

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 527**

21 Número de solicitud: 201431577

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

28.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.04.2016

Fecha de la concesión:

13.02.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

20.02.2017

73 Titular/es:

**INSTRUMENTS ÚTILS DE LABORATORI GENIUL,
SL (100.0%)**

**Rambla Sant Nebridi, 22, Edifici Gaia
08222 Terrassa (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

CODONY IGLESIAS, Francesc

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

54 Título: **Procedimiento para la detección de células vivas, con las membranas celulares íntegras y funcionales, mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos**

57 Resumen:

El procedimiento comprende (1) añadir a una muestra celular un medio de reacción comprendiendo al menos dos agentes desagregantes, siendo uno de ellos un surfactante no iónico o un agente quelante, y el otro un surfactante aniónico; un tampón fosfato a un pH apropiado; una solución isotónica; y al menos una sustancia activante del metabolismo celular de las células de la muestra para activar el metabolismo celular, (2) añadir el compuesto monoazida de etidio (EMA) a una concentración final $\leq 10 \mu M$, (3) dejar incubar la mezcla obtenida, (4) fotoactivar la mezcla para activar el EMA, (5) lisar la muestra para obtener una mezcla de material genético proveniente de las células muertas, células vivas sin metabolismo de membrana y células vivas con metabolismo de membrana activo; y (6) detectar mediante una técnica de amplificación de ácidos nucleicos, el material genético de las células vivas y con metabolismo de membrana activo.

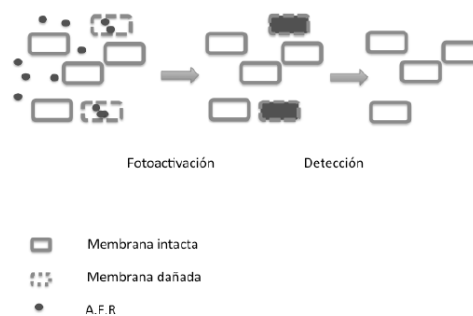


FIG. 1

ES 2 568 527 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de células vivas, con las membranas celulares íntegras y funcionales, mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento que permite diferenciar mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, aquellas células con las membranas celulares íntegras y funcionales (esto es, metabólicamente activas), de las que no cumplen dicha condición.

10

Antecedentes de la invención

La detección de células viables o vivas, entendiéndose por viables o vivas en el estado de la técnica, células con membranas celulares íntegras, mediante técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos y el uso de agentes intercalantes de ácidos nucleicos fotoactivables es bien conocida. Los agente intercalantes más usados son los compuestos monoazida de etidio (EMA, siglas en inglés) y monoazida de propidio (PMA, siglas en inglés). Estas moléculas y sus derivados pertenecen al grupo de los Phenanthridinium.

20

Dentro del grupo de los Phenanthridinium, dependiendo de su tamaño y carga, existen diversos compuestos que tienen capacidad conocida para atravesar una membrana celular íntegra, los cuales dependiendo del estado de la célula pueden ser seguidamente devueltos al medio exterior de forma activa por la propia célula.

25

En concreto, el bromuro de etidio puede atravesar las membranas celulares, de modo que las células metabólicamente activas tienen capacidad de expulsarlo hacia el espacio extracelular mediante sistemas de transporte de membrana celular activos. Por ello a baja concentración, esto es, a una concentración a la que no se alcance un nivel de saturación máximo del compuesto (aproximadamente $\leq 10\mu\text{M}$), el bromuro de etidio es usado como marcador de actividad de membrana (Rodrigues L. *et al.*, "Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in Mycobacterium tuberculosis" Antimicrob. Agents Chemother. Feb 2013, Vol. 57, No. 2, pp. 751-7.

30

35

Otro compuesto también del grupo de los Phenanthridium capaz de atravesar las membranas celulares íntegras es el EMA. Sin embargo, el uso de este compuesto en el estado de la técnica como marcador de células con la membrana dañada, en protocolos tales como el de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de viabilidad (US 7262009 B2), es a día de hoy muy limitado. El motivo es que a las concentraciones necesarias para neutralizar y bloquear el ADN de las células muertas (con la membrana dañada), concentraciones aproximadamente $>10\mu\text{M}$, el EMA también afecta indirectamente de manera notable a las células con la membrana celular intacta. Por la misma razón, a pesar de la facilidad del EMA para difundir hacia el citoplasma de las células vivas, a las concentraciones usadas no es un reactivo adecuado como marcador de integridad de membrana (Nocker, A., *et al.*, "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. Nov 2006, Vol. 67, No. 2, pp. 310-20). Todo lo cual ha dado lugar a que su uso actual esté muy reducido.

Igualmente, dentro del grupo de los Phenanthridium, hay compuestos que únicamente pueden acceder al citoplasma de las células, si estas tienen la membrana celular dañada. En concreto, son moléculas de mayor tamaño que los compuestos anteriormente mencionados, como el homodímero de etidio, el yoduro de propidio (y su forma monoazida, el PMA). Estos compuestos ni usados a elevadas concentraciones, aproximadamente $\geq 50\mu\text{M}$, pueden atravesar las membranas celulares intactas. Dichos compuestos solo acceden al citoplasma de aquellas células cuya membrana celular está dañada. Por ello, este tipo de compuestos se usan únicamente en la detección de células vivas, esto es, con membranas íntegras, en diferentes técnicas, que incluyen la microscopía de fluorescencia, citometría de flujo y técnicas de detección de ácidos nucleicos.

Cabe mencionar que en el estado de la técnica, también se han desarrollado adaptaciones específicas de determinación de la viabilidad celular, basado en la integridad de membrana, con fines específicos, por ejemplo para la detección de esporas (células no activas), basados en la combinación de agentes destructores de células vegetativas con el uso de monoazida de propidio o monoazida de etidio y fotoactivación (como se muestra en el documento, US 20110318750 A1).

Las mencionadas metodologías, descritas por ejemplo en los documentos US 7262009 B2 y US 8198040 B2, se basan en una aproximación analítica en la que el único reactivo es el EMA o el PMA, respectivamente. En dichas metodologías, aplicadas sobre la muestra en

estado líquido, se usan los mencionados compuestos de manera independiente y a altas concentraciones. Dichos reactivos, según se deduce de las enseñanzas del estado de la técnica, pueden acceder solo al interior de las células muertas, esto es, sin membranas celulares íntegras, mientras que al no poder atravesar una membrana celular íntegra, esto es, en buen estado (lo que en el estado de la técnica se asimila con célula viva), no acceden al interior de las mismas.

Una vez en el citoplasma de la célula muerta, los reactivos se intercalan con su material genético, de modo que al ser expuestos a una determinada luz, se unen covalentemente a él. Al unirse, el material genético ya no puede ser detectado mediante las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Consecuentemente, las técnicas de detección basadas en la amplificación de ácidos nucleicos únicamente detectan células con la membrana intacta.

