para EMA, estos hallazgos podrían explicar la observación de que las células viables de los cultivos en fase logarítmica teñidos de color rojo con EMA. Incluso con la extrusión activa de EMA mediante tales sistemas de exportación, una cantidad considerable de colorante todavía podría permanecer en la célula. Esto explicaría la pérdida significativa de ADN de las células vivas tratadas con EMA en comparación con las células no tratadas o tratadas con PMA. *Salmonella typhimurium* y *Serratia marcescens* parecían ser la única especie de las analizadas que podrían ser sometidas a tratamiento con EMA sin ninguna pérdida de ADN. Las razones de esto podrían ser los mecanismos de eflujo más eficientes o una membrana celular menos permeable. También fueron las especies más resistentes a la tinción con EMA. *Pseudomonas syringae* pareció teñirse muy moderadamente con EMA, lo que se correlaciona con una cierta pérdida de ADN durante la extracción. La permeabilidad de la membrana obviamente variable de diferentes especies, sin embargo, impide una aplicación general de la EMA para la diferenciación de vivas-muertas en diagnósticos microbianos. La PMA parece tener la ventaja importante sobre la EMA de no penetrar en las células vivas. La razón de la selectividad significativamente mayor de PMA está más probablemente asociada con la carga más alta de la molécula (EMA tiene una carga positiva, PMA tiene dos).

La presente invención muestra que la adición del grupo azida a la molécula de PI no cambia sus características de permeabilidad. El PI es el colorante más utilizado para la discriminación microscópica de células vivas-muertas y se ha analizado ampliamente con un amplio espectro de bacterias, incluyendo las utilizadas en este estudio. Se usa más ampliamente en citometría de flujo^{8,9,15}. Vale la pena mencionar que se diferencian 4 estados fisiológicos utilizando tinciones fluorescentes en citometría de flujo: células reproductivamente viables, metabólicamente activas,

intactas y permeabilizadas⁸. Sólo estas últimas, las células permeabilizadas, captan el yoduro de propidio. Además de no tener una membrana celular intacta, estas células se despolarizan y se desenergizan. Se demostró que todas excepto las células permeabilizadas se podrían reanimar en condiciones adecuadas, mientras que las células positivas a PI no se recuperaron⁸. La exclusión del ADN de esta última subpoblación ayudaría a limitar el análisis a las células que tienen el potencial de recuperación.

Ejemplo 6. Material y método para el análisis de los desinfectantes

El objetivo de este estudio era evaluar la aplicabilidad del método de PMA para supervisar la eficacia de destrucción usando diferentes métodos de desinfección. Los cultivos puros de los patógenos humanos comunes *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* 0157: H7 y *Mycobacterium avium* se usaron como organismos modelo. El tratamiento con hipoclorito, cloruro de benzalconio (BAC), UV y el calor se eligieron como los métodos de desinfección típicos. El cloro con su alta capacidad de oxidación es uno de los métodos de desinfección antimicrobiana más utilizados en el procesamiento del agua de bebida y de aguas residuales. También es ampliamente utilizado para la higiene de los alimentos y los entornos de procesamiento de alimentos y de atención médica. Aunque el mecanismo por el cual el cloro ejerce su efecto letal no se ha aclarado completamente, se acepta que la exposición a cloro de las células bacterianas conduce a la perforación de la membrana celular.

Desinfección con hipoclorito. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (aislado del medio ambiente, Departamento de Microbiología de la Universidad Estatal de Montana) se cultivó en caldo Luria Bertani (LB) durante 12 horas a 37 °C en un agitador a 180 rpm. La densidad celular se ajustó a una DO₆₀₀ de 1,0 por dilución con caldo LB antes de recoger las células por centrifugación a 5.000 g durante 7 minutos. Después de retirar el medio, el sedimento celular se resuspendió en un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadieron volúmenes crecientes de una solución madre de hipoclorito de sodio de 1000 ppm (preparada mediante dilución de 4-6 % de NaOCl; Fisher Scientific SS290-1) se añadieron a alícuotas de 500 µl de células resuspendidas en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para conseguir concentraciones finales de entre 5 y 40 ppm. La concentración madre de cloro se midió con un kit de colorímetro digital de cloro (método DPD; LaMotte modelo DC 1100. Chestertown, MD). Se añadieron volúmenes idénticos de una solución madre de tiosulfato de sodio (1.000 ppm) después de una incubación de 15 minutos (dando la vuelta ocasionalmente), lo que tiene como resultado la descloración instantánea antes que recolectar las células (5.000 g, 5 minutos). Se añadieron aproximadamente 40 ppm de tiosulfato a una muestra de control no expuesta a cloro para excluir un efecto sobre la viabilidad mediante este producto químico. El sobrenadante se retiró cuidadosamente antes de aclarar el sedimento celular con 1 ml de PBS. El PBS se retiró cuidadosamente después de otra etapa de centrifugación y las células se resuspendieron en 500 µl de PBS antes de sembrar diluciones seriadas en agar LB (incubación durante la noche 2' a 37 °C) y sometiendo las alícuotas a tratamiento con PMA.

Desinfección con benzalconio. Se cultivó *Listeria monocytogenes* (Departamento de Microbiología, Universidad del Estado de Montana) se cultivó en medio de infusión de cerebro corazón (BHI) durante 12 horas (30 °C, 180 rpm) antes de ajustar la DO₆₀₀ a 1,0 por dilución con medio idéntico. Se añadió una solución madre de cloruro de benzalconio (Acros Organics, Oeel, Bélgica) (5000 ppm) se añadió a partes alícuotas de cultivo de 500 µl para lograr concentraciones finales en el intervalo de entre 15 a 60 ppm. Las células se recolectaron después de 30 minutos de incubación mediante centrifugación (5000 g, 5 minutos). El sobrenadante se retiró cuidadosamente y los sedimentos celulares se resuspendieron en un volumen idéntico de BHI fresco antes de sembrar diluciones seriadas sobre agar BHI y sometiendo a las alícuotas de la muestra a tratamiento con PMA.

Desinfección con UV. Se cultivó *E. coli* 0157: H7 (cepa 932) en medio LB durante 12 horas a 37 °C y se normalizó a una DO₆₀₀ de 1,0. Aproximadamente 15 ml de células se recolectaron mediante centrifugación (5.000 g, 5 minutos) y se resuspendieron en el volumen idéntico de PBS. La suspensión celular se transfirió a una placa Petri desechable DE 25 mm (SIN tapa) y se irradió con luz UV de onda corta (254 nm) usando una lámpara de UV germicida Spectroline 180 (Spectronics Corp., Westbury, NY) colocada a 20 cm por encima del suspensión celular. Se tomaron alícuotas de aproximadamente 500 µl después de aumentar los tiempos de exposición y se colocaron en hielo hasta que se tomó la última muestra antes de sembrar las diluciones en serie sobre agar LB (incubación durante la noche a 37 °C) y tratamiento con PMA.

Para estudiar la integridad de la membrana después de la UV bajo la influencia de cloro residual contenido en agua corriente, las células *E. coli* 0157: H7 (DO₆₀₀ de 1,0, preparado como se ha descrito anteriormente) se expusieron a UV durante 5 minutos. Dos partes alícuotas de 20 ml de suspensión celular (aproximadamente 1,5 x 10⁹ células/ml) se llenaron cada una en una jaula bacteriana estéril (23) sellada con filtros de membrana de 0,1 µm Supor®-100 (Pall, Ann Arbor, MI, EE.UU.) en ambos lados. Las jaulas llenas se sumergieron en un flujo a través del reactor con un volumen total de agua corriente ordinaria de 1,0 litro y con un recambio de agua de 1,0 volumen por hora. La concentración de cloro residual se midió como se ha descrito anteriormente. Se tomaron muestras cada 24 horas durante hasta 120 horas tomadas comenzando en el punto de tiempo cero y se trataron con PMA o no, seguido de la extracción de ADN genómico.

Para estudiar la integridad de la membrana después de la exposición a UV bajo la influencia de calor, una suspensión de *E. coli* 0157: H7 (preparada como antes) se trató con UV durante 5 minutos y se expuso a estrés por

calor a 58 °C en un bloque térmico de laboratorio regular en alícuotas de 0,5 ml. Se tomaron las muestras cada hora desde el punto de tiempo cero hasta 5 horas y se trataron con PMA o no, seguido de extracción de ADN genómico.

5 Desinfección térmica. El complejo de *Mycobacterium avium* (cepa W2001) se cultivó en caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 0,2 % (p/v) de glicerol y 2 % de enriquecimiento de Middlebrook ADC Bacto (Difco) a 37 °C (100 rpm). La DO₆₀₀ se ajustó a 0,3 mediante la dilución con el medio idéntico. Se transfirieron alícuotas del cultivo de 125 µl a tubos de PCR de 0,2 ml y se expusieron a diferentes temperaturas durante 15 minutos usando una máquina de PCR (Eppendorf EP gradiente). Las alícuotas se combinaron para dar volúmenes de 500µl antes del tratamiento con PMA y su posterior procesamiento. Diluciones seriadas de las alícuotas no tratadas con PMA se sembraron en agar Middlebrook 7H10 suplementado con 10 % de OADC (ambos de Difco) y 0,5 % (p/v) de glicerol y se cultivaron durante aproximadamente 10 días a 37 °C.

15 Reticulación con PMA. El PMA (fenantridio, dicloruro de 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmetilamonio)propil]-6-fenilo; Biotium, Inc., Hayward, California) se disolvió en 20 % de DMSO para crear una concentración madre de 20 mM y se almacenó a -20 °C en oscuridad. Se añadieron aproximadamente 1,2 5µl de PMA a alícuotas de cultivo de 500 µl hasta concentraciones finales de 50 µM. Tras un periodo de incubación de 5 minutos en la oscuridad con mezclado ocasional, las muestras se expusieron a la luz durante de 2 segundos a 2 minutos usando una fuente de luz halógena de 650 W colocada a 20 cm de los tubos de muestra. Durante la exposición, las muestras se colocaron en hielo para evitar el calentamiento excesivo. Después de la reticulación fotoinducida, las células se sedimentaron a 20 5.000 g durante 5 minutos antes del aislamiento del ADN.

25 Aislamiento y cuantificación del ADN. El ADN genómico se extrajo utilizando el kit para el suelo Qbiogene (Qbiogene, Carlsbad, CA, EE.UU.). La lisis celular de cultivos puros se logró mediante batido con esferas mediante una máquina FastPrep (Qbiogene) durante 30 segundos a una velocidad ajustada de 5 m/s. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 13.000 g durante 5 minutos, tanto de forma directa después de batir con esferas como después de la adición de 250 µl de solución de PPS (incluida en el kit) al sobrenadante tras el batido con esferas. El ADN se eluyó con un volumen de 120 µl de tampón DES (proporcionado por el kit) y se visualizó con bromuro de etidio teñido con geles de agarosa al 1 %. Aproximadamente un diez por ciento del total de los correspondientes volúmenes del eluato se cargaron en los geles de agarosa.

