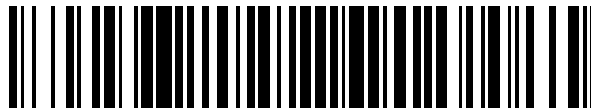


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 481**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/US2012/057705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13049437**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12775098 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2761024**

54 Título: **Dianas moleculares y métodos para cribado de formulación y ensayo de eficacia de conservante**

30 Prioridad:

28.09.2011 US 201161540006 P

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

25.07.2017

73 Titular/es:

**LONZA WALKERSVILLE, INC. (100.0%)
8830 Biggs Ford Road
Walkersville, MD 21793, US**

72 Inventor/es:

**SEOANE, SOPHIE;
GONTARD, STEPHANIE y
COLEMAN, TIMOTHY A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 626 481 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

Dianas moleculares y métodos para cribado de formulación y ensayo de eficacia de conservante

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método y a un kit para distinguir células viables de células no viables. Específicamente, la presente invención se refiere a un método y a un kit para identificar dianas de ARN microbiano (ARNr precursor (pre-ARNr) o ARN mensajero (ARNm)) en microbios (tal como bacterias, levaduras u hongos) que pueden servir como indicadores de la viabilidad celular en un cribado de conservantes o en un Ensayo de Eficacia de Conservante (PET, del inglés "Preservative Efficacy Testing").

Antecedentes de la invención

10 A menudo es necesario distinguir células viables de células no viables o inactivadas. Por ejemplo, uno puede desear distinguir bacterias viables de bacterias no viables en especímenes de paciente. De forma similar, la distinción de células viables de células no viables puede tener aplicación en la investigación/evaluación de cosméticos, en ensayos de liberación farmacéutica, en ensayos relacionados con la pureza/seguridad del agua, y similares.

15 Actualmente, el PET se aplica mediante métodos de cultivo microbiano convencionales que combinan enriquecimiento/crecimiento y recuento en placa. El tiempo necesario para obtener resultados es muy largo. Dependiendo de la acción conservante, las células viables pero no cultivables no son detectadas en estos métodos de cultivo. Además, puede haber presentes patógenos bacterianos en pequeñas cantidades y/o las muestras bacterianas pueden presentar una mala eficiencia en placa, lo que conduce a subestimar el resultado.

20 De forma similar, métodos moleculares como la reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) dirigidos a ARNr microbiano no son capaces de distinguir claramente organismos viables de no viables tras un tratamiento con conservante(s).

25 El documento PCT/US2009/067565 (WO2010/068802) proporciona un análisis proporcional pre-ARNr que incluye composiciones y métodos para detectar la presencia de células viables en una muestra. Dicha memoria describe el ensayo de amplificación de ácido nucleico para detectar moléculas pre-ARNr específicas de especie. Este método requiere el uso de dos conjuntos de muestras. Un primer conjunto de muestras que no es estimulado a crecimiento y un segundo conjunto de muestras que es estimulado con nutrientes/medio de crecimiento antes de la evaluación de las dianas pre-ARNr. El nivel de pre-ARNr en las muestras estimuladas se compara con el nivel de pre-ARNr en las muestras no estimuladas para obtener una indicación de la presencia de células viables frente a células no viables. Tal y como se describe, solo las células viables responden a la exposición a nutrientes, mostrando un aumento de pre-ARNr. En el documento PCT/US2009/067565 esta etapa se denomina ensayo proporcional. Por tanto, la patente PCT/US2009/067565 describe básicamente el reabastecimiento de pre-ARNr que tiene lugar tras estimulación con nutrientes como fundamento para medir las células microbianas viables. Para una diana de ARNm se puede usar una aproximación proporcional similar.

35 El documento US 2004/0265.934 describe la detección de pre-ARNr como medida de la viabilidad bacteriana en la identificación de fármacos antibióticos que reducen o inhiben la transcripción de ARNr. Específicamente, se describen sondas de ensayo de hibridación para detectar una secuencia diana de ARNr de una o más micobacterias presentes opcionalmente en una muestra. De esta manera, la descripción de 2004/0265934 no está dirigida a detectar células viables frente a células no viables. En su lugar, esta descripción proporciona el uso de sondas dirigidas a secuencias diana de ADNr, pre-ARNr o ARNr micobacterianos.