Sin embargo, los protocolos anteriores, basados únicamente en el uso de alguno de los reactivos mencionados anteriormente, el EMA o PMA, tienen además una seria limitación, que no permiten la discriminación real o absoluta entre la totalidad de células vivas con respecto a las células muertas. Esto es debido a la influencia en la determinación de las células vivas reales de determinados factores, en concreto a la influencia de ciertos componentes de la pared celular -como el glicocálix (término genérico que se refiere al material polimérico extracelular producido por algunas bacterias u otras células), los ácidos micólicos, los exopolisacáridos- o la propia agregación celular, y factores que limitan la difusión de los mencionados reactivos hacia el interior de las células muertas.

Hasta la fecha todas las mejoras de las técnicas descritas en el estado anterior de la técnica para la determinación de las células vivas usando los compuestos fotoreactivos mencionados anteriormente, que se basan en el principio de integridad de membrana como indicador de célula viva, se han orientado a minimizar el sesgo resultante de detectar como células vivas, células que están muertas pero a las que por los factores mencionados anteriormente, el reactivo no llega, o células vivas (con integridad de membrana) en las que reactivo entra pero no puede ser expulsado activamente por la célula (Fittipaldi, M. *et al.*, "PCR in environmental samples: can all data be interpreted directly?" *Microb. Ecol.* Jan 2011, Vol. 61, No. 1, pp.7-12; Fittipaldi, M. *et al.*, "Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification" *J. Microbiol. Methods.* Nov 2012, Vol. 91, No. 2, pp. 276-89).

35

Entre las mejoras descritas en el estado de la técnica, es de destacar la inclusión del paso adicional de eliminar del medio de reacción los reactivos EMA o PMA, tras un primer tratamiento con los mismos, para posteriormente incubar la muestra en un medio de cultivo, y tras dejar pasar un tiempo volver a repetir el tratamiento con los reactivos EMA o PMA. En este caso se trata de realizar un doble tratamiento con un paso de incubación intermedio que favorece el crecimiento de las células viables (como se muestra en el documento WO 2009022558 A1). O simplemente aplicar el tratamiento dos veces seguidas, añadiendo cada vez reactivo nuevo (tal y como se recoge en el documento Kralik, P. *et al.*, “*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment” Int. J. Food Microbiol. Jul. 2010, Vol. 31, No. 141 (Sup. 1), pp. S80-6).

Independientemente de las mejoras o variaciones desarrolladas sobre el protocolo inicial basado exclusivamente en el uso de uno de los reactivos EMA o PMA, todos los protocolos resultantes hasta la fecha se basan en el uso de elevadas concentraciones de dichos reactivos, concentraciones que oscilan aproximadamente entre 20 y 200 μM , y entre 50 y 500 μM , respectivamente.

Además, en dichos protocolos, el único principio que rige el procedimiento es la discriminación en el estado de la célula en función de la integridad de la membrana celular, considerándose la célula viva o muerta.

Dichas técnicas no permiten distinguir las células en función de otros criterios de viabilidad celular, que son muy relevantes en distintos campos técnicos, en concreto la actividad de los sistemas de transporte de membrana, claro indicador de actividad metabólica celular. Por ejemplo, en los procesos de desinfección o inactivación microbiana, que no necesariamente conllevan el compromiso de la integridad celular, es esencial que la técnica a emplear para la determinación de la viabilidad celular, permita la discriminación de la presencia de capacidad o actividad metabólica (que equivale a disponer de una capacidad de mantener una homeostasis interna, mediante el mantenimiento del funcionamiento activo de los sistemas de transporte de membrana).

A la vista de todo lo mencionado anteriormente, es necesario para determinados campos técnicos, que el procedimiento de determinación de la viabilidad celular no se base únicamente en el criterio de la integridad de la membrana celular.

Existe pues una clara necesidad de desarrollar un procedimiento más sensible que supere los errores derivados de la propia agregación celular y de los factores que limitan la difusión de los reactivos hacia el interior de las células, al tiempo que permita determinar si una célula mantiene su integridad celular (esto es, de la membrana), así como su capacidad o actividad metabólica para poder evaluar la viabilidad celular.

La presente invención proporciona dicho procedimiento, el cual representa una ampliación de las aplicaciones técnicas de los protocolos de determinación de células vivas y metabólicamente activas, además de representar una determinación más realista del estado real de una célula.

Exposición de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un medio de reacción para el procedimiento de la presente invención, donde el medio de reacción comprende los siguientes ingredientes: (1) una mezcla de al menos dos agentes desagregantes, donde uno de ellos es un surfactante no iónico, o un agente quelante, y el otro es un surfactante aniónico, en una proporción entre 1:2 y 1:4 v/v, y donde la mezcla está a una concentración final $\geq 0,1$ %, en el medio de reacción; (2) tampón fosfato a un pH apropiado, esto es, compatible con las células de la muestra; (3) solución isotónica; y (4) al menos una sustancia activante del metabolismo celular de las células de la muestra, en la proporción adecuada en el medio de reacción para activar el metabolismo celular.

En un segundo aspecto, la presente invención comprende un procedimiento para diferenciar en una muestra celular, las células con las membranas celulares íntegras y metabólicamente activas, de las células muertas y las vivas sin metabolismo activo de membrana, donde el procedimiento comprende los siguientes pasos: (1) añadir a la muestra celular el medio de reacción de la presente invención; (2) añadir a la mezcla del paso (1), el compuesto monoazida de etidio (EMA) a una concentración final ≤ 10 μM ; (3) dejar incubar la mezcla obtenida en el paso (2) en oscuridad durante el tiempo necesario para que las moléculas de EMA interaccionen con el material genético y que las células metabólicamente activas puedan expulsar las moléculas de EMA que hayan podido entrar en la célula; (4) fotoactivar la mezcla obtenida en el paso (3) con una fuente de luz apropiada para activar el EMA; (5) lisar la mezcla del paso (4) para obtener una mezcla de material genético proveniente de las células muertas, de las células vivas sin metabolismo de membrana y de las células vivas con metabolismo de membrana activo; y (6) detectar mediante una técnica

de amplificación de ácidos nucleicos, el material genético de las células vivas y con metabolismo de membrana activo, siendo la señal obtenida en este paso proporcional a la cantidad de células con las membranas celulares íntegras y funcionales (o metabólicamente activas).

5

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Esquema del funcionamiento del procedimiento del estado de la técnica anterior para la detección de células viables. Se incubaba la suspensión celular con los agentes intercalantes fotoreactivos (EMA y PMA) que penetran en la célula con la membrana dañada. Tras exponer la suspensión a la luz, el ADN queda marcado de forma irreversible, de modo que las técnicas de detección de ácidos nucleicos solo discriminan las células con la membrana intacta del resto de las células (AFR= agente intercalante fotoreactivo de ADN).