30 PCR cuantitativa. La PCR cuantitativa relativa y el análisis de los datos se realizaron con un SmartCycler 11 (Cepheid, Sunnyvale, CA). Los valores umbral (C_t) del ciclo se calcularon automáticamente mediante el programa informático SmartCycler usando un umbral de la unidad de fluorescencia 30. Para todos los experimentos, se añadió 1 µl de ADN genómico extraído a 24 µl de la mezcla de PCR que contiene SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y 10 pmol de cada cebador. Los cebadores usados para la cuantificación se dan en la Tabla 1. Para la amplificación de los genes de stx 1 de *E. coli* 0157: H7, la mezcla de 25 µl para PCR se complementó con 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM. Los parámetros del ciclado para la cuantificación de *Salmonella typhimurium* fueron: 9 minutos a 95 °C (activación inicial y desnaturalización de la polimerasa) seguido de 45 ciclos de 20 segundo a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 25 segundos a 72 °C; para *Listeria monocytogenes*: 9 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 20 segundo a 95 °C, 20 segundos a 55 °C y 15 segundos a 72 °C; para *E. coli* 0157:H7: 9 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 20 segundo a 95 °C, 25 segundos a 55 °C y 25 segundos a 72 °C; para *Mycobacterium avium*: 9 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 20 segundos a 60 °C y 20 segundos a 72 °C. Para el análisis de curva de fusión se aumentó la temperatura en incrementos de 0,2 °C desde 60 a 94 °C.

45 **Ejemplo 7. Resultados de la desinfección con hipoclorito**

Las alícuotas de un cultivo de *Salmonella* se sometieron a concentraciones crecientes de hipoclorito. Después de un tiempo de incubación de 15 minutos, el cloro se inactivó mediante la adición de tiosulfato, que tuvo como resultado la decoloración instantánea. Los recuentos de placas sugirieron solo un único menor de concentraciones de hasta 10 ppm (Fig.6A). El aumento de la concentración tuvo como resultado un descenso brusco de los recuentos de colonias con concentraciones de 25 ppm y mayores, lo que tiene como resultado la pérdida completa de capacidad de cultivo. Un control de tiosulfato (con 40 ppm de tiosulfato, pero sin adición de hipoclorito) mostró recuentos de colonias comparables a la muestra sin adición de producto químico, excluyendo un efecto de tiosulfato sobre la capacidad de cultivo. La extracción de ADN genómico de muestras tratadas con PMA mostró un sedimento de residuos celulares cada vez más rojos para aumentar las concentraciones de desinfectante a partir de aproximadamente 25 ppm (Fig.6B). El color rojo más intenso era visible a una concentración de hipoclorito de 40 ppm. El ADN resultante se visualizó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio: El ADN extraído de las células no tratadas con PMA mostró rendimientos similares para todas las muestras, mientras que el tratamiento con PMA tuvo como resultado ADN cada vez menos visible con concentraciones crecientes de hipoclorito (Fig.6C). Esta tendencia se reflejó en la PCRc que detecta diferencias en los números de copias del gen de la invasina A (*invA*). Restando los valores C_t de las alícuotas tratadas con PMA de las correspondientes alícuotas no tratadas se mostró que las concentraciones crecientes de hipoclorito tenían como resultado reducciones de la señal cada vez más fuertes (Fig.6D). La reducción de la señal empezó a ser significativa a una concentración de hipoclorito de 20 ppm. Se observó la reducción de la señal más fuerte de aproximadamente 14 ciclos de amplificación con tratamiento de hipoclorito de 40 ppm.

Estos datos indican que la envoltura celular parece ser un sitio plausible de interacción química¹⁸. La observación de las alteraciones inducidas por cloro hizo de la membrana citoplasmática una posible diana clave¹⁹. Por lo tanto, el cloro tiene un impacto directo sobre la integridad de la membrana celular, de modo que se permite la aplicación del PMA para controlar la desinfección.

5

Ejemplo 8. Resultados de la desinfección con cloruro de benzalconio

El cloruro de benzalconio (BAC) es una mezcla de cloruros de dimetilamonioalquilbencilo de varias longitudes de cadena de alquilo y es un compuesto de amonio cuaternario ampliamente utilizado²⁰. Este biocida sintético se encuentra en muchos productos de limpieza/desinfectantes para el hogar y se utiliza ampliamente para la desinfección de superficies del entorno del procesamiento de carne y productos lácteos en la industria alimentaria, y también como un antiséptico en medicina. Se sabe que los compuestos de amonio cuaternario actúan sobre la permeabilidad general de la membrana y producen fugas citolíticas a bajas concentraciones y la coagulación general en el citoplasma bacteriano a concentraciones altas.

10

15

Listeria monocytogenes se expuso a concentraciones crecientes de BAC durante 30 minutos. Las concentraciones superiores a 30 ppm reducen cada vez la capacidad de cultivo (Fig.7A). No se obtuvieron colonias con concentraciones de benzalconio 55 y 60 ppm. La extracción de ADN genómico de muestras tratadas con PMA dio lugar a sedimentos de restos celulares cada vez más rojos con una concentración creciente de desinfectante (Fig.7B). La pérdida de la capacidad de cultivo se acompañó además por un debilitamiento creciente de bandas de ADN en un gel de agarosa después del tratamiento con PMA y la extracción de ADN, mientras que las intensidades de la banda de ADN de las células no tratadas con PMA no se vieron afectadas por la exposición a BAC (Fig.7C). Simultáneamente, la PCRc que detecta diferencias en los números de copias del gen de la listeriolisina O (*hly*) mostraron una reducción de la señal creciente, al comparar los valores de C_t de las alícuotas no tratadas con PMA y tratadas con PMA (Fig. 7D). La mayor reducción de la señal de aproximadamente 17 ciclos de PCR se obtuvo con BAC 60 ppm.

20

25

Estos datos indican que el tratamiento de *Listeria monocytogenes* con BAC reveló una correlación muy buena entre la pérdida de capacidad de cultivo y la pérdida de integridad de la membrana, medida mediante los recuentos de placas y la reducción de la señal en la PCRc, respectivamente. En contraste con el cloro, ambos indicadores de 'viabilidad' disminuyeron de forma simultánea con la concentración creciente de desinfectante. Esto podría deberse a que el modo de acción de BAC se basa principalmente en el daño a la membrana (tal como la rotura de las interacciones intermoleculares y la disociación de las bicapas de la membrana, de forma que ambos comprometen el control de la permeabilidad e inducen las fugas), mientras que en el caso del cloro, otros múltiples factores no relacionados con membrana podrían contribuir a la muerte celular.

30

35

Ejemplo 9. Resultados de la desinfección por UV

El tratamiento con UV es ampliamente utilizado para la desinfección de agua potable y generalmente se considera que ejerce su acción letal a través de daños en el DNA²¹. Los daños a la membrana podrían, sin embargo, ser una consecuencia indirecta del deterioro de las células en general. Mediante el estudio el efecto del tratamiento con PMA sobre las células expuestas a UV se pretendía arrojar luz sobre el efecto de los rayos UV en la integridad de la membrana y sirvió como una prueba de principio.

40

45

La exposición de *E. coli* 0157:H7 a la luz UV, en las condiciones descritas anteriormente, llevó a una pérdida completa de la capacidad para cultivar en 5 segundos. Este corto tiempo de exposición UV no afectó, sin embargo, a la captación de PMA por estas células (en comparación con las células no expuestas) como indica el color blanco de las células sedimentadas. Los valores de C_t después de tratamiento con PMA se compararon con muestras idénticas, pero no expuestas a UV mediante la detección de diferencias en las copias del gen de la toxina similar a Shiga 1 (*stx1*) (datos no mostrados), eran idénticos. La exposición durante períodos de tiempo más largos tuvo como resultado un aumento de los valores de C_t para las muestras tratadas con PMA y no tratadas con PMA (Fig.8A). Los valores crecientes de C_t se correlacionaron con un aumento del debilitamiento de ADN genómico se visualizaron en un gel de agarosa, de nuevo independiente del tratamiento con PMA (Fig.8B). No se pudo ver mediante inspección visual ADN genómico en el gel para las muestras expuestas a UV durante 30 minutos y tiempos más largos.

50

55

El hecho de que el tratamiento con PMA de las células expuestas no era capaz de diferenciar entre las células cultivables y no cultivables y que el incremento de los valores de C_t con tiempos de exposición crecientes fue independiente del tratamiento con PMA, condujo a la conclusión de que el daño celular fue el resultado de la permeabilidad de la membrana celular. Solo exposiciones largas a UV superiores a 45 minutos tuvieron como resultado una tinción cada vez más roja de células tratadas con PMA y posibles daños a la membrana (datos no mostrados). Sin embargo, dichos tiempos de exposición largos rara vez se aplican en la industria.

60

Para examinar si la exposición a los rayos UV afecta a la integridad de la membrana después de UV en presencia de otros factores de estrés que afectan a las membranas, las células *E. coli* 0157:H7 sin tratar (vivas) y muertas por UV se expusieron agua corriente que contiene una concentración de cloro residual de 0,5 ppm. Se tomaron muestras cada 24 horas durante hasta 120 horas comenzando en el punto de tiempo cero y se trataron con PMA o no. Se

65

observó un aumento lineal en los valores C_t tanto para las células vivas como muertas por UV (datos no mostrados). En ambos casos, el tratamiento con PMA tuvo como resultado diferencias crecientes de los valores de C_t en el tiempo en comparación con las muestras no tratadas con PMA. En el caso de las células no expuestas a UV, esto se correlacionó con una pérdida de capacidad de cultivo. El hecho de que el aumento de la captación de PMA (presumiblemente causada por el daño a la membrana inducido por el cloro) era independiente de la exposición a UV condujo a la conclusión de que en este experimento las membranas de las células muertas por UV no se deterioraron más rápidamente que las de las células no expuestas a UV. Por lo tanto, los inventores analizaron si someter a las células muertas por UV a estrés térmico subletal (58 °C) daría lugar a la rotura de la membrana acelerada en comparación con las células vivas no expuestas a UV. Se tomaron muestras cada hora a partir del punto cero de tiempo de hasta 5 horas. En este experimento, los inventores observaron un aumento inducido por PMA en los valores de C_t para las células muertas por UV en el tiempo, pero no para las células no expuestas a UV (datos no mostrados). La diferencia en los valores de C_t fue moderada con un aumento de aproximadamente 2 ciclos para la muestra calentada durante 5 horas. Este hallazgo se correlacionó con la observación de que los sedimentos de las células muertas por UV se teñían cada vez más de color rojizo manchada por PMA mientras los sedimentos de las células vivas seguían blancas incluso después de 5 horas de exposición al calor.