40 De forma similar, el documento 5.770.373 describe métodos y composiciones de sonda de oligonucleótido para determinar la resistencia antibiótica en micobacterias. Este método incluye la evaluación de los niveles de pre-ARNr en las células. Las células son tratadas con medios enzimáticos o mecánicos para exponer la membrana celular a reactivos de lisis; poner en contacto las células con el reactivo de lisis en condiciones que liberen sin degradar el pre-ARNr micobacteriano; y después detectar el pre-ARNr micobacteriano usando una sonda de oligonucleótido. Tal como se describe, el pre-ARNr es detectado como una medida de la sensibilidad de las células micobacterianas a los agentes antimicrobianos. Esta detección se logra mediante una sonda biotinilada en un ensayo de hibridación tipo sándwich quimioluminiscente.

45 El documento WO/1998/018958 proporciona un método para detectar contaminantes microbiológicos vivos en una muestra de producto alimenticio. La invención describe un método para detectar contaminantes microbiológicos vivos en muestras de productos alimenticios que se basa en detectar la presencia de ARNm que codifique para el Factor de Elongación 1 alfa (EF-1 a): un producto génico implicado en la síntesis de proteínas.

50 El documento WO 2010/068802 describe métodos para detectar la presencia de células viables en una muestra detectando precursores de ARN ribosómico (pre-ARNr) como indicadores de microorganismos viables.

Cangelosi et al. (Applied and Environmental Microbiology, Feb. 2010, pág. 960-962) se refieren un análisis pre-ARNr proporcional (RPA) para detectar el reabastecimiento de precursores de ARNr que permite distinguir bacterias viables de bacterias inactivadas.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un método y un kit para ensayos pre-ARNr dirigidos a la detección de células microbianas viables frente a células microbianas no viables. El método y el kit pueden usarse en diferentes plataformas, que incluyen aunque sin limitación el sistema microCompass™. El método y el kit de la presente invención tienen aplicaciones diversas que incluyen, aunque sin limitación, la investigación/evaluación de cosméticos, ensayos de liberación farmacéutica, ensayos relacionados de purificación/seguridad del agua, y similares.

10 En una realización de la invención, se proporciona un método para identificar y cuantificar células microbianas viables en una o más muestras que contienen un microorganismo de interés. En un aspecto, se amplifica ADN específico de especie a partir de muestras que contienen pre-ARNr usando una reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa. La etapa de amplificación implica, por ejemplo, usar un primer cebador complementario a una región pre-ARNr de un microorganismo de interés, usando un segundo cebador complementario a una región de ARNr madura del microorganismo de interés, y llevando a cabo múltiples ciclos de amplificación usando el primer cebador y el segundo cebador para producir niveles detectables de ADN específico de especie amplificado. La etapa de cuantificación implica, por ejemplo, usar una sonda de hibridación marcada fluorescentemente complementaria a la región de ARNr madura del microorganismo de interés, usando el primer cebador complementario a la región pre-ARNr del microorganismo de interés y el segundo cebador complementario a la región de ARNr maduro del microorganismo de interés, y llevar a cabo múltiples ciclos de amplificación usando la sonda de hibridación marcada fluorescentemente y el primer y segundo cebadores para producir niveles incrementados de señal fluorescente por encima del fondo de fluorescencia. La amplificación del ADN específico de especie indica la presencia de células microbianas viables en una o más muestras, y la cuantificación del ADN específico de especie amplificado proporciona una medida relativa de la cantidad de células microbianas viables en una o más muestras.

25 En determinados aspectos de la invención, los microorganismos de interés pueden ser, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* o *Bacillus subtilis*, en cuyo caso los primeros cebadores, los segundos cebadores y las sondas de hibridación marcadas fluorescentemente se diseñan en el extremo 3' de ARNr 16S.

30 En otros aspectos de la invención, los microorganismos de interés pueden ser, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*, en cuyo caso los primeros cebadores, los segundos cebadores y las sondas de hibridación marcadas fluorescentemente se diseñan en el extremo 3' de ARNr 23S.

35 En otro aspecto adicional de la invención, el microorganismo de interés puede ser, por ejemplo, *Aspergillus brasiliensis*, en cuyo caso el primer cebador, el segundo cebador y la sonda marcada fluorescentemente se diseñan en el extremo 5' de ARNr 5.8S.

En otro aspecto de la invención, el método puede implicar la recolección de células sobre un filtro de membrana y lisar las células recolectadas.

40 En otro aspecto, el método puede implicar aplicar la etapa de amplificación y la etapa de cuantificación tanto a la muestra de ensayo como a la muestra de control, conteniendo la muestra de control células no tratadas, y después comparar la medida relativa de la cantidad de células microbianas viables en las muestras de control con la medida relativa de la cantidad de células microbianas viables en la muestra de ensayo.