15

Figura 2. Esquema del procedimiento de detección de la invención que permite discriminar entre las células que tienen la membrana íntegra y con metabolismo activo, de las que no. (A) representa a una célula viva, con membrana celular intacta e impermeable a moléculas de PMA y con metabolismo activo que permite la expulsión por la célula de las moléculas de EMA. (B) representa una célula viva, con membrana celular intacta e impermeable a las moléculas de PMA, pero con metabolismo inactivo, por lo que no puede expulsar las moléculas de EMA. (C) representa una célula muerta con la membrana celular no íntegra (o dañada) por tanto permeable tanto a las moléculas de PMA como a las moléculas de EMA. El estado de la técnica anterior aplica únicamente a los casos (B) y (C). La presente invención aplica también al caso (A).

25

Figura 3. Esquema del procedimiento de la invención, donde los triángulos representan moléculas de EMA y los cuadrados representan moléculas de PMA. La detección del ADN, por ejemplo por PCR, de las células sometidas al medio de reacción de la invención permite que solo las células con membrana íntegra y metabolismo activo sean detectadas.

30

Figura 4. Gráfica representativa de los resultados obtenidos usando EMA a bajas concentraciones para identificar si una membrana celular está metabólicamente activa o no.

Figura 5. Gráfica representativa de los resultados obtenidos aplicando el procedimiento de la invención basado en el uso combinado de EMA y PMA a bajas concentraciones frente al uso de solo EMA o PMA a la misma baja concentración (cm=células muestras).

5 Descripción detallada de la invención

El procedimiento de la presente invención permite no solo identificar las células vivas sino también activas, esto es, células que mantienen su membrana celular intacta y por lo tanto que son impermeables a la entrada de compuestos tóxicos. Además, ventajosa y sorprendentemente, el procedimiento de la presente invención, a diferencia de los descritos en el estado de la técnica anterior, permite detectar las células que además de tener una membrana celular íntegra, mantienen su membrana celular activa, esto es, con los mecanismos enzimáticos necesarios para mantener su homeostasis interna.

15 En la presente invención, las expresiones “membrana celular intacta” y “membrana celular íntegra” se usan indistintamente. En el contexto de la presente invención, estas expresiones hacen referencia a aquella membrana celular que mantiene completa continuidad en la definición del volumen celular, con todas las estructuras y mecanismos estructurales de contacto con la pared, por lo que cumple plenamente con la función de barrera física con el espacio extracelular.

En la presente invención, las expresiones “célula con membrana celular activa” o “célula con membrana celular funcional” hacen referencia a una célula que tiene un estado metabólico general activo, que la célula no está en estado “latente” (por ejemplo, y sin limitación, en forma de spora), ni con disfunciones metabólicas que le impidan generar la energía necesaria para mantener activa y funcional su membrana. En definitiva, que la célula tiene capacidad para expulsar compuestos potencialmente tóxicos que pudieran atravesar la membrana accediendo al interior celular. La membrana celular activa o funcional es aquella membrana íntegra que tiene los mecanismos enzimáticos asociados a la membrana, funcionales y operativos.

En la presente invención, la expresión “material genético” se asimila a ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

35 En la presente invención, los términos “surfactante”, “tensioactivo” y “tensoactivo” son usados indistintamente, y tiene el significado habitual en el estado de la técnica, esto es, son

compuestos que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases (p.ej., dos líquidos insolubles uno en otro).

5 Los inventores han descubierto, tal y como se demuestra en los EJEMPLOS, que la forma monoazida del bromuro de etidio, el EMA, puede atravesar las membranas de las células con la membrana celular íntegra, pero puede ser retornado al medio, por lo que puede ser usado también como marcador de actividad de membrana. Esta propiedad sumada a la posibilidad de ser fotoactivado le da una nueva potencialidad a su uso dando lugar al procedimiento de la presente invención.

10

Como se ha mencionado en un apartado anterior, en un primer aspecto, la invención, comprende un procedimiento que combina el uso del reactivo fotoactivable EMA a bajas concentraciones ($\leq 10\mu\text{M}$) y un medio de reacción que contiene una serie de compuestos que son capaces de facilitar la difusión de EMA en las células con la membrana celular íntegra y activa.

15

El mencionado medio de reacción de la presente invención comprende:

- 20 (1) una mezcla de al menos dos agentes desagregantes, donde uno de ellos es un surfactante no iónico, o un agente quelante, y el otro es un surfactante aniónico, en una proporción entre 1:2 y 1:4, v/v, y donde la mezcla está a una concentración final $\geq 0,1\%$ en el medio de reacción;
- (2) tampón fosfato a pH apropiado, esto es, a un pH compatible con las células de la muestra;
- 25 (3) solución isotónica; y
- (4) al menos una sustancia activante (o activadora) del metabolismo celular en la proporción adecuada en el medio de reacción para poder activar el metabolismo celular.

30 Para el paso (1), se preparan diluciones madre a una concentración conocida (gr/L) que posteriormente se mezclan en la proporción de volumen adecuada para obtener el ratio indicado, siempre en %. Si es sólido, la dilución madre se calcula en gr/L, de modo que al mezclarla, se equilibra gr/gr mediante v/v.

35 La presente invención aporta un medio de reacción que por un lado, ventajosamente facilita la entrada del EMA, y de reactivos fotoactivables del grupo de los Phenanthridinium en

general, en las células con membrana celular íntegra, tanto las que tienen la membrana celular activa como aquellas sin los mecanismos enzimáticos necesarios para mantener la homeostasis interna.

5 Dicho efecto es consecuencia del uso en el medio de reacción de agentes tensioactivos y agentes desagregantes, los cuales no afectan a las células vivas, al tiempo que maximizan la difusión de cualquier reactivo fotoactivable hacia el interior de todas las células (independientemente que estas tengan o no la membrana celular íntegra), y de una mezcla de sustancias orgánicas que activan el metabolismo celular.

10

El medio de reacción de la presente invención permite que las células con la membrana intacta y funcional tengan capacidad para evitar la entrada del EMA al interior celular, e incluso en caso de entrar, las células tienen la capacidad de mantener una concentración interna de EMA lo suficientemente baja como para que su fotoactivación no afecte de forma
15 significativa a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

15

Por la expresión "sustancia activante (o activadora) del metabolismo celular" se entiende en la presente invención, una sustancia (o una mezcla) que sirve de nutriente o fuente de energía para la célula. El experto en la técnica conoce perfectamente qué tipo de sustancias
20 usar para activar el metabolismo celular en función del tipo de célula concreta, así como las cantidades a usar. Ejemplos de las mismas, sin limitación, son los ingredientes convencionales de los medios de cultivo celular (como un digerido de extracto de caseína), una mezcla completa de aminoácidos y (oligo)péptidos (casaminoácidos), una mezcla que comprenda al menos glucosa, glutamato y/o succinato, etc., en una proporción final $\geq 0,15$ %
25 w/v en el medio de reacción.