Considerando que el método de PMA parece ser capaz de detectar los daños en la membrana causados por cloro o por BAC después de la desinfección, el daño celular causado por la radiación UV no se pudo controlar directamente después de la exposición al UV. Esto no es sorprendente teniendo en cuenta que las principales dianas celulares de luz UV-C de onda corta son ácidos nucleicos y no la membrana^{22,23}. Los inventores observaron que solo las exposiciones a UV largas superiores a 45 minutos produjeron una tinción de color rojo de las células, lo que significa que esas células captaron PMA más fácilmente que las células no expuestas a UV. Tales tiempos de exposición prolongados obviamente condujeron a una rotura de la integridad de la membrana que permitió la captación de PMA ya sea como consecuencia directa de la exposición a UV o indirectamente a través de desintegración general de la integridad celular. El resultante aumento de la captación de PMA, sin embargo, no afecta o solo lo hace muy moderadamente a los valores de C_t en comparación con las muestras no tratadas con PMA, ya que la exposición prolongada a rayos UV ya disminuyó la capacidad de amplificación del ADN a un mínimo. Curiosamente, el aumento de los valores de C_t para aumentar los tiempos de exposición a UV se correlacionó con el aumento de la pérdida de fluorescencia del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En contraste con los experimentos de cloro y BAC, el debilitamiento de la intensidad de la banda es muy probablemente debido a daños en el ADN, incluidas roturas y reticulaciones en la cadena. Normalmente, la fluorescencia del bromuro de etidio unido es proporcional a la concentración del ADN dúplex. Se ha informado de que el bromuro de etidio no se une, sin embargo, a los dímeros de pirimidina (cuya formación tiene como resultado cambios conformacionales), bases hidratadas o regiones monocatenarias causadas por la luz UV²⁴. Por lo tanto la acumulación de daño en el ADN impide cada vez más la intercalación de bromuro de etidio en el ADN, lo que conduce a una pérdida de fluorescencia. Este "ensayo de fluorescencia de etidio" se ha establecido para la medición con sensibilidad y convenientemente el daño en el ADN causado por la radiación²⁵. Los mismos factores que disminuyen la fluorescencia del etidio también inhibirían la amplificación por PCR. Para examinar si la exposición a los rayos UV afecta a la integridad de la membrana después de la exposición a UV en presencia de otros factores de estrés que afectan a las membranas, las células de *E. coli* O157: H7 destruidas por UV se compararon con las células no expuestas a UV en cuanto a su resistencia al agua corriente clorada y a temperaturas subletales (58 °C). La exposición al agua corriente en un reactor de flujo continuo produjo daños comparables en la membrana celular para las células tanto expuestas como no expuestas a UV crecientes en el tiempo. Este hallazgo fue sorprendente, ya que se esperaba un deterioro de la membrana más rápido para las células muertas por UV debido a la falta de reparación. La exposición al calor, por otro lado, dio como resultado un aumento de la captación de PMA en el tiempo para las células expuestas a UV en comparación con las células no expuestas a UV. La tinción con rojo de las células fue, sin embargo, únicamente moderada incluso después de 5 horas de exposición al calor. Esta observación se reflejó en una reducción moderada de la señal en la PCRc de aproximadamente 2 ciclos. Aunque estos resultados sugirieron que las células muertas por UV son sorprendentemente resistentes al deterioro de la membrana, esto no excluye la posibilidad de que la combinación simultánea de múltiples factores de estrés después de la exposición a UV podría hacerlos más susceptibles a daños en la membrana debido a la falta de reparación. La permeabilización acelerada de la membrana permitiría la aplicación del método de PMA en el tratamiento posterior a la UV.

Ejemplo 10. Resultados de la desinfección por calor

Por su practicidad se escogió la desinfección térmica. Destruir a las bacterias o reducir la viabilidad bacteriana con temperaturas elevadas podría ser el método de desinfección más antiguo y de aplicación más habitual. En un estudio anterior se ha demostrado que el tratamiento con PMA de las bacterias expuestas a una dosis letal de calor conduce a la pérdida selectiva de señal del ADN de estas células^{26,27}. Con el gradiente de calor en el intervalo de temperaturas de subletales a letales estudiados en el presente documento se pretende aclarar y refinar la sensibilidad del método de PMA.

Someter a *Mycobacterium avium* a estrés térmico creciente durante 15 minutos dio lugar a una pérdida espectacular de capacidad de cultivo de aproximadamente 60 °C (Fig.9A). No se obtuvieron colonias después de la exposición a temperaturas de 70 °C y superiores. Esto se correlacionó bien con un fuerte incremento de la reducción de la señal de PCRc detectando diferencias en el número de copias del gen de la trehalosa sintasa (*treS*) entre 60 °C y 70 °C

(Fig.9B). Las temperaturas superiores a 70 °C no condujeron a ningún incremento adicional significativo de los valores de C_t después del tratamiento con PMA. Los rendimientos del ADN obtenidos a partir de la extracción de ADN eran demasiado bajos como para ser visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (datos no mostrados). La concentración de ADN baja también podría ser la razón por la cual los tubos de la matriz de lisis no mostraron sedimentos de color rojo después de la centrifugación en el caso de las células muertas por calor tratadas con PMA (datos no mostrados).

Los signos daños en las membranas bacterianas por el calor proceden de informes acerca de las fugas inducidas por el calor de sustancias intracelulares y pérdida de lipopolisacáridos. Se ha comunicado que las temperaturas elevadas inducen la formación de ampollas y vesiculación para en la membrana *Escherichia coli*. Este estudio confirma que el calor tiene un efecto directo sobre la permeabilidad de la membrana y permite que el PMA entre en la célula. Se pudo observar una buena correlación entre la pérdida de capacidad de cultivo y la reducción de la señal de PCRc. El cambio más espectacular se produjo en el intervalo de temperaturas entre 60 °C y 70 °C.

Por lo tanto, este estudio muestra que el tratamiento con PMA en combinación con PCRc tiene éxito en el seguimiento de la acción germicida de los desinfectantes que afectan directamente a la permeabilidad de la membrana. Esta tecnología limita de forma eficaz los diagnósticos moleculares basados en el ADN a las células con membranas celulares intactas en lugar de amplificar de forma indiscriminada el ADN de todas las células, incluyendo las células permeabilizadas. El tratamiento con PMA es rápido, simple y fácil de usar, y se puede combinar con los ensayos de detección de ADN aguas abajo establecidos. Además de los métodos de desinfección descritos en el presente documento, la captación de PMA y el seguimiento de la eficacia de destrucción mediante PCRc también se ha aplicado con éxito a las células destruidas por exposición a isopropanol²⁶ No obstante, el método se limita a los desinfectantes que causan daño en la membrana. Aunque la luz UV-C da lugar a una pérdida de capacidad de amplificación (probablemente causada por daños en el ADN), el tratamiento con PMA no afectó a los valores de C_t . Solamente los tiempos de exposición a UV muy largos podrían provocar daños en la membrana y permitir la captación de PMA. Es poco probable que tales tiempos de exposición largos sean relevantes en términos de tratamiento germicida, ya que se puede suponer que la muerte celular se produce a tiempos de exposición mucho más cortos. Sin embargo, se puede suponer que la muerte celular y la pérdida general de la integridad celular a la larga conducen a daños en la membrana, lo que hace que estas células sean susceptibles a la captación de PMA. El potencial de PMA para el seguimiento de otros métodos de desinfección, incluyendo el tratamiento con peróxido de hidrógeno, fenol, aldehídos, tensioactivos, presión física o metales pesados como plata y cobre, y la correlación a con la detección selectiva basada en el cultivo tradicional todavía debe analizarse.

Ejemplo 11. Materiales y Métodos para la detección de células viables en una comunidad bacteriana mixta

Se realizaron cuatro experimentos para estudiar la utilidad del tratamiento con PMA de comunidades bacterianas mixtas que comprenden tanto células intactas como comprometidos en combinación PCR de punto final: (1) Perfiles de mezclas definidas de células vivas y destruidas por isopropanol a partir de cultivos puros de aislados del medio ambiente al azar; (2) Perfiles de una muestra del afluente de una planta de tratamiento de aguas residuales enriquecida con relaciones definidas de células vivas y muertas; (3) Perfiles de comunidades ambientales seleccionadas y (4) Perfiles de una muestra de sedimentos de agua expuesta a estrés por calor creciente. Las regiones de los genes de ARNr 16S se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico y los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel en gradiente desnaturante (DGGE).

Mezclas definidas de aislados ambientales bacterianos. Las muestras de agua del estanque de patos de la Universidad Estatal de Montana se diluyeron 10 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se extendieron sobre placas de agar de soja tríptico (TSA). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días. Las colonias escogidas aleatoriamente se volvieron a sembrar. Las colonias individuales se cultivaron en caldo de soja tríptico (TSB) en un agitador a 180 rpm a temperatura ambiente para obtener cultivos puros. Estos se identificaron más tarde mediante secuenciación de los genes del ARNr 16S clonados. Las densidades ópticas se ajustaron a una DO_{600} de 1 por dilución con TSB. Se mató a las células en alícuotas de 500 μ l mediante exposición a isopropanol (concentración final del 70 %) durante 10 minutos. El isopropanol se retiró mediante la recolección de células por medio de centrifugación a 5.000 xg durante 5 minutos y la eliminación de sobrenadante. Los sedimentos de las células muertas se resuspendieron en 500 μ l de PBS. Las alícuotas de 125 μ l de las células no tratadas o expuestas a isopropanol de las diferentes especies se mezclaron conforme a la Figura 10 para dar un volumen final de 500 μ l.

Enriquecimiento de una muestra afluente de WWTP con proporciones definidas de células *E. coli* 0157: H7 vivas y muertas. Se recogieron muestras de afluente de aguas residuales se recogieron en la planta de tratamiento de aguas residuales (WWTP, *Bozeman Wastewater Treatment Plant*) en Bozeman en alícuotas de 100 ml. Las bacterias se recolectaron de las aguas residuales mediante centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó por decantación y pipeteado, dejando los últimos 7 ml. Después de la resuspensión, alícuotas de 434 μ l se distribuyeron en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml para su posterior enriquecimiento. *Escherichia coli* 0157:H7 (cepa 932) se cultivó hasta la fase logarítmica en medio Luriani-Bertani (LB) a 37 °C en un agitador a 280 rpm. El cultivo se diluyó hasta una DO_{600} de 1 por dilución con LB. Las células se recolectaron mediante centrifugación y se resuspendieron en PBS. Las alícuotas de 500 μ l en tubos de microcentrifuga murieron

obtenidos de la amplificación de cada aislado de estanque de pato individual se separaron en geles de agarosa al 0,8 %, seguido de escisión de las bandas de aproximadamente 1400 pb de longitud. El ADN fue purificado utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN, Valencia, Calif.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Productos de ADN se clonaron utilizando un kit de clonación TOPOTA[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mezclas de unión se utilizaron para transformar las células *E. coli* TOP 10 competentes (suministradas con el kit de clonación). Los recombinantes se seleccionaron mediante el uso de placas de agarosa con LB que contenían 50 µg de kanamicina ml⁻¹. Los transformantes de *E. coli* que llevan plásmidos con insertos de ADNr 16S se cultivaron durante la noche en caldo LB con 50 µg de kanamicina ml⁻¹. El ADN plásmido se aisló utilizando un kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en el Genomics Technology Support Facility (Michigan State University, East Lansing, MI, EE.UU.) con el cebador M13F-20 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' SEC ID N° 17). Se introdujeron secuencias de aproximadamente 700 bases en el programa de búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con el fin de obtener secuencias filogenéticas estrechamente relacionadas.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante: Se analizaron 100-150 ng de productos de PCR mediante DGGE. Los geles tenían un 8 % de poliacrilamida y un gradiente de desnaturalización de 30 % a 70 %, en el que el 100 % desnaturalizante se define como urea 7 M y 40 % de formamida (todos los reactivos procedían de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). La electroforesis se llevó a cabo a 60 V durante 16 horas utilizando un sistema DCode (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Los geles se tiñeron con SybrGold (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón, EE.UU.) y se documentaron usando un generador de imágenes de fluorescencia FluorChem 8800 (Alpha Innotech, Inc., San Leandro, CA, EE.UU.).