Se anticipa que el método de la invención es aplicable, por ejemplo, a muestras de cultivos celulares que contienen una o más formulaciones de cultivo o conservantes que necesitan un cribado o evaluar la eficacia.

45 En otro aspecto de la realización, el método puede implicar recolectar células sobre un filtro de membrana y lisar las células recolectadas.

En otro aspecto de la realización, el método puede implicar la aplicación de la etapa de amplificación y de la etapa de cuantificación a una muestra de ensayo y a una muestra de control, muestra de control que contiene células no tratadas, y a continuación comparar la medida relativa de la cantidad de células microbianas viables en las muestras de control con la medida relativa de la cantidad de células microbianas viables en la muestra de ensayo.

50 Se anticipa que el método de la invención es aplicable, por ejemplo, a muestras de cultivos celulares que contienen una o más formulaciones de cultivo o conservantes que necesitan un cribado o evaluar la eficacia.

55 En otra realización adicional de la invención, se proporciona un método para cribado de formulación de cultivo celular o para evaluación de la eficacia de conservante de cultivo celular en donde se llevarían a cabo las siguientes etapas: calibrar las células a una densidad deseada; recolectar las células sobre un filtro de membrana; aplicar nutrientes a dicha membrana para producir células enriquecidas; incubar dichas células enriquecidas; eliminar

nutrientes; añadir tampón de lisis a la membrana; recuperar los lisatos celulares; transferir lisato; extraer y purificar ARN; y amplificar y cuantificar el ADN específico de especies mediante reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa.

5 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan kits para determinar la presencia de células viables frente a células no viables en una muestra de ensayo. Los kits contienen, por ejemplo, cebadores y sondas complementarios, por ejemplo, al extremo 3' de ARNr 16S, el extremo 5' de ARNr 23S, el extremo 5' de ARNr 5.8S.

10 De esta manera se han esbozado, de forma bastante general, las características de la invención para facilitar la comprensión de la descripción detallada de la misma que se presenta a continuación, y para que se pueda apreciar mejor la presente contribución a la técnica. Por supuesto, existen características adicionales de la invención que se describirán con más detalle más adelante.

15 A este respecto, antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y a las disposiciones de los componentes establecidos en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras. La invención permite otras realizaciones y otros modos y formas de ser llevada a la práctica. Asimismo, debe entenderse que las expresiones y la terminología empleadas en la presente memoria tienen un propósito descriptivo y no deberían ser consideradas como limitativas.

Como tal, los especialistas en la técnica apreciarán que la idea en la que se basa esta descripción puede utilizarse fácilmente como fundamento para el diseño de otros métodos y sistemas para llevar a cabo los diversos propósitos de la presente invención. Por tanto, es importante destacar que construcciones equivalentes, en la medida en que no se alejen del espíritu y el alcance de la presente invención, están incluidas en la presente invención.

20 Para un mejor entendimiento de la invención, de sus ventajas operativas y de los objetivos específicos alcanzados mediante sus usos, se debería hacer referencia a las figuras acompañantes y a la materia descriptiva que ilustra las realizaciones preferidas de la invención.

Descripción breve de los dibujos y figuras

Figura 1: ilustra la síntesis de ARN ribosómico y el modelo de maduración de *E. coli*.

25 Figura 2: ilustra el diseño de sistemas específicos de pre-ARNr de *E. coli*, *B. subtilis* y *S. marcescens*.

Figura 3: ilustra el diseño de sistemas específicos de pre-ARNr de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. epidermidis*.

Figura 4: ilustra el diseño de un sistema específico de pre-ARNr de *A. brasiliensis*.

Figura 5: ilustra el diseño de un sistema específico de ARNm EF-3 de *C. albicans*.

Descripción detallada de la invención

30 En la presente memoria se proporciona un método y un kit para identificar pre-ARNr en microbios tales como bacterias, levaduras u hongos. El método puede usarse, por ejemplo, para distinguir células viables de células no viables o células inactivadas en respuesta a un tratamiento seleccionado con agentes químicos o biológicos. Tal como se describe en la presente memoria, se usa RT-PCR para amplificar ADN específico de especie procedente de muestras que contienen pre-ARNr. Éste es cuantificado posteriormente en ciclos de amplificación mediante la
35 detección de una sonda fluorescente hibridada. Para el ensayo de pre-ARNr, la amplificación de la diana se logra usando un cebador complementario a la región pre-ARNr del microbio específico de interés y un segundo cebador complementario a la región de ARNr madura. La sonda de hibridación usada para la cuantificación del producto amplificado es complementaria a la región de ARNr. La amplificación y la cuantificación solo se producen si está presente el pre-ARNr (es decir, el pre-ARNr es abundante en bacterias creciendo activamente).