20

25

La expresión "agente desagregante", en el contexto de la presente invención, hace referencia a agentes que facilitan y/o mantienen la separación física de las células. Ejemplos de agentes desagregantes son los surfactantes no iónicos y agentes quelantes. Cualquier
30 surfactantes no iónico conocido en el estado de la técnica se puede usar en la presente invención. Ejemplos de surfactantes no iónicos, sin limitación, son los nonoxinolos (como el nonoxinol 9), los alquilglucósidos (como el Tween 20, polisorbato 20 o monooleato de polioxietileno sorbitan) y los octilfenoletoxilados (como el Octoxinol-9 o Triton X-100). En una realización particular, se usa monooleato polioxietilo sorbitán. De modo similar cualquier
35 agente quelante conocido en la técnica se puede usar en la presente invención. Ejemplos de agentes quelantes, sin limitación, son el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el

30

35

copolímero estireno-divinilbenceno y co-polímeros conteniendo grupos ácidos iminodiacéticos.

5 Cualquier surfactante aniónico conocido en el estado de la técnica se puede usar en el medio de reacción de la presente invención. Ejemplos de surfactantes aniónicos, sin limitación, son el lauril sulfato, el desoxicolato y el lauroil sacosina.

En una realización particular, la solución isotónica es NaCl a una concentración final $\leq 0,8$ % w/v en el medio de reacción.

10

En otra realización particular, el medio de reacción de la presente invención comprende un surfactante no iónico que se selecciona del grupo que consiste en un nonoxinol, un alquilglucósido y un octilfenoletoxilado, y un surfactante aniónico que se selecciona del grupo que consiste en lauril sulfato, desoxicolato y lauroil sacosina.

15

En otra realización más particular de la presente invención, el medio de reacción comprende como sustancia activante del metabolismo celular una mezcla de casaminoácidos a una concentración final 0,15 % w/v.

20 En otra realización aún más particular de la presente invención, el medio de reacción un 0,1 % de sodio desoxicolato w/v, un 0,05 % de monooleato sorbitán polioxietilenado v/v, NaCl a concentración final $\leq 0,8$ % w/v a pH 7,2 y un 0,15 % w/v de una mezcla de casaminoácidos.

25 Cualquiera de los medios de reacción descritos en la presente invención, se pueden usar en cualquiera de los procedimientos que forman parte de la presente invención. Dichos procedimientos permiten diferenciar en una muestra celular, las células con las membranas celulares íntegras y metabólicamente activas, de las células muertas y de las células vivas sin metabolismo activo de membrana. Dichos procedimientos comprenden los siguientes pasos: (1) añadir a la muestra celular el medio de reacción de la presente invención; (2)
30 añadir a la mezcla del paso (1) el compuesto monoazida de etidio (EMA) a una concentración final ≤ 10 μ M; (3) dejar incubar la mezcla obtenida en el paso (2) en oscuridad durante el tiempo necesario para que las moléculas de EMA interaccionen con el material genético y que las células metabólicamente activas puedan expulsar las moléculas de EMA que hayan podido entrar en la célula; (4) fotoactivar la mezcla obtenida en el paso (3) con
35 una fuente de luz apropiada para activar el EMA; (5) lisar la muestra del paso (4) para obtener una mezcla de material genético proveniente de las células muertas, de las células

vivas sin metabolismo de membrana y de las células vivas con metabolismo de membrana activo; (6) detectar mediante una técnica de amplificación de ácidos nucleicos, el material genético de las células vivas y con metabolismo de membrana activo, siendo la señal obtenida en este paso proporcional a la cantidad de células con las membranas celulares íntegras y funcionales (o metabólicamente activas).

Los inventores han desarrollado un procedimiento en el que los niveles intracelulares de EMA de una célula que no tenga un metabolismo activo pero su membrana celular esté intacta aumentan, por lo que el EMA se intercala con su material genético, y al ser fotoactivado queda neutralizado. Ventajosa y sorprendentemente, el procedimiento de la presente invención, no detecta aquellas células con su membrana celular íntegra, pero sin metabolismo. El efecto nuevo e inventivo alcanzado por el procedimiento de la presente invención se consigue mediante la combinación del medio específico de reacción descrito y el uso de EMA a concentraciones inferiores a las usadas en el estado de la técnica, para evitar que se acumule de manera irreversible en células que tienen la membrana celular intacta pero sin metabolismo activo.

En definitiva, en el procedimiento de la presente invención basado en el uso del medio de reacción de la invención, que facilita la difusión de los reactivos y la activación del metabolismo celular, y en presencia del nivel adecuado de EMA ($<10\mu\text{M}$) se consigue un equilibrio entre unos niveles de EMA lo suficientemente bajos para evitar su efecto sobre células con la membrana celular intacta y metabólicamente activas y asegurar su efecto sobre aquellas células con la membrana celular intacta pero sin metabolismo activo o íntegro. Con esta aproximación, es posible conocer, en una suspensión acuosa los niveles de células vivas y activas metabólicamente del resto (células sin metabolismo pero con la membrana íntegra más células con membrana dañada), así como complementar el procedimiento anterior con PMA para neutralizar el ADN de las células con la membrana celular no íntegra, o células muertas.

En presencia del medio de reacción de la presente invención, que facilita la difusión de los reactivos y la activación del metabolismo celular, y en presencia de los niveles adecuados de EMA ($<10\mu\text{M}$) así como de PMA ($\geq 20\mu\text{M}$) se consigue que: (1) en las células vivas (con integridad de membrana y metabolismo activo) no entre PMA y el nivel de EMA se mantenga lo suficientemente bajo como para no afectar su ADN con posteriores reacciones de fotoactivación en el posterior análisis basado en detección de ácidos nucleicos para detectar estas células; (2) en las células aun viables pero sin actividad metabólica, el PMA

no entre, pero al no poder mantener los niveles de EMA intracelulares lo suficientemente bajos como para no verse afectado su ADN en posteriores reacciones de fotoactivación, el ADN quede bloqueado y en un posterior análisis basado en detección de ácidos nucleicos no se detecten estas células; y (3) en las células muertas (sin integridad celular), tanto el PMA como el EMA puedan acceder al citoplasma e intercalarse con el ADN, evitando que el ADN quede así bloqueado en posteriores reacciones de fotoactivación, de modo que en un posterior análisis basado en detección de ácidos nucleicos no se puedan detectar estas células.

En una realización particular de la invención, el procedimiento de la invención comprende en el paso (2) la adición de PMA para poder tener suficiente capacidad neutralizante total. El PMA se usa a concentraciones estándar, esto es, como mínimo el doble de la concentración de EMA usada en la etapa (a). Es por ello que si se usa PMA, el material genético de todas las células que no tiene la membrana celular íntegra también queda neutralizado. En una realización aún más particular, el PMA se adiciona en una proporción $\geq 1:5$ EMA:PMA.

En otra realización particular de la presente invención, el paso (3) de incubación dura aproximadamente entre 5 y 30 minutos.

En otra realización particular de la presente invención, la fuente de luz empleada en el paso (4) del procedimiento de la presente invención, se caracteriza porque emite al menos en el visible, aproximadamente entre 455-475 nm. Cualquier fuente de luz conocida en el estado de la técnica que emita en este rango puede ser empleada, por ejemplo, sin limitación, leds azules o lámparas halógenas.