PCR cuantitativa. Para la cuantificación relativa de *E. coli* 0157: H7 utilizada para enriquecer una muestra de agua residual se añadió 1 µl de ADN genómico extraído a 24 µl de mezcla de PCR que contiene 1 x Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), 10 pmol de cebadores directos stx I (5'-GACTGCAAAGACGTATGTAGATTCG-3'; SEC ID N° 1) y el cebador inverso stx 1 (5'-ATCTATCCCTCTGACATCAACTGC-3'; SEC ID NO 2) y 1,5 mM de MgCl₂ (además del MgCl₂ contenido en la mezcla maestra). La PCR cuantitativa y el análisis de los datos se realizaron con un SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, CA). Los valores umbral (C_t) del ciclo se calcularon automáticamente mediante el programa informático SmartCycler usando un umbral de la unidad de fluorescencia 30. Los parámetros de ciclado fueron: 9 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 25 segundos a 55 °C y 25 segundos a 72 °C. Para el análisis de curva de fusión se aumentó la temperatura en incrementos de 0,2 °C desde 60 a 94 °C.

Ejemplo 12. Perfiles de mezclas definidas de aislados ambientales vivos y destruidos con isopropanol.

Se eligieron al azar cuatro aislados bacterianos de un estanque de patos y cultivaron. La secuenciación parcial del los genes de ARNr 16S clonados permitió la identificación de los vecinos filogenéticos más cercanos (Fig.10). Se mezclaron volúmenes idénticos de cultivos puros no tratados o destruidos con isopropanol en proporciones definidas de acuerdo con el esquema de pipeteo mostrado en la Figura 10. Mientras que la mezcla I contenía solamente células vivas no tratadas, la mezcla II células solo comprendía células muertas. Las mezclas restantes comprendían tres especies vivas y una especie muerta cada una. Los perfiles de DGGE obtenidos de los productos parciales de PCR del gen de ARNr 16S para las mezclas I – VI no tratadas con PMA tenían cuatro bandas dominantes que reflejan los cuatro aislados. El tratamiento con PMA dio lugar a la supresión de las bandas de los aislados destruidos con isopropanol: Mientras que la mezcla I (solo células vivas) todavía produjo cuatro bandas dominantes, la mezcla II (solo células muertas) no produjo ninguna banda. El tratamiento con PMA de las mezclas III-VI produjo tres bandas dominantes que representan las tres especies vivas.

Ejemplo 13. Perfilado de una muestra de afluente a la WWTP enriquecida relaciones definidas de células vivas y muertas.

Las alícuotas idénticas de una muestra de afluente de la WWTP se enriquecieron con 10⁷ células del patógeno humano *E. coli* 0157: H7 (sin tratar o muertas por calor), Aunque el número total de células *E. coli* 0157: H7 fue constante, los picos comprendían una proporción creciente de células vivas que van desde 0 a 100 %. Los perfiles de DGGE de los genes de ARNr 16S amplificados se muestran en la Fig.11A La huella de la comunidad de la muestra de afluente de WWTP mostró seis bandas prominentes y no se vio afectada por el tratamiento con PMA. Cada muestra enriquecida sin tratamiento con PMA mostró una banda adicional idéntica en longitud a la banda derivada de un cultivo de células *E. coli* 0157:H7 puras. Las intensidades de la banda fueron comparables con independencia del porcentaje de células vivas. El tratamiento con PMA llevó a una eliminación de la señal de *E. coli* 0157: H7 para las muestras enriquecidas con 0, 0,1 y 1 % de células vivas. Para la muestra tratada con PMA enriquecida con un 10 % de células vivas, se hizo visible una débil una banda del pico. La intensidad de la banda de esta señal del patógeno se hizo cada vez más fuerte para las muestras enriquecidas con 50 y 100 % de células vivas. La intensidad de la banda de *E. coli* 0157: H7 de la muestra tratada con PMA solo enriquecida con células vivas fue comparable a las intensidades de las bandas correspondientes en las muestras no tratadas con PMA.

El aumento de la visibilidad de la banda DEL patógeno con proporciones crecientes de células vivas en DOGE después del tratamiento con PMA se correlacionó con los datos obtenidos de LA PCR cuantitativa para detectar

LAS diferencias relativas en el número de copias del gen de la toxina Shiga 1 (*stx1*) (Fig.11B). Los valores de C_i obtenidos de las muestras enriquecidas tratadas con PMA se restaron de los correspondientes valores de C_i de muestras enriquecidas no tratadas con PMA. Los valores negativos obtenidos se denominan 'reducción de la señal'. La reducción de la señal fue más fuerte con -12,7 ciclos para la muestra enriquecida solamente con células muertas. El aumento de la proporción de células vivas dio como resultado una disminución de la reducción de la señal de PCRc. Para la muestra enriquecida con solo células vivas, la reducción de la señal fue mínima (-0,3 ciclos), lo que significa que el tratamiento con PMA solo tuvo un efecto mínimo sobre la cuantificación de las copias del gen *stx1*.

Ejemplo 14. Perfilado de comunidades microbianas del medio ambiente seleccionadas

Los resultados de los experimentos anteriores nos animaron a estudiar el efecto del tratamiento con PMA sobre las muestras ambientales naturales. Se eligieron tres comunidades diversas: (1) Una muestra de una cuenca de lodo aireado de una planta de tratamiento de aguas residuales, (2) una muestra de benton de estuario y (3) una muestra de sedimento marino. Las muestras se trataron con PMA o no. Los perfiles de DGGE basados en el gen de ARNr 16S se muestran en la Fig. 12. El tratamiento con PMA no cambió visiblemente los perfiles de la comunidad de la muestra de lodo aireado o de sedimento marino, pero había una diferencia pronunciada en la muestra de estuario con una banda prominente en la muestra no tratada con PMA que aparecía significativamente más débil en la muestra tratada con PMA.

Ejemplo 15. Perfilado de una muestra de sedimento DE depósito de agua expuesta a estrés creciente.

Se eligió una muestra de sedimento de depósito de agua para estudiar si la exposición al estrés térmico afectaría a los perfiles DGGE de la comunidad. Las alícuotas de la muestra se expusieron a 55 °C durante 15 minutos y se trataron con PMA o no. Los perfiles de DGGE resultantes se compararon con los de las correspondientes muestras no calentadas (Fig.13). Aunque el PMA no afectó a la huella de la muestra no calentada, tuvo como resultado la pérdida de algunas bandas en la muestra expuesta al calor. Para solidificar este hallazgo, otra muestra de sedimento de agua se expuso a un gradiente de calor en el intervalo de entre 45 y 60 °C (durante 15 minutos cada uno) seguido de tratamiento con PMA. La exposición a 45 °C no afectó al perfil de DGGE en comparación con la muestra tratada con PMA tratada o no tratada con PMA no calentada. Sin embargo, el aumento de las temperaturas tuvo como resultado la pérdida creciente de las bandas de DGGE.

Los experimentos anteriores demuestran que el tratamiento con PMA puede suprimir de manera eficiente las señales de las células muertas en mezclas definidas o en una muestra ambiental enriquecida con mezclas definidas de células vivas y muertas. También es fundamental tener en cuenta que el tratamiento con PMA de las muestras podría ser una buena manera de excluir del análisis a las células con la membrana comprometida. Como se ha indicado anteriormente, limitar el análisis a las células intactas sería un paso hacia adelante en el análisis de la fracción más relevante de toda la comunidad.

Resumiendo lo anterior; la presente invención proporciona nuevos productos químicos que permiten la retirada del ADN genómico de las células con las membranas celulares comprometidas. El rápido y fácil de realizar tratamiento previo de una población bacteriana antes de la extracción de ADN es compatible con otros análisis aguas abajo. Aunque su aplicación a muestras "del mundo real" todavía requiere una evaluación adicional, el método podría tener un gran impacto en los diagnósticos basados en el ADN en varios campos, incluyendo el diagnóstico de patógenos, el bioterrorismo y la ecología microbiana.

La descripción detallada anterior se ha dado para claridad de comprensión únicamente y no debe entenderse que hay limitaciones innecesarias de la misma, ya que las modificaciones serán obvias para los expertos en la técnica. No es una admisión de que cualquier información proporcionada en el presente documento es técnica anterior o pertinente a las invenciones reivindicadas en el presente documento o de que cualquier publicación específica o implícitamente citada es técnica anterior.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente invención pertenece entiende habitualmente.