40 Ensayo de pre-ARNr

La correlación entre el contenido de pre-ARNr celular y la velocidad de crecimiento es una de las primeras y más fundamentales observaciones en la fisiología microbiana. Por ejemplo, en las bacterias *E. coli*, durante el crecimiento rápido (cuando el tiempo de duplicación es inferior a una hora), más del 50 por ciento del ARN total producido es ARNr. La síntesis de ribosomas es por tanto un proceso central en el crecimiento microbiano.

45 Actualmente, el modelo de génesis de ribosomas de *E. coli* es el más completo y se supone que describe la síntesis de ribosomas para la mayoría de las bacterias. Tal como se ilustra en la Figura 1, la síntesis y maduración de ARN de ribosoma en *E. coli* comienza con la transcripción desde el operón *rrn*, produciendo un transcrito *rrn* policistrónico que es procesado posteriormente para liberar moléculas pre-ARNr. Un procesado posterior y la adición de proteínas ribosómicas dan como resultado la formación de moléculas de ARNr completamente maduras. Se cree que la etapa
50 de procesado secundaria es más lenta que la etapa de procesado primaria, lo que produce una agrupación intracelular de pre-ARNrs.

Los pre-ARNr tienen secuencias líder y de cola flanqueando a la secuencia de ARNr maduro. Las secuencias líder y de cola son eliminadas enzimáticamente (ruptura con ARNasa III) del pre-ARNr durante la maduración de ARNr y la construcción de los ribosomas para producir ARNr maduro.

5 Los pre-ARNr están presentes al comienzo de la producción de transcrito de ARNr. La producción de ribosomas maduros implica el procesamiento final de pre-ARNr. Por tanto, la presente invención proporciona beneficios tales como:

- en células bacterianas en crecimiento, los pre-ARNr constituyen una fracción significativa del ARNr total;
- el ARNr maduro es estable en células durmientes y/o muertas;
- las secuencias de pre-ARNr no están presentes en el ARNr maduro;
- 10 • las secuencias de pre-ARNr son filogenéticamente específicas (es decir, no son conservadas); y
- el método reduce el número de falsos positivos con muestras que contienen células no viables y ARNr maduro.

Ensayo de ARNm EF-3

15 Se han diseñado varios sistemas dirigidos a secuencias pre-ARNr en *C. albicans* y se han evaluado con diferentes tratamientos, pero no identificaron claramente el mejor indicador de viabilidad.

Los ejemplos proporcionados en la presente memoria pertenecen a ensayos específicos para microbios de compendio solicitados en las guías PET (EP Capítulo 5.1.3 y USP Capítulo 51): *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC N° 8739, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC N° 9027, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC N° 6538, *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC N° 10231 y *Aspergillus brasiliensis* (*A. brasiliensis*) ATCC N° 16404, y para otros microbios relevantes para los cuales los ensayos de viabilidad son de interés: *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) y *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*).

Ejemplo Uno de Desarrollo de Ensayo

E. coli, *B. subtilis* y *S. marcescens*

25 Los sistemas específicos de *E. coli*, *B. subtilis* y *S. marcescens* se diseñan en el extremo 3' del transcrito ARNr 16S. Los tres sistemas son específicos de especie. En estos ejemplos, el cebador inverso se hibrida en la región pre-ARNr y el cebador directo y la sonda en la región de ARNr maduro. Por tanto, la amplificación será efectiva solo si hay presentes pre-ARNr en las células. La Figura 2 ilustra los sistemas específicos pre-ARNr de *E. coli*, *B. subtilis* y *S. marcescens* diseñados en el extremo 3' del pre-ARNr 16S para uso con RT-PCR (cebador directo, cebador inverso y sonda directa).

Ejemplo Dos de Desarrollo de Ensayo

S. aureus, *P. aeruginosa* y *S. epidermis*

35 Los sistemas específicos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. epidermis* se diseñan en el extremo 5' del transcrito ARNr 23 S. Los tres sistemas son específicos de especie. El cebador directo se hibrida en la región pre-ARNr y el cebador inverso y la sonda directa en la región de ARNr maduro. La amplificación es por tanto efectiva solo si hay presentes pre-ARNr en las células. La Figura 3 ilustra los sistemas específicos pre-ARNr de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. epidermis* diseñados en el extremo 5' del pre-ARNr 23 S para uso con RT-PCR (cebador directo, cebador inverso y sonda directa).