El paso (6) del procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica de amplificación cualitativa de ácidos nucleicos conocida, poniéndose a continuación el resultado en contexto con una recta de calibrado. En definitiva, se necesita al menos de una amplificación y de una señal proporcional. En una realización particular del procedimiento de la presente invención, la amplificación del paso (6) se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación es independiente de la tecnología de detección, pudiendo realizarse esta última, por ejemplo, y sin limitación, mediante sonda Taqman, así como mediante agentes intercalantes tipo Eva Green. Asimismo, se puede llevar a cabo una amplificación isotérmica con monitorización de la precipitación de fosfato.

En una realización particular del procedimiento, más del 95 % del material genético detectado corresponde a células vivas con el metabolismo de membrana activo.

5 En otra realización particular del procedimiento de la presente invención, la muestra celular es una muestra celular que comprende un microorganismo unicelular. En otra realización aún más particular la muestra celular es una muestra bacteriana, una muestra de hongos o una muestra de parásitos unicelulares.

10 La presente invención comprende cualquier combinación de cualquiera de las realizaciones particulares indicadas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención, de modo que un
15 experto en la materia podría introducir cambios y modificaciones en los ejemplos de realizaciones de la invención sin salirse del alcance de la invención según está definido en las reivindicaciones adjuntas. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en este documento. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo, y sin intención de estar
20 limitados a la presente invención.

Ejemplos

**EJEMPLO 1. Demostración de la utilidad del EMA a bajas concentraciones para
25 identificar si una membrana celular está activa o no.**

Se preparó una suspensión de *Salmonella enteritidis* (número de acceso de la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT 4594) desde un cultivo líquido en medio TSB y en fase exponencial, con un nivel aproximado de $1,10^6$ ufc/mL (ufc= unidades formadoras de
30 colonias), en el tampón Reaction Buffer plus (GenIUL, Terrassa, España). A continuación, se prepararon 4 grupos de 4 alícuotas de 0,5 mL cada uno. Cada grupo de 4 alícuotas se destinó a ensayar una concentración distinta de EMA en el medio de reacción, en concreto 0, 5, 7,5 y 10 μ M.

35 Un primer grupo de 4 alícuotas se sometió a los siguientes pasos:

- 5 (a) a la primera alícuota se añadió m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona (CCCP, agente bloqueante de las bombas de membrana) hasta alcanzar una concentración de 100 μM , incubándose dicha mezcla durante 5 minutos; posteriormente se añadió EMA hasta alcanzar una concentración final de 0 μM , y se incubó a 37 °C en agitación suave durante 30 min;
- (b) a la segunda alícuota se añadió CCCP hasta alcanzar una concentración final de 100 μM ; y se incubó a 37 °C en agitación suave durante 35 min;
- (c) a la tercera alícuota se añadió EMA hasta alcanzar una concentración final de 0 μM , y se incubó a 37 °C en agitación suave durante 35 min; y
- 10 (d) la cuarta alícuota no se trató.

Esto mismo se realizó con las 4 alícuotas de los otros 3 grupos, pero alcanzando concentraciones finales de EMA en la primera alícuota de 5, 7,5 y 10 μM , respectivamente; y en la tercera alícuota de 5, 7,5 y 10 μM , respectivamente.

15 Tras la incubación, una fracción de cada alícuota fue sembrada en TS agar (agar soja triptica) para determinar las ufc. Y otra parte de cada alícuota fue fotoactivada en un equipo PhAST Blue (GenIUL, Terrassa, España) durante 15 min al 100 % de potencia.

20 Los niveles de *Salmonella enteritidis* se determinaron mediante PCR cuantitativa (qPCR, en inglés) (Garrido, A. *et al.*, "In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*" Int. J. Food Microbiol. 2013, Vol. 164, pp. 92-98).

25 No se detectó reducción de señal en las alícuotas sin tratar, alícuotas (d), como era esperable, ni tampoco en aquellas alícuotas que fueron únicamente tratadas con EMA, alícuotas (c). Esto demuestra que sorprendentemente a las concentraciones ensayadas, el EMA no tiene capacidad de causar el efecto que tiene a las concentraciones usadas en el estado de la técnica sobre las células vivas.

30 Por otro lado, los recuentos en placa de ufc obtenidos a partir de las alícuotas expuestas al compuesto CCCP, alícuotas (b), y las alícuotas no expuestas a ningún reactivo, alícuotas (d), no mostraron diferencia alguna, demostrando que el CCCP a concentraciones de 100 μM no es tóxico en los tiempos evaluados.

35

Los resultados recogidos en la FIG. 4 fueron expresados como ΔCt , donde Ct (en inglés, “cycle threshold”, es el ciclo de PCR en el que se detecta señal) y ΔCt es una medida de la reducción de la señal con respecto a la de la alícuota sin tratar con CCCP (c).

5 Como se puede ver en la gráfica de la FIG. 4, en aquellos casos de muestras tratadas con CCCP y EMA, alícuota (a), se redujo la señal proporcionalmente a la concentración de EMA, lo que demuestra que las células vivas con el metabolismo de membrana no activo, no pueden mantener la homeostasis interna, y acumulan EMA en su interior. En definitiva, que el procedimiento de la invención permite diferenciar aquellas células vivas con el
10 metabolismo activo, de aquellas células vivas pero sin metabolismo activo.

EJEMPLO 2. Procedimiento de la invención basado en el uso combinado de PMA y EMA a bajas concentraciones, frente al uso de solo PMA o EMA a la misma baja concentración.

15 Se prepararon tres alícuotas desde una suspensión inactivada (tratada a 85 °C durante 30 min) de *Salmonella enteritidis* (CECT 4594), a partir de un cultivo líquido en caldo TSB y en fase exponencial con un nivel aproximado de $1,10^8$ ufc/mL.

20 Cada alícuota, por duplicado, fue incubada durante 30 min, a temperatura ambiente, en agitación y en ausencia de luz en un medio de reacción (MR) que contenía: 0,1 % de sodio desoxicolato w/v, 0,05 % de polisorbato 80 v/v, 0,8 % de NaCl w/v, solución tamponada a pH 7,2 y digerido pancreático de caseína 0,15 % w/v. Cada duplicado de las tres alícuotas iniciales fue tratado con 10 μ M de EMA, 25 μ M de PMA o 10 μ M de EMA+25 μ M de PMA.

25 Todas las alícuotas fueron sometidas a fotoactivación con un PhAST Blue (GenIUL, Terrassa, España) durante 15 min al 100 % de potencia, y analizadas por qPCR conforme a lo descrito en el EJEMPLO 1.

30 Los resultados recogidos en la FIG. 5 fueron expresados como ΔCt , donde ΔCt es una medida de la reducción de la señal con respecto a un control sin tratar, de manera que a mayor reducción, mayor eficacia del tratamiento.