Referencias

1. Coffman, G.L., Gaubatz, J.W., Yielding, K.L. y Yielding, L.W. Demonstration of specific high affinity binding sites in plasmid DNA by photoaffinity labeling with ethidium analog. J. Biol. Chem. 257, 13205-13297 (1982).
2. DeTraglia, M.C., Brand, J.S. y Tometski, A.M. Characterization of azidobenzamides as photoaffinity labeling for trypsin. J. Biol. Chem. 253, 1846 (1978).
3. Jemaes, M.W., y Steen, H.B. Staining of Escherichia coli for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. Cytometry 17, 302-309 (1994).
4. Josephson, K.L., Gerba, C.P. y Pepper, I.L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial

- pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3513-3515 (1993).
- 5 5. Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R. y Barer, M.R. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 169-187 (1998).
- 10 6. Masters, C.I., Shallcross, J.A. y Mackey, B.M. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Applied. Bacteriol.* 77, 73-79 (1994).
- 15 7. Morris, C. E. et al. The Relationship of Host Range, Physiology, and Genotype to Virulence on Cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from Cantaloupe Blight Epidemics in France. *Phytopathology* 90,636-646 (2000).
- 20 8. Nebe-von-Caron, G., Stephens, P.J., Hewitt, C.J., Powell, J.R. y Badley, R.A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol Methods* 42, 97-114 (2000).
- 25 9. Nebe-von Caron, G., Stephens, P. y Badley, R.A. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *J. Appl. Microbiol.* 84, 988-998 (1998).
- 30 10. Nocker, A. y Camper, A.K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press, scheduled for March 2006, vol. 72, issue 3 (2006).
- 35 11. Nogva, H.K, Dromtorp, S.M., Nissen, H. y Rudi, K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques* 810, 812-813 (2003).
- 40 12. Rueckert, A., Ronimus, R.S. y Morgan, H.W. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1246-1255 (2005).
- 45 13. Rudi, K., Moen, B., Drømtorp, S.M. y Holck, A.L. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Envir. Microbiol.* 71, 1018-1024 (2005).
- 50 14. Rudi, K., Naterstad, K., Drømtorp, S.M. y Holo, H. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 301-306 (2005).
- 55 15. Shapiro, H.M., & Nebe-von-Caron, G. Multiparameter flow cytometry of bacteria. *Methods Mol Biol.* 263, 33-44 (2004).
- 60 16. Sharma, V.K, y Dean-Nystrom, E.A. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Veterin. Microbiol.* 93, 247-260 (2003).
- 65 17. Waring, M.J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13, 269-282 (1965).
18. Camper, A. K., y McFeters, G. A. Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 633-641 (1979).
19. Venkobachar, C., Iyengar, L., Rao, A., Mechanism of disinfection: effect of chlorine on cell membrane functions. *Water Res.* 11, 727-729 (1977).
20. Adair, F. W., Gefitic, S. G., Gelzer, J., Resistance of *Pseudomonas* to Quaternary Ammonium Compounds. I. Growth in Benzalkonium Chloride Solution. *Appl. Environ. Microbiol* 18,299-302(1969).
21. Masters, C. L, Shallcross, J. A., Mackey. B. M., Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Applied. Bacteriol.* 77, 73-79 (1994).
22. Douki T., & Cadet, J., UV and nucleic acids. In *Interface Between Chemistry and Biochemistry* (Edited by H. Jörnvall and P. Jollès), pp. 173-197. Birkhäuser, Basel (1995).
23. Moan J., & Peak, M. J., Effects of UV radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. Biol. B.* 4,21-34 (1989).
24. Shaunivan, L. L., Delbaere, L. T. J., Lee, J. S., Gamma and Ultraviolet Radiation Cause DNA Crosslinking in the Presence of Metal Ions at High pH. *Photochemistry and Photobiology* 73, 579-584 (2001).

25. Morgan A. R., Lee, J. S., Pulleyblank, D. E., Murray. N. L, Evans, D. H., Review: ethidium fluorescence assays. Part 1. Physicochemical studies. *Nucleic Acid Res.* 7,547-569 (1979).

5 26. Nocker, A., y Camper, A. K., Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1997-2004 (2006).

10 27. Nocker, A, Cheung, CY, y Camper, A.K, Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods* 67, 310-320 (2006).

Tabla 1. Especies bacterianas y condiciones de crecimiento

Especie	Medio de crecimiento	Temperatura de crecimiento	Cepa/Origen
<i>E. coli</i> 0157:H7	Luria Bertani	37 °C	Cepa 932
<i>Listeria monocytogenes</i>	Infusión de cerebro corazón	30 °C	Dept. de Microbiología de MSU.
<i>Micrococcus luteus</i>	Infusión de cerebro corazón	30 °C	Dept. de Microbiología de MSU.
<i>Mycobacterium avium</i>	Caldo 7H9-OADC	37 °C	Cepa W2001
<i>Pseudomonas syringae</i>	B de King	22 °C	Cepa CC94, Tam-et-Garonee/ Francia (Morris et al. 2000)
<i>Salmonella typhimarium</i>	Luria Bertani	30 °C	Dept. de Microbiología de MSU.
<i>Serratia marcescens</i>	Infusión de cerebro corazón	25 °C	Dept. de Microbiología de MSU.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo triptico de soja	37 °C	ATCC 25923
<i>Streptococcus sobrimus</i>	Infusión de cerebro corazón	37 °C	ATCC 27607

Tabla 2: Dianas génicas y cebadores usados para la cuantificación relativa de ADN genómico de células bacterianas.

Cepa	Gen diana	Nombre y secuencia del cebador	Longitud producto	Referencia
Salmonella sp	invA	invA2-F ATTCTGGTACTAATGGTGATGATC (SEC ID N° 4)	288 pb	Fey <i>et al.</i> 2004
	invA	invA2-F CCAGGCTATCGCCAATAAC (SEC ID N° 5)		
Listeria sp.	hly	lysA-F GGGAAATCTGTCTCAGGTGATGT (SEC ID N° 6)	106 pb	Guilbaud <i>et al.</i> 2005
	hly	lysA-R CGATGATTTGAACTTCATCTTTTGC (SEC ID N° 7)		
E. coli 0157:H7	stxI	stxI-F ACTGCAAAGACGATGTAGATTTCG (SEC ID N° 8)	150 pb	Sharma/Nystrom2003
	stxI	stxI-R ATCTATCCCTCTGACATCAACTGC (SEC ID N° 9)		
Mycobacterium sp.	treS	treS-F TACGACACCAOCCACCACTA (SEC ID N° 10)	174 pb	Geier, 2006
	treS	treS-R CGTGATCGTCAGAGTCGATG (SEC ID N° 11)		

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Montana State University

<120> USO DE DERIVADOS DE FENANTRIDIO PARA DIFERENCIAR ENTRE CÉLULAS INTACTAS Y CON MEMBRANA COMPROMETIDA USANDO TÉCNICAS MOLECULARES A BASE DE ÁCIDO NUCLEICO

10 <130> MONT-049/01WO

<150> US 60/776.927
<151> 28-02-2006

15 <160> 17

<170> Patent In versión 3.4

20 <210> 1
<211> 25
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

25 <400> 1
gactgcaaag acgtatgtag attcg 25

30 <210> 2
<211> 24
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 2
atctatccct ctgacatcaa ctgc 24

35 <210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

40 <400> 3
tgaatgcat tcgctctgca ataggctactc 30

45 <210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> *Salmonella typhimurium*

50 <400> 4
attctggtac taatggtgat gate 24

55 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> *Salmonella typhimurium*

60 <400> 5
gccaggctat cgccaataac 20

65 <210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 6
gggaaatctg tctcaggatga tgt 23

<210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Listeria monocytogenes*
 5
 <400> 7
 cgatgattg aactcatct ttgc 25
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 10
 <400> 8
 actgcaaaga cgtatgtaga ttcg 24
 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 20
 <400> 9
 atctatccct ctgacatcaa ctgc 24
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium*
 25
 <400> 10
 tacgacacca ccgaccacta 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium*
 35
 <400> 11
 cgtgatcgtc agagtcatg 20
 <210> 12
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 40
 <400> 12
 atggctgtcg tcagct
 <210> 13
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 45
 <400> 13
 acgggcggtg tgtac 15
 <210> 14
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> cebador de PCR dirigido a plásmidos que contienen una región pinza GC diseñada para potenciar la
 hibridación.
 65
 <400> 14

ES 2 548 222 T3

cgcccggcgc gcccgcgccc cggcccgcgc ccccggcccc 40

5 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

10 <400> 15
agagtttgat cctggctcag 20

15 <210> 16
<211> 16
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

20 <400> 16
acggggcggt ggttac 16

25 <210> 17
<211> 16
<212> ADN
<213> Fago M13 de *Enterobacteria*

<400> 17
gtaaacgac ggccag 16

REIVINDICACIONES

1. Un método para diferenciar las células muertas de las células vivas que comprende exponer una mezcla de células vivas y muertas a monoazida de propidio (PMA).
- 5 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende aislar ADN genómico de dicha mezcla.
3. El método de la reivindicación 1, en el que en dicha mezcla se realiza una PCR.
- 10 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende aislar ARN de dicha mezcla.
5. El método de la reivindicación 3, en el que en dicho ARN aislado se realiza una RT-PCR.
- 15 6. Un método de analizar un desinfectante y/o un antibiótico, que comprende
- a. exponer un cultivo celular a un candidato desinfectante y/o antibiótico;
 - b. exponer adicionalmente dicho cultivo celular a PMA;
 - c. exponer dicha muestra que contiene PMA a una fuente de luz;
 - d. aislar el ADN genómico de dicha muestra; y
 - 20 e. realizar una PCR sobre dicho ADN aislado;
- a continuación, comparar los resultados de la PCR entre dichos cultivos tratados con desinfectante y los cultivos no tratados.
- 25 7. Un método de analizar un desinfectante y/o un antibiótico, que comprende
- a. exponer un cultivo celular a un desinfectante y/o un antibiótico candidatos;
 - b. exponer adicionalmente dicho cultivo celular a PMA;
 - c. exponer dicho cultivo celular que contiene PMA a una fuente de luz;
 - 30 d. aislar el ARN del cultivo celular; y
 - e. realizar RT-PC en ARN aislado;
- a continuación, comparar los resultados de la RT-PCR entre dichos cultivos tratados con desinfectante y los cultivos no tratados.
- 35 8. El método de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en donde dicho cultivo comprende un organismo del grupo que consiste en *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *Mycobacterium avium*.
- 40 9. El método de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en el que dicho cultivo celular comprende más de un organismo bacteriano.
10. El método de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en el que dichos desinfectante y/o antibiótico rompen la integridad de la membrana.
- 45 11. Un método de perfilado microbiano de una muestra, que comprende
- a. recoger una muestra;
 - b. exponer dicha muestra a PMA;
 - c. exponer dicha muestra que contiene PMA a una fuente de luz;
 - 50 d. aislar el ADN genómico de dicha muestra; y
 - e. realizar la PCR sobre dicho ADN aislado;
12. Un método de perfilado microbiano de una muestra, que comprende
- a. recoger una muestra;
 - b. exponer dicha muestra a PMA;
 - c. exponer dicha muestra que contiene PMA a una fuente de luz;
 - d. aislar el ARN de dicha muestra; y
 - 60 e. realizar RT-PC en dicho ARN aislado.
13. El método de la reivindicación 11 o de la reivindicación 12, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en suelo, agua, aguas residuales, alimentos, productos agrícolas, productos farmacéuticos y cosméticos.
- 65 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores el que dicho PMA es dicloruro de 3-amino-8-azido-5-(3-dietilmetilamonio)propil)-6-fenilfenantridio, dibromuro de 3-amino-8-azido-5-(3-(dietilmetilamonio)propil)-6-fenilfenantridio o dibromuro de 3-amino-8-azido-5-(3-(dietilmetilamonio)propil)-6-fenilfenantridio.