Ejemplo Tres de Desarrollo de Ensayo

A. brasiliensis

40 Los sistemas específicos de *A. brasiliensis* se diseñan en el extremo 5' del transcrito ARNr 5.8S. Los tres sistemas son específicos de especie. El cebador directo se hibrida en la región pre-ARNr y el cebador inverso y la sonda directa en la región de ARNr maduro. La amplificación es por tanto efectiva solo si hay presentes pre-ARNr en las células. La Figura 4 ilustra los sistemas específicos pre-ARNr de *A. brasiliensis* diseñados en el extremo 5' del pre-ARNr 5.8S para uso con RT-PCR (cebador directo, cebador inverso y sonda directa).

Ejemplo Cuatro de Desarrollo de Ensayo

Ensayo específico de ARNm EF-3 de *C. albicans*

50 El sistema específico para *C. albicans* se diseña en el ARNm del gen EF-3. Este sistema es específico de especie. El cebador directo, la sonda directa y el cebador inverso se hibridan en la secuencia interna del ARNm del gen EF-3. La amplificación por tanto solo es efectiva si hay ARNm EF-3 en las células. La Figura 5 ilustra el sistema específico de ARNm EF-3 de *C. albicans* diseñado en la secuencia interna del ARNm EF-3 para uso con RT-PCR (cebador directo, cebador inverso y sonda directa).

Protocolo para cribado de formulación y/o ensayo de eficacia de conservante (PET)

Se pueden usar ensayos como los descritos en la presente memoria, y ensayos desarrollados bajo la guía de los ejemplos proporcionados, en el cribado de formulación y/o en el ensayo de eficacia de conservante. Un ejemplo de protocolo es el siguiente: se analizan células no tratadas (o viables) y células tratadas con conservante en paralelo con el mismo procedimiento y los mismos reactivos:

- 5
 - Se calibran las células hasta una densidad esperada (CFU/mL) y se recolectan mediante centrifugación en un filtro de membrana.
 - Se aplican dos mililitros de “RNA Booster” (nutrientes) a la membrana de la unidad de filtración y se incuban dos horas para bacterias y cuatro horas para hongos a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (o a la temperatura apropiada).
- 10
 - Tras la incubación, las unidades de filtración son centrifugadas para eliminar el “RNA Booster” y se añaden 1,5 mililitros de tampón de lisis a cada membrana.
 - Se recuperan los lisatos celulares manualmente pipeteando y transfiriéndolos a un tubo de lisis para un proceso de lisis mecánico.
 - A continuación se transfiere el lisato a un tubo de preparación de muestra.
- 15
 - Se extrae el ARN y se purifica usando un método de aislamiento de ácido nucleico conocido (es decir, partículas magnéticas de ARN, resina de sílice).
 - Se elimina el ARN mediante tratamiento con ADNasa para asegurar predominantemente una diana de ARN.
- 20
 - El ARN eluido es amplificado mediante RT-PCR. La mezcla madre usada para la RT-PCR contiene todos los reactivos necesarios para RT-PCR, que incluyen los cebadores específicos y la sonda dirigida a las secuencias pre-ARNr.

Las guías referidas seguidas para este ensayo son la “European Pharmacopoeia (EP) – Chapter 5.1.3 – Efficacy of Antimicrobial Preservation”, y la “United States Pharmacopeia (USP) – Chapter 51 – Antimicrobial Effectiveness Testing”. El valor obtenido mediante RT-PCR para las células no tratadas se compara con el valor obtenido para las células tratadas. Tal como se usa en la presente memoria Ct significa ciclo de umbral, es decir, la intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral. Según los requisitos de la EP, en un resultado positivo como el descrito en la presente memoria la diferencia de los valores Ct es al menos 3 logs, que corresponde a un $\Delta\text{Ct} > 10$ para bacterias y al menos 2 logs, que corresponde a un $\Delta\text{Ct} > 6,6$ para hongos, tras un día (24 horas) y siete días, respectivamente, para bacterias y hongos, de tratamiento con conservante. La USP requiere un análisis de datos tras siete días y catorce días para bacterias y hongos, respectivamente.

Datos experimentales

Los ensayos pre-ARNr específicos descritos en la presente memoria se determinan con los siguientes microbios: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. marcescens*, *B. subtilis*, *S. epidermis* y *A. brasiliensis*. Se usan seis métodos de tratamiento diferentes: muerte por calor e isopropanol, tratamientos conservativos con BAC (cloruro de benzalconio), Poli-Q (PolyQuaternium) e IPBC (yodopropinil butilcarbamato) y una disolución comercial para lentes de contacto (que está formulada con otros productos químicos además de dos conservantes (poliaminopropil biguanida y polyquaternium)). Se determina la eficacia de estos compuestos químicos.