De los resultados obtenidos se puede concluir que en las muestras tratadas únicamente con
35 EMA o con PMA, se obtienen una reducción de señal equivalente. Sin embargo, el tratamiento combinado con EMA y PMA produce una reducción adicional consecuencia de

la combinación de los dos reactivos de manera simultánea. En definitiva, que a bajas concentraciones de EMA, el PMA puede complementar su efecto.

**EJEMPLO 3. Aplicación del procedimiento combinando EMA a bajas concentraciones,
5 junto con PMA para la detección de células vivas y con metabolismo activo.**

Se prepararon 3 alícuotas desde una suspensión de *Salmonella enteritidis* (CECT 4594) a partir de un cultivo líquido en medio TSB y en fase exponencial con un nivel aproximado de $1,10^5$ ufc/mL.

10

Una primera alícuota se usó de control (células vivas). Una segunda alícuota fue tratada a 85 °C durante 30 min, para matar las bacterias. Y una tercera alícuota fue expuesta a CCCP, a una concentración de 100 µM, durante 30 min, para bloquear los sistemas activos de transporte de membrana, de modo que se obtuvieron células vivas sin actividad, esto es
15 con el transporte de membrana bloqueado.

Cada una de las tres alícuotas anteriores fue sometida, por duplicado, a los siguientes tres tratamientos:

20 - Tratamiento 1: las tres alícuotas, por duplicado, fueron incubadas durante 30 min, a temperatura ambiente, en agitación y en ausencia de luz en un medio de reacción (MR) sin compuestos fotoreactivos, que contenía, 0,1 % de desoxicolato , 0,05 % de tween 80, 0,8 % w/w de NaCl, solución tamponada a pH 7,2 y casaminoácidos 0,15 %.

25 - Tratamiento 2: las tres alícuotas, por duplicado, fueron incubadas durante 30 min, a temperatura ambiente, en agitación y en ausencia de luz en el mismo MR que el usado en el Tratamiento 1, pero que además contenía 10µM de EMA.

30 - Tratamiento 3: las tres alícuotas, por duplicado, fueron incubadas durante 30 min, a temperatura ambiente, en agitación y en ausencia de luz en el mismo MR del Tratamiento 1, pero que contenía además 10µM de EMA y 50 µM de PMA.

Todas las muestras fueron sometidas a fotoactivación con un PhAST Blue (GenIUL, Terrassa, Spain) 15 min al 100 % de potencia; y analizas por qPCR tal y como se describe
35 en EJEMPLO 1.

TABLA 1

	Cycle threshold		
	Sin tratar	EMA 10 μ M	EMA/PMA (10/50 μ M)
Vivas	24,61 \pm 0,52	24,25 \pm 0,22	22,8 \pm 0,28
Muertas	25,08 \pm 0,24	40.00 \pm 1,14	>45
Vivas sin actividad	24,11 \pm 0,72	38,04 \pm 0.38	39,75 \pm 1,12

Los resultados se expresaron en Ct (o ciclo de PCR en el que se detecta señal) de modo que a mayor valor, se necesitaron más ciclos de amplificación por PCR para producir una señal detectable, lo que se traduce en que la concentración inicial de ADN es menor. Valores obtenidos en el intervalo entre aproximadamente 38,2 y 41,5 indican que los niveles de células detectados están entre 1-10 por reacción, con valores aproximadamente por encima de 41,5, la técnica ya no detecta células.

10

De los datos de la TABLA 1 se puede concluir que: 1.- las suspensiones celulares vivas, muertas o vivas sin actividad, si no están expuestas a ningún tratamiento presentan un resultado analítico equivalente; 2.- las suspensiones de células vivas, presentan niveles equivalentes con independencia de que sean tratadas o con EMA o EMA/PMA, por lo que este tratamiento no resulta tóxico; 3.- en el caso de las células muertas se puede ver que el tratamiento con EMA es capaz de neutralizar de forma significativa la señal, y que el tratamiento con EMA/PMA la neutraliza de forma completa, demostrándose la sinergia vista en el EJEMPLO 2.

15

20

En el caso de las células vivas pero sin actividad metabólica, tal y como se demuestra en el EJEMPLO 1, el EMA sí que penetra en ellas reduciendo casi completamente la señal, quedando un residual de 1-10 células sobre un total de $1 \cdot 10^6$. Esto en porcentaje representa que para este ejemplo se puede valorar con un margen de resolución del 0,01 % de error, el nivel de células vivas pero sin el metabolismo activo.

25

No se apreciaron diferencias entre el EMA y el EMA/PMA en lo que refiere al tratamiento sobre suspensiones de células vivas pero sin metabolismo, pues como era de esperar en este estado el único efecto es causado por el EMA.

Referencias

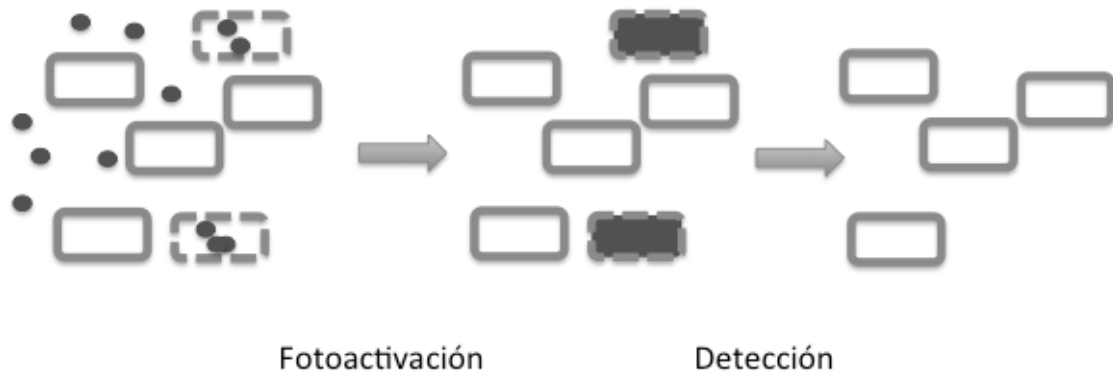
- Rodrigues L., Villellas C., Bailo R., Viveiros M. and Aínsa J.A. "Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*" Antimicrob. Agents Chemother. Feb 2013, Vol. 57, No. 2, pp. 751-7.
- Nocker, A., Cheung, C.Y. and Camper, A.K. "Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells" J. Microbiol. Methods. Nov 2006, Vol. 67, No. 2, pp. 310-20.
- Fittipaldi, M., Codony, F., Adrados, B., Camper, A.K. and, Morató J. "PCR in environmental samples: can all data be interpreted directly?" Microb. Ecol. Jan 2011, Vol. 61, No. 1, pp.7-12.
- Fittipaldi, M., Nocker, A. and Codony F. "Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification" J. Microbiol. Methods. Nov 2012, Vol. 91, No. 2, pp. 276-89.
- Kralik, P., Nocker A. and Pavlik, I. "*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment" Int. J. Food Microbiol. Jul. 2010, Vol. 31, No. 141 (Sup. 1), pp. S80-6).
- Garrido, A., Chapela M.J., Román B., Fajardo P., Vieites J.M. and Cabado A.G.. "In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*" Int. J. Food Microbiol. 2013, Vol. 164, pp. 92-98).