FIG. 1

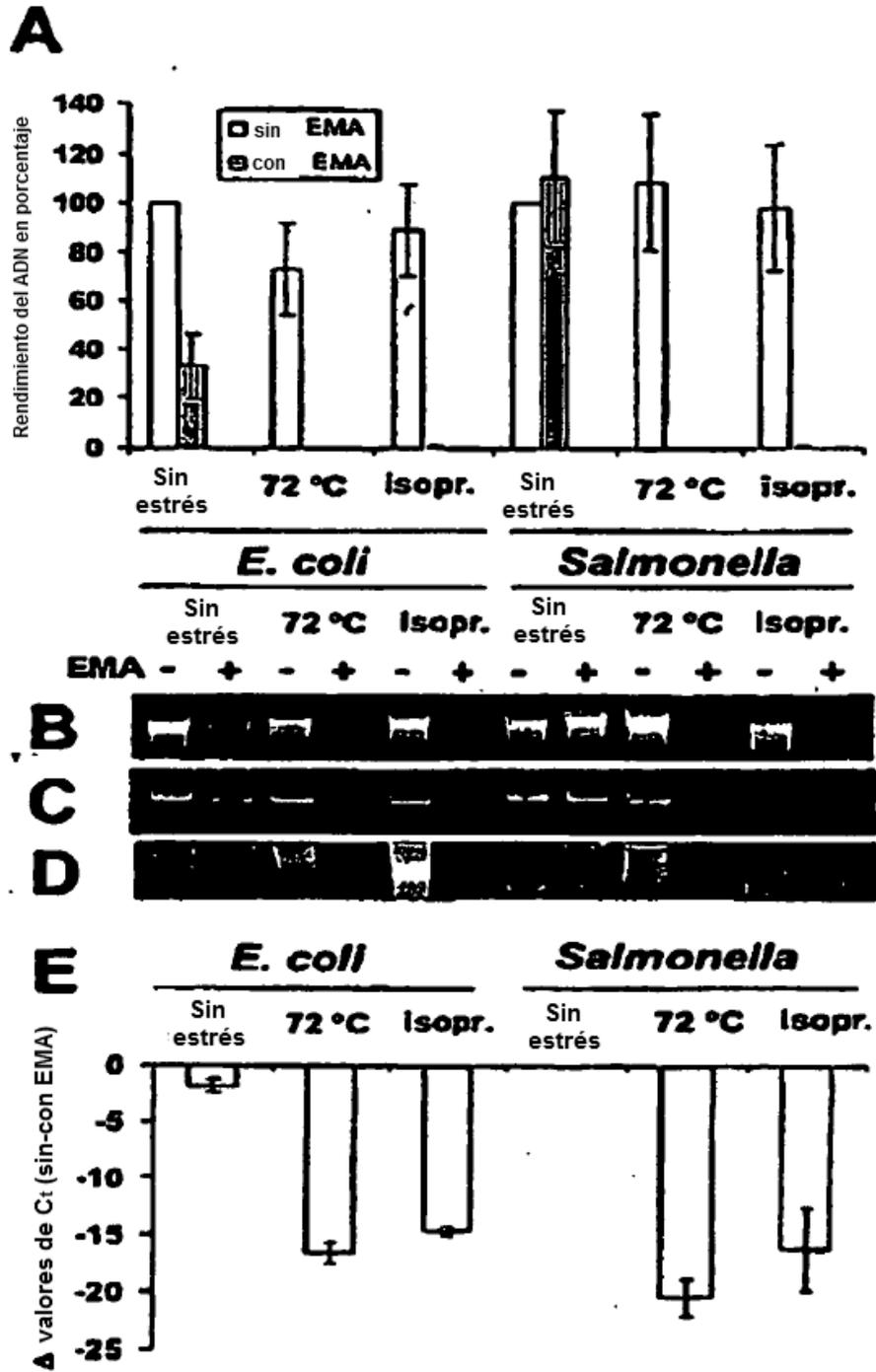


FIG. 2

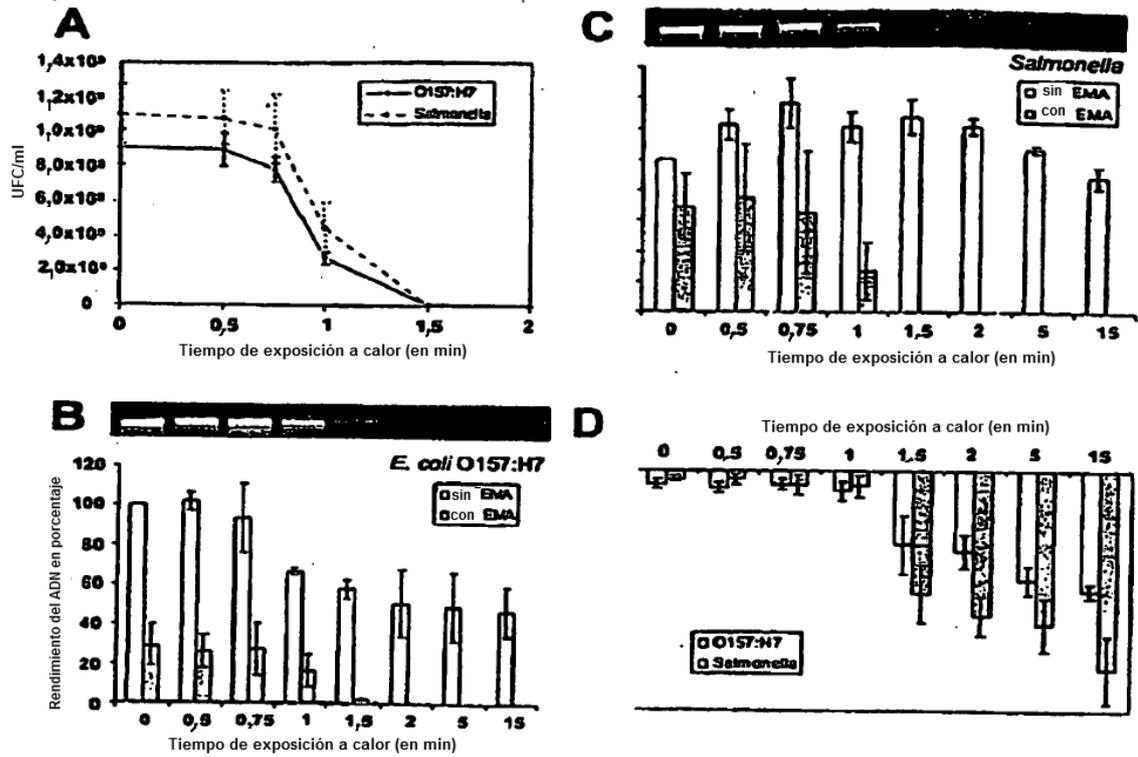


FIG. 3

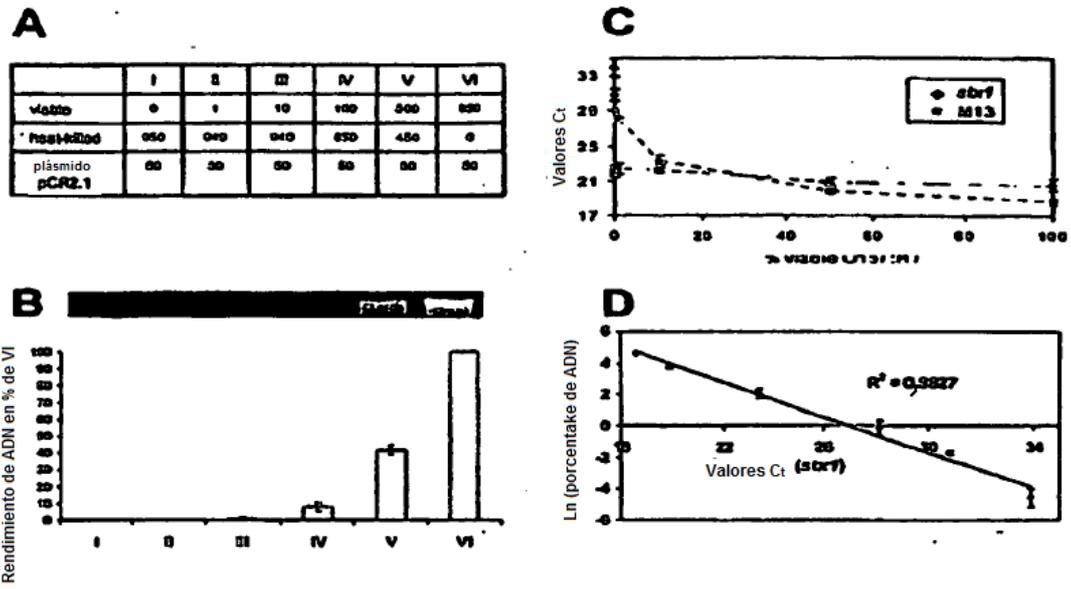


FIG. 4

A

		I	II	III	IV	V
O157:H7	viable	1000	900	500	100	0
	muertas por calor	0	100	500	900	1000
Salmonella	viable	0	100	500	900	1000
	muertas por calor	1000	900	500	100	0

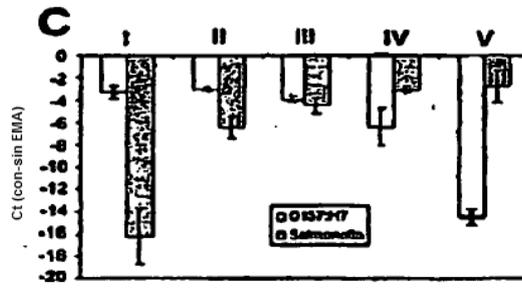
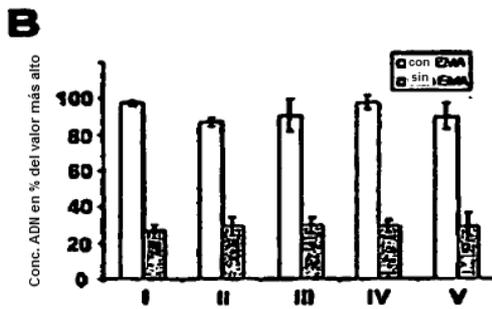
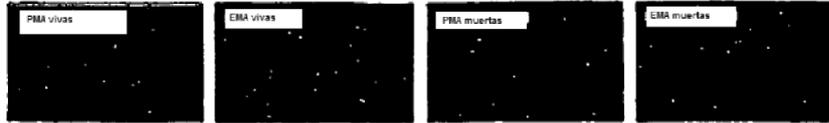


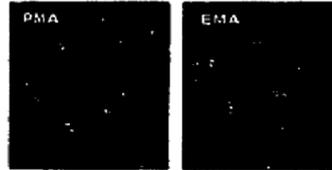
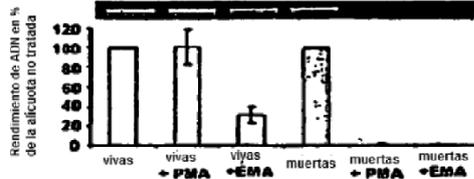
Figura 5

A *E. coli* 0157:H7

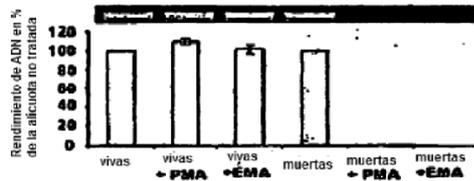


B

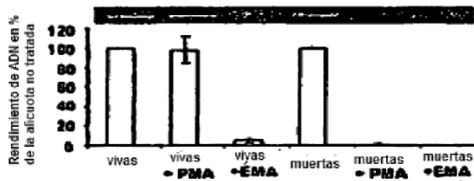
Streptococcus sobrinus



Salmonella typhimurium



Micrococcus luteus



Staphylococcus aureus

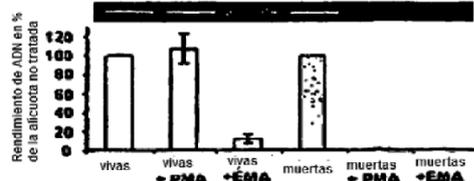


FIGURA 5B CONT.