Los tratamientos con conservante fueron evaluados a elevadas concentraciones celulares (10^6 y 10^5 células por ensayo) que se usan habitualmente para cribados de formulación. Se analizaron cinco réplicas para cada concentración celular. El valor Ct corresponde al ciclo de RT-PCR para el cual el nivel de fluorescencia sobresale por encima de la fluorescencia de fondo. El método compara los valores Ct para células no tratadas y células tratadas y se expresa como ΔCt .

Las tablas presentadas a continuación incluyen los valores Ct obtenidos para seis bacterias y dos hongos usando seis tratamientos: Calor, Isopropanol, Conservantes BAC, Poly-Q e IPBC, y una disolución comercial para lentes de contacto. Los valores Ct obtenidos para células no tratadas (viables) se comparan con los valores Ct obtenidos para las células tratadas. Se presenta el ΔCt calculado que debe ser ≥ 10 para cumplir la especificación de una reducción de 3 logs para bacterias, y debe ser ≥ 6.6 para cumplir la especificación de una reducción de 2 logs para hongos. Todos los ensayos se llevan a cabo en el instrumento BD Max6 de Becton Dickinson. Los datos son obtenidos por operarios múltiples en días diferentes.

50

ES 2 626 481 T3

Tratamiento de muerte por calor

Tabla 1: Resultados obtenidos con *Escherichia coli* y el tratamiento de muerte por calor (80°C ± 2°C, 90 minutos):

<i>E. coli</i> – Muerte por calor - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>E coli</i> 10 ⁶ células	10,38	10,76	29,91	31,53	20,78
	10,42		29,92		
	11,05		31,80		
	11,18		34,79		
	13,81		31,26		
<i>E coli</i> 10 ⁵ células	13,86	13,91	31,50	31,58	17,68
	13,71		32,09		
	13,62		31,46		
	14,08		31,37		
	14,27		31,49		
NC	35,03	35,65	36,93	36,57	
	36,26		36,21		
NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10 ⁶ células) no muestra colonias en placa.					
<i>E. coli</i> - Muerte por calor - Operario 2					
Muestras	Cut Viable	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>E coli</i> 10 ⁶ células	25,39	11,39	32,42	31,68	20,29
	11,81		32,61		
	11,20		31,45		
	11,28		31,12		
	11,27		30,81		
<i>E coli</i> 10 ⁵ células	13,77	13,66	30,56	30,93	17,26
	13,27		31,60		
	14,21		30,83		
	13,81		31,07		
	13,26		30,58		
NC	32,46	34,75	33,90	33,55	
	37,04		33,20		
NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10 ⁶ células) no muestra colonias en placa.					

ES 2 626 481 T3

Tabla 2: Resultados obtenidos con *Pseudomonas aeruginosa* y el tratamiento de muerte por calor (80°C ± 2°C, 90 minutos):

<i>P. aeruginosa</i> - Muerte por calor - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁶ células	18,48	18,93	29,89	31,15	12,21
	18,92		32,13		
	18,41		30,58		
	20,34		31,95		
	18,52		31,18		
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁵ células	21,10	21,58	33,35	32,97	11,39
	22,09		33,66		
	21,32		32,06		
	21,95		32,80		
	21,43		Negativo		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	38,52	
	Negativo		38,52		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 3: Resultados obtenidos con *Staphylococcus aureus* y el tratamiento de muerte por calor (80°C ± 2°C, 90 minutos):

<i>S. aureus</i> - Muerte por calor - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. aureus</i> 10 ⁶ células	12,65	12,67	26,90	26,14	13,47
	12,69		26,19		
	12,68		26,16		
	12,69		26,03		
	12,65		25,42		
<i>S. aureus</i> 10 ⁵ células	16,88	16,96	29,10	29,29	12,33
	17,05		29,61		
	16,94		28,33		
	17,10		29,84		
	16,85		29,57		
NC	Negativo	39,73	38,18	38,18	
	39,73		Negativo		

ES 2 626 481 T3

S. aureus - Muerte por calor - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10 ⁶ células) no muestra colonias en placa.					