REIVINDICACIONES

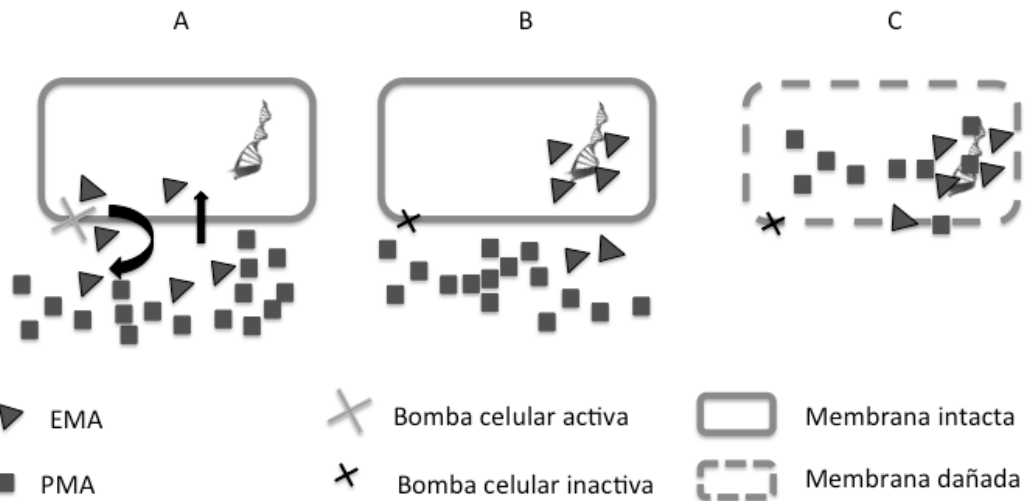
1. Un medio de reacción para diferenciar en una muestra celular, las células con las membranas celulares íntegras y metabólicamente activas, de las células muertas y las vivas sin metabolismo activo de membrana, caracterizado por que el medio de reacción comprende:
- (1) una mezcla de al menos dos agentes desagregantes, donde uno de ellos es un surfactante no iónico o un agente quelante, y el otro es un surfactante aniónico, en proporción entre 1:2 y 1:4 v/v, y donde la mezcla está a una concentración final $\geq 0,1$ %, en el medio de reacción;
 - (2) tampón fosfato a un pH apropiado, compatible con las células de la muestra celular;
 - (3) solución isotónica; y
 - (4) al menos una sustancia activante del metabolismo celular de las células de la muestra en la proporción adecuada en el medio de reacción para activar el metabolismo celular.
2. Medio de reacción según la reivindicación 1, caracterizado por que el surfactante no iónico se selecciona del grupo que consiste en un nonoxinol, un alquilglucósido y un octilfenoletoxilado, y el surfactante aniónico se selecciona del grupo que consiste en lauril sulfato, desoxicolato y lauroil sacosina.
3. Medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la sustancia activante del metabolismo celular es una mezcla de casaminoácidos a una concentración final 0,15 % w/v.
4. Medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende 0,1 % de sodio desoxicolato w/v, 0,05 % de monooleato sorbitán polioxietileno v/v, NaCl a concentración final $\leq 0,8$ % w/v a pH 7,2 y 0,15 % w/v de una mezcla de casaminoácidos.
5. Procedimiento para diferenciar en una muestra celular, las células con las membranas celulares íntegras y metabólicamente activas, de las células muertas y las vivas sin metabolismo activo de membrana, donde el procedimiento comprende los siguientes pasos:
- (1) añadir a la muestra celular el medio de reacción definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-4;

- (2) añadir a la mezcla del paso (1), el compuesto monoazida de etidio (EMA) a una concentración final $\leq 10 \mu\text{M}$;
- (3) dejar incubar la mezcla obtenida en el paso (2) en oscuridad durante el tiempo necesario para que las moléculas de EMA interaccionen con el material genético y que las células metabólicamente activas puedan expulsar las moléculas de EMA que hayan podido entrar en la célula;
- (4) fotoactivar la mezcla obtenida en el paso (3) con una fuente de luz apropiada para activar el EMA;
- (5) lisar la muestra del paso (4) para obtener una mezcla de material genético proveniente de las células muertas, de las células vivas sin metabolismo de membrana y de las células vivas con metabolismo de membrana activo; y
- (6) detectar mediante una técnica de amplificación de ácidos nucleicos, el material genético de las células vivas y con metabolismo de membrana activo, siendo la señal obtenida en este paso proporcional a la cantidad de células con las membranas celulares íntegras y funcionales (o metabólicamente activas).
6. El procedimiento según la reivindicación 5, donde la fuente de luz empleada en el paso (4) emite al menos en un rango entre aproximadamente 455 y 475 nm.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, donde la amplificación del paso (6) se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
8. El procedimiento según la reivindicación 7, donde la PCR es cuantitativa.
9. El procedimiento según la reivindicación 8 donde la detección en la reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo mediante sondas Taqman.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que más del 95 % del material genético detectado corresponde a células vivas con el metabolismo de membrana activo.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, donde en el paso (2) se adiciona el compuesto monoazida de propidio (PMA) en una proporción $\geq 1:5$ EMA:PMA.
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5-11, donde la muestra celular es una muestra celular que comprende un microorganismo unicelular.

13. El procedimiento según la reivindicación 12, donde la muestra celular es una muestra bacteriana, una muestra viral, una muestra de hongos o una muestra de parásitos unicelulares.