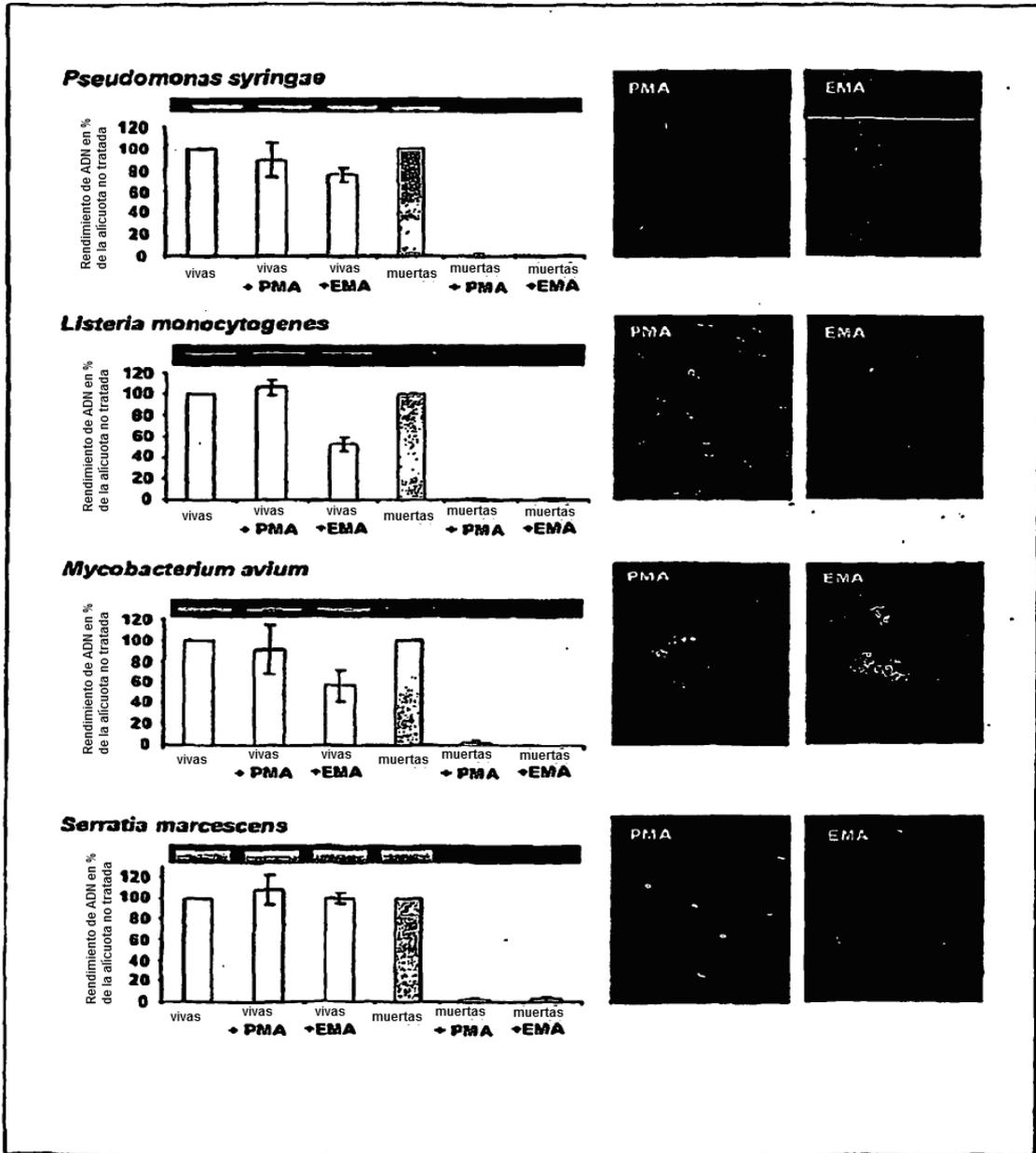


FIGURA 6

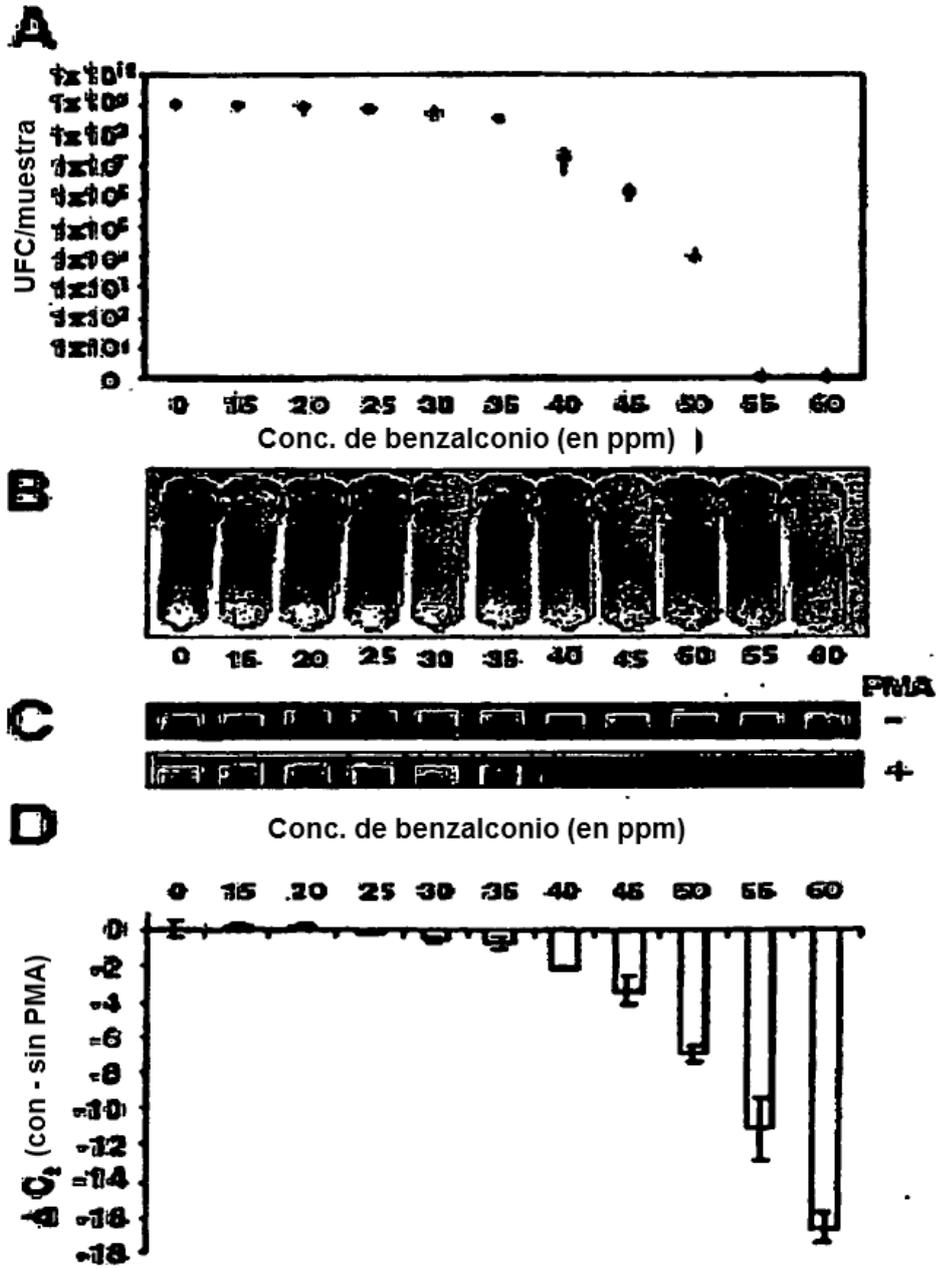


FIGURA 7

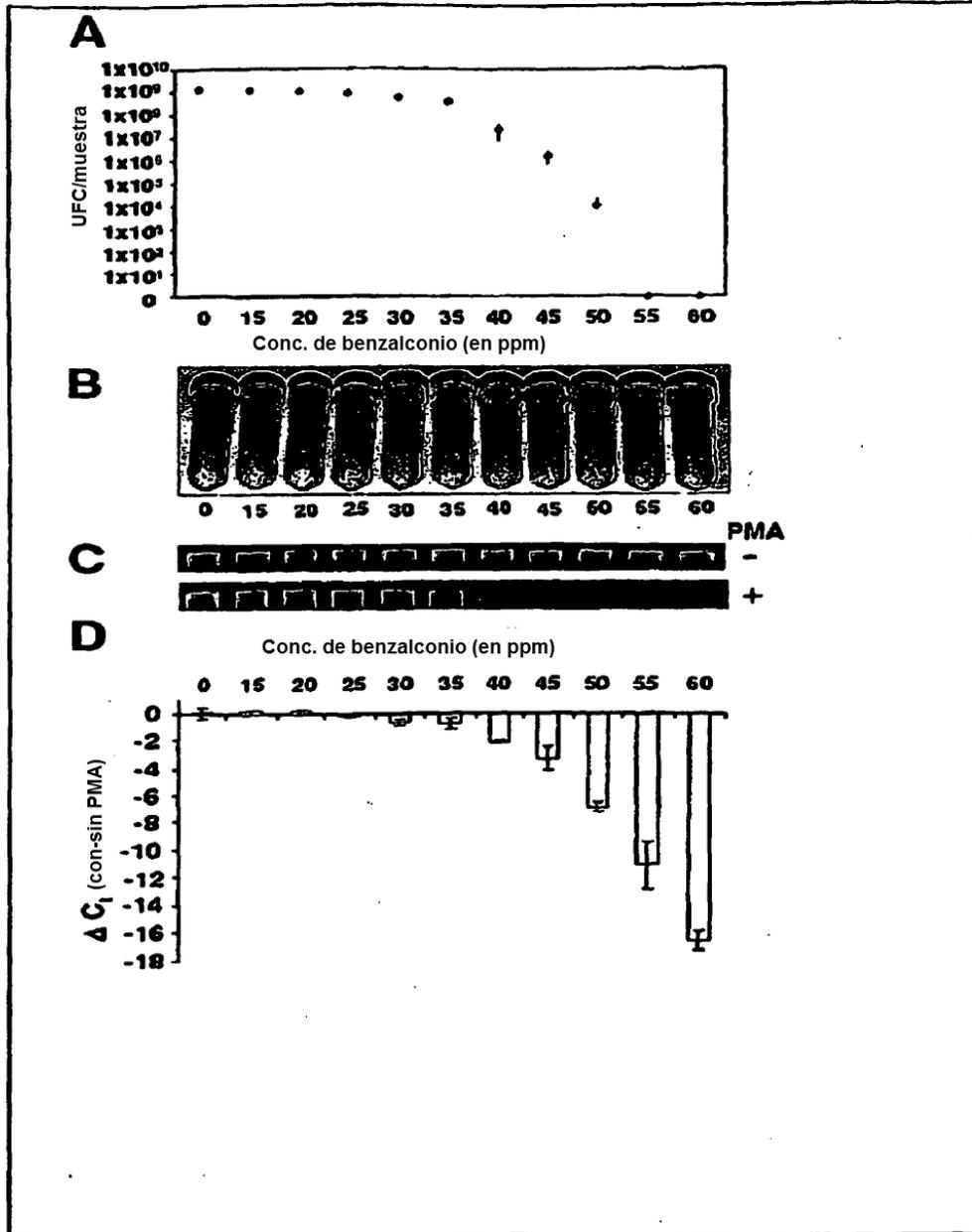


FIGURA 8

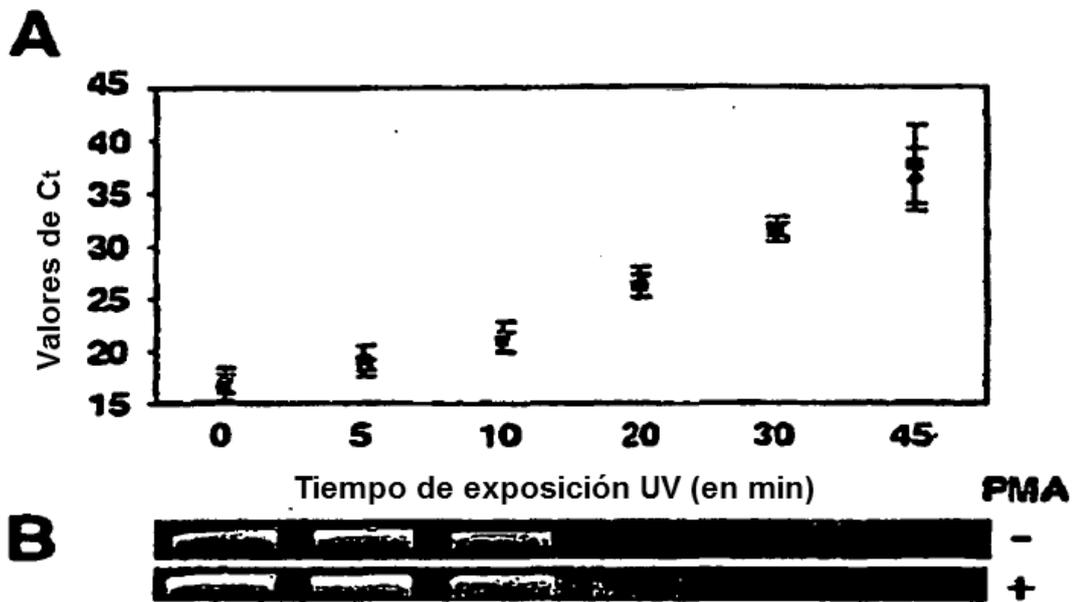


FIGURA 9

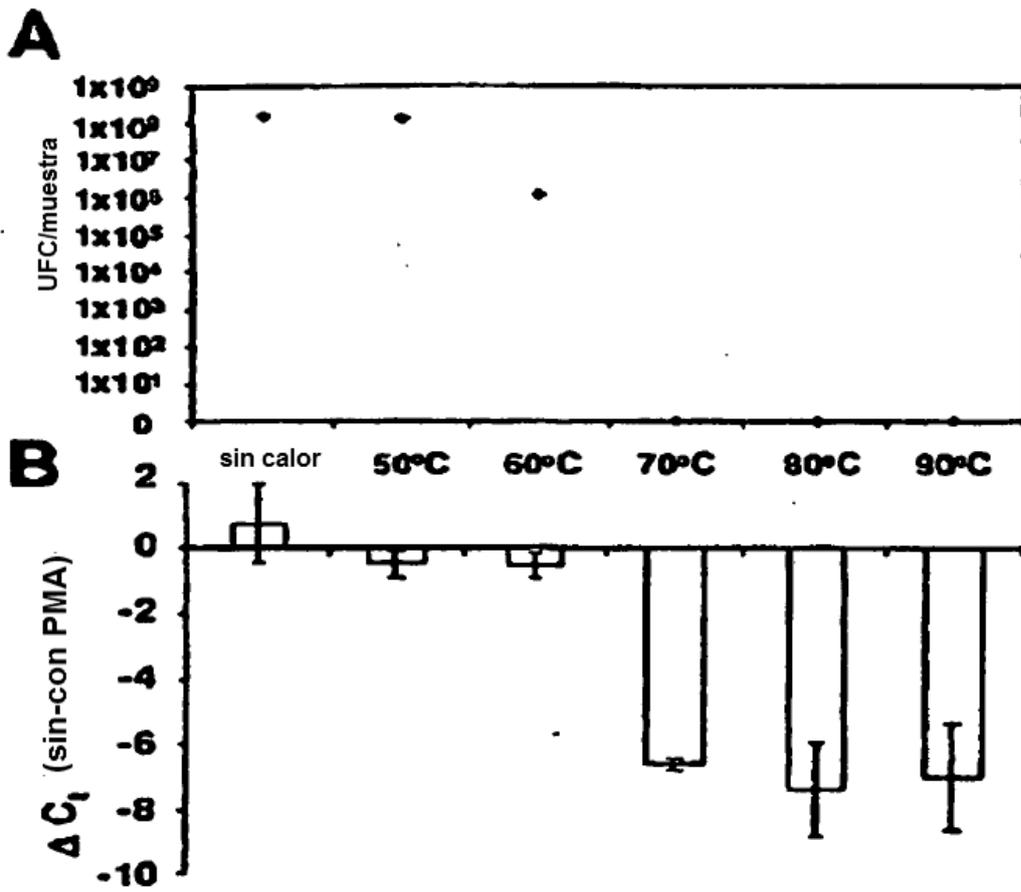


FIG. 10

	Filogenético más cercano	% simil.	Mezcla		○ Vivas ● muertas					
			I	I	II	I	V	V		