Tabla 4: Resultados obtenidos con *Serratia marcescens* y el tratamiento de muerte por calor (80°C ± 2°C, 90 minutos):

S. marcescens - Muerte por calor					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. marcescens</i> 10 ⁶ células	13,40	12,88	31,40	30,96	18,08
	12,80		31,30		
	12,40		31,60		
	13,10		31,00		
	12,70		29,50		
<i>S. marcescens</i> 10 ⁵ células	17,50	17,00	31,70	31,36	14,36
	16,00		31,70		
	15,90		30,70		
	18,90		32,00		
	16,70		30,70		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	39,40	
	Negativo		39,40		
NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10 ⁶ células) no muestra colonias en placa.					

Tabla 5: Resultados obtenidos con *Bacillus subtilis* y el tratamiento de muerte por calor (80°C ± 2°C, 90 minutos):

B. subtilis - Muerte por calor - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>B. subtilis</i> 10 ⁶ células	15,79	17,54	28,00	28,92	11,38
	17,44		29,61		
	15,94		30,27		
	19,20		28,82		
	19,33		27,90		
<i>B. subtilis</i> 10 ⁵ células	19,23	18,78	31,56	31,48	12,70
	18,90		31,67		
	19,85		31,20		
	18,16		31,73		

ES 2 626 481 T3

<i>B. subtilis</i> - Muerte por calor - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
	17,78		31,26		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10^6 células) no muestra colonias en placa.

Tabla 6: Resultados obtenidos con *Staphylococcus epidermidis* y el tratamiento de muerte por calor ($80^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 90 minutos):

<i>S. epidermidis</i> - Muerte por calor					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. epidermidis</i> 10^6 células	16,48	16,61	28,67	28,11	11,50
	16,64		27,97		
	16,90		27,91		
	16,89		28,20		
	16,17		27,81		
<i>S. epidermidis</i> 10^5 células	21,73	21,16	30,66	31,19	10,03
	21,05		31,57		
	20,64		31,35		
	21,13		31,14		
	21,23		31,21		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10^6 células) no muestra colonias en placa.

Tabla 7: Resultados obtenidos con *Candida albicans* y el tratamiento de muerte por calor ($80^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 90 minutos) (sin ser parte de la invención):

<i>C. albicans</i> - Muerte por calor					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>C. albicans</i> 10^5 células	17,60	17,82	28,10	27,94	10,12
	18,00		28,00		
	18,00		28,20		
	17,40		27,80		
	18,10		27,60		

C. albicans - Muerte por calor					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
NC	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁵ células) no muestra colonias en placa.

Tratamiento con isopropanol

Tabla 8: Resultados obtenidos con *Escherichia coli* y tratamiento con isopropanol (1h a temperatura ambiente):

E. coli – Muerte por isopropanol - Operario 2					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>E. coli</i> 10 ⁶ células	11,81	11,93	32,98	32,93	21,00
	12,10		33,93		
	11,52		32,91		
	11,99		32,51		
	12,21		32,31		
<i>E. coli</i> 10 ⁵ células	14,67	14,88	33,02	32,44	17,56
	14,64		33,36		
	15,34		32,52		
	15,26		31,38		
	14,50		31,93		
NC	35,41	34,12	34,52	34,61	
	32,83		34,71		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 9: Resultados obtenidos con *Pseudomonas aeruginosa* y tratamiento con isopropanol (1h a temperatura ambiente):

P. aeruginosa - Muerte por isopropanol - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁶ células	19,91	20,25	34,18	33,70	13,45
	19,51		33,26		
	21,25		34,59		
	19,63		33,28		
	20,97		33,21		
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁵ células	23,17	24,31	34,62	35,31	10,99
	23,83		34,83		

<i>P. aeruginosa</i> - Muerte por isopropanol - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
	23,23		34,29		
	26,43		33,99		
	24,90		38,81		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 10: Resultados obtenidos con *Staphylococcus aureus* y tratamiento con isopropanol (1h a temperatura ambiente):

<i>S. aureus</i> - Muerte por isopropanol - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. aureus</i> 10 ⁶ células	23,71	12,81	24,94	25,90	13,09
	12,87		26,57		
	12,62		26,32		
	12,77		26,40		
	12,99		25,27		
<i>S. aureus</i> 10 ⁵ células	16,67	16,88	29,99	29,68	12,80
	17,17		29,43		
	16,62		29,12		
	16,76		29,97		
	17,17		29,89		
NC	Negativo	24,20	Negativo	Negativo	
	24,20		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 11: Resultados obtenidos con *Serratia marcescens* y tratamiento con isopropanol (1h a temperatura ambiente):

<i>S. marcescens</i> - Muerte por isopropanol					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. marcescens</i> 10 ⁶ células	12,00	12,80	25,40	25,98	13,18
	12,40		25,50		
	13,20		26,90		