-  Membrana intacta
-  Membrana dañada
-  A.F.R



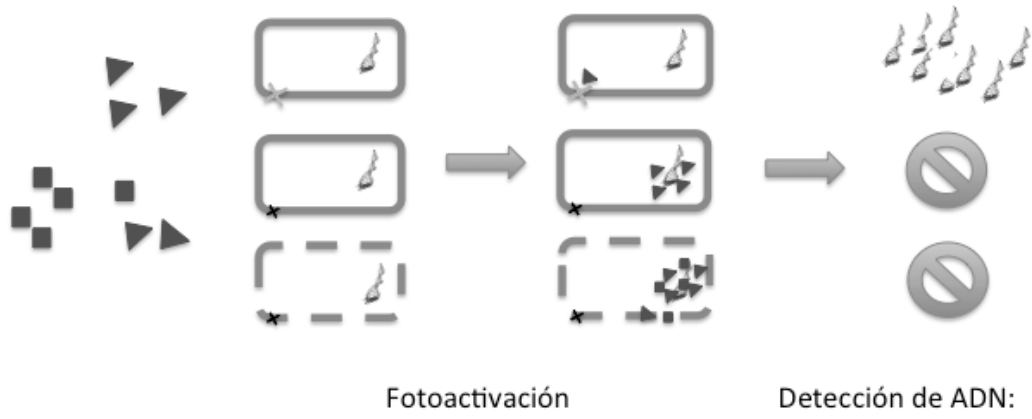


FIG. 3

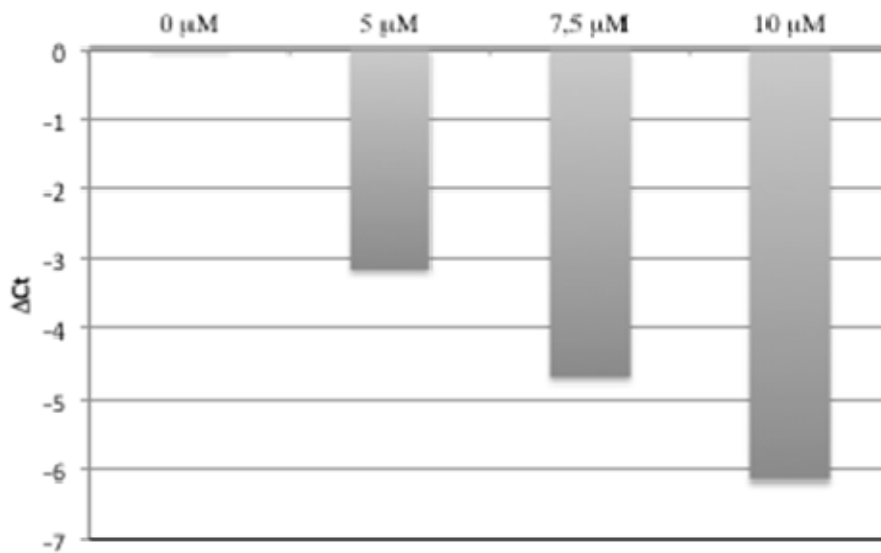


FIG. 4

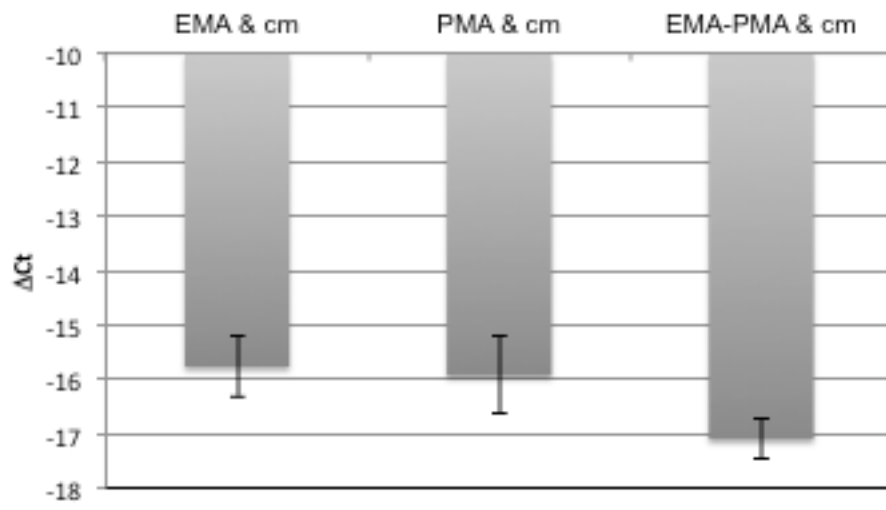


FIG. 5



- ②¹ N.º solicitud: 201431577
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 28.10.2014
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NKUIPOU-KENFACK E., ENGEL H., FAKIH S y NOCKER A. "Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells." Journal of Microbiological Methods (2013) Vol. 93, páginas 20-24.	1-13
A	COUDRAY-MEUNIER C., FRAISSE A., MARTIN-LATIL S., GUILLIER L. y PERELLE A. "Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR." BMC Microbiology (2013) 13:216. Todo el documento.	1-13
A	NOCKER A. y CAMPER A. K. "Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide." Applied and Environmental Microbiology (mar. 2006) páginas 1997-2004.	1-13
A	WO 2007100762 A2 (MONTANA STATE UNIVERSITY) 07.09.2007, todo el documento.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.02.2015

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.02.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	NKUIPOU-KENFACK E., EN GEL H., FAKIH S y NOCKER A. "Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells." Journal of Microbiological Methods (2013) Vol. 93, páginas 20-24.	2013
D02	COUDRAY-MEUNIER C., FRAISSE A., MARTIN-LATIL S., GUILLIER L. y PERELLE A. "Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR." BMC Microbiology (2013) 13:216. Todo el documento.	2013
D03	NOCKER A. and CAMPER A. K. "Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide." Applied and Environmental Microbiology (mar. 2006) páginas 1997-2004.	2006
D04	WO 2007100762 A2 (MONTANA STATE UNIVERSITY)	07.09.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un medio de reacción para diferenciar células con las membranas celulares íntegras y metabólicamente activas de las células muertas de las células muertas y las células vivas sin metabolismo activo de membrana, que comprende una mezcla de surfactante no iónico o agente quelante, surfactante aniónico, tampón fosfato, solución isotónica y una sustancia activante del metabolismo celular (reivindicaciones 1-4).

La presente solicitud de invención también consiste en un procedimiento para diferenciar en una muestra celular, las células con las membranas celulares íntegras y metabólicamente activas (reivindicaciones 5-13).

El documento D01 consiste en un estudio de las diferentes condiciones para aumentar la penetración de propidio monoazida (PMA) en las células muertas de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*, como representante de bacterias gram-negativa y gram-positivas, observándose una fuerte relación entre la eficiencia del tratamiento y la temperatura y tiempo de incubación cuando se trabaja a bajas concentraciones (10 µM). Además, la incubación de células con PMA y desoxicolato sólo resulta beneficioso para *Salmonella* (ver todo el documento).

El documento D02 consiste en un método basado en ensayos de pre-tratamiento-RT-qPCR para discriminar entre los virus infecciosos y no infecciosos después de la inactivación térmica. Para este fin se investigó la unión de EMA y PMA para dichos virus y se optimizó un pretratamiento basado en el uso de agentes intercalantes junto con tensioactivos y la detección de los virus mediante PCR cuantitativa en tiempo real (ver todo el documento).

El documento D03 consiste en un estudio para distinguir células viables de células muertas de las especies *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. Los resultados mostraron que el tratamiento EMA de poblaciones mixtas de estas dos especies proporciona una valiosa herramienta para la eliminación selectiva de ADN de las células no viables mediante el uso de protocolos de extracción convencionales (ver todo el documento).

El documento D04 consiste en el uso de derivados de phenanthridium para distinguir entre células viables con membrana celular activa de las que no, mediante el uso de técnicas PCR (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

La invención reivindicada no es obvia para un experto en la materia, ya que no hay información en los documentos citados que puedan dirigir al experto en la materia al medio de reacción y procedimiento con dicho medio de reacción reivindicados.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-13 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1981.