A	<i>Acinetobacter</i>	10	○	●	○	●	●	●		
B	<i>Aeromonas</i>	10	○	●	●	○	●	●		
C	<i>Aeromonas</i>	9	○	●	●	●	○	●		
D	<i>Klebsiella</i>	9	○	●	●	●	●	○		

+ PMA						aislados individuales				- PMA					
I	I	II	IV	V	VI	A	B	C	D	I	I	II	IV	V	VI

Fig. 12

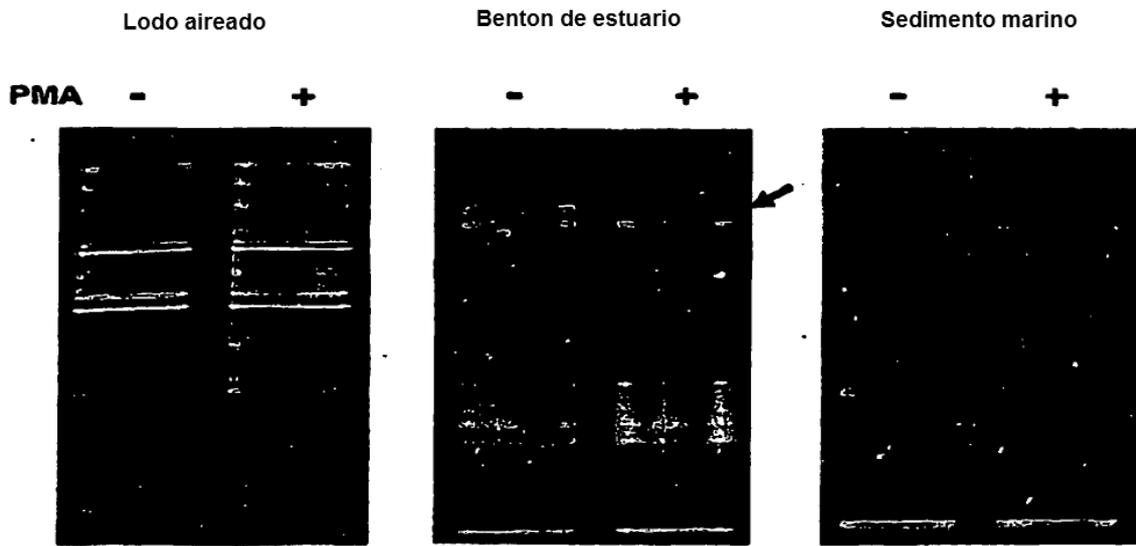


FIG. 13

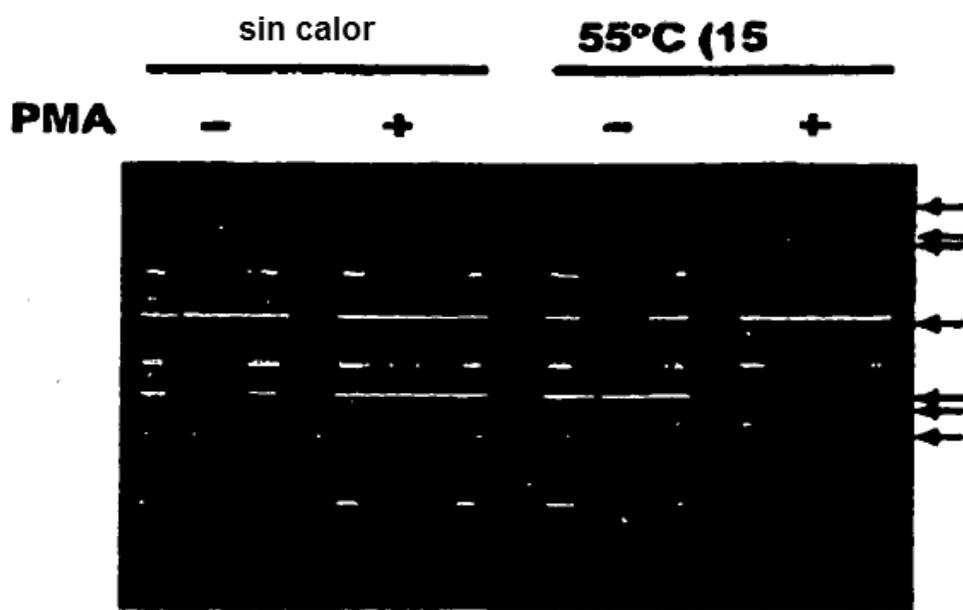


FIG. 14