S. marcescens - Muerte por isopropanol					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
	13,10		26,20		
	13,30		25,90		
S. marcescens 10 ⁵ células	18,10	17,00	29,10	30,20	13,20
	16,50		30,70		
	18,10		31,00		
	16,40		29,90		
	15,90		30,30		
NC	36,60	37,45	Negativo	Negativo	
	38,30		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa,

Tratamiento con conservante BAC

Tabla 12: Resultados obtenidos con *Escherichia coli* y tratamiento con conservante BAC (24h a temperatura ambiente):

E. coli – Muerte con conservante BAC - Operario 2					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
E. coli 10 ⁶ células	11,60	11,56	30,48	32,90	21,33
	11,33		33,39		
	11,30		32,61		
	10,85		34,26		
	12,73		33,74		
E. coli 10 ⁵ células	13,40	13,67	32,65	32,23	18,57
	13,81		31,54		
	13,37		31,77		
	14,23		32,76		
	13,53		32,45		
NC	34,98	35,06	31,94	32,35	
	35,14		32,76		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 13: Resultados obtenidos con *Pseudomonas aeruginosa* y tratamiento con conservante BAC (24h a temperatura ambiente):

<i>P. aeruginosa</i> - Muerte con conservante BAC - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁶ células	16,10	16,19	27,96	30,72	14,53
	16,39		Negativo		
	16,65		Negativo		
	15,56		Negativo		
	16,24		33,48		
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁵ células	19,53	19,53	Negativo	31,92	12,39
	20,04		Negativo		
	19,47		31,09		
	19,43		33,12		
	19,18		31,55		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 14: Resultados obtenidos con *Staphylococcus aureus* y tratamiento con conservante BAC (24h a temperatura ambiente):

<i>S. aureus</i> - Muerte con conservante BAC - Operario 2					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. aureus</i> 10 ⁶ células	13,91	14,07	26,71	26,72	12,65
	13,96		26,64		
	14,09		26,23		
	14,25		27,50		
	14,15		26,54		
<i>S. aureus</i> 10 ⁵ células	17,53	17,45	29,75	29,73	12,29
	17,88		30,23		
	17,23		29,39		
	17,30		29,28		
	17,30		30,03		
NC	Negativo	Negativo	37,75	37,83	
	Negativo		37,91		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 15: Resultados obtenidos con *Serratia marcescens* y tratamiento con conservante BAC (24h a temperatura ambiente):

S. marcescens - Muerte con conservante BAC					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. marcescens</i> 10 ⁶ células	11,60	11,93	32,80	34,20	22,28
	12,10		35,50		
	12,30		34,20		
	11,70		34,30		
<i>S. marcescens</i> 10 ⁵ células	15,30	16,04	Negativo	36,13	20,09
	15,20		Negativo		
	15,80		36,40		
	16,10		35,30		
	17,80		36,70		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 16: Resultados obtenidos con *Aspergillus brasiliensis* y tratamiento con conservante BAC (del día 1 al día 7 a temperatura ambiente):

<i>A. brasiliensis</i> - Muerte con conservante BAC						
	Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
Día 1	<i>A. brasiliensis</i> 10 ⁶ células	10,00	10,20	22,10	21,83	11,63
		10,60		21,80		
		10,00		21,60		
Día 2	<i>A. brasiliensis</i> 10 ⁶ células	10,00	10,20	22,40	22,73	12,53
		10,60		21,90		
		10,00		23,90		
Día 7	<i>A. brasiliensis</i> 10 ⁶ células	10,00	10,20	22,60	23,27	13,07
		10,60		24,70		
		10,00		22,50		
	NC	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 17: Resultados obtenidos con *Candida albicans* y tratamiento con conservante BAC (del día 1 al día 14 a temperatura ambiente) (no pertenece a la invención):

<i>C. albicans</i> – Tratamiento con conservante BAC						
	Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
Día 1	<i>C. albicans</i> 10 ⁵ células	18,30	18,10	29,30	32,00	13,90
		17,80		33,70		
		18,10		32,70		
		18,10		31,60		
		18,20		32,70		
Día 7	<i>C. albicans</i> 10 ⁵ células	18,30	18,10	Negativo	33,67	15,57
		17,80		34,60		
		18,10		34,10		
		18,10		32,30		
		18,20		Negativo		
Día 14	<i>C. albicans</i> 10 ⁵ células	18,30	18,10	Negativo	32,23	14,13
		17,80		31,60		
		18,10		32,70		
		18,10		32,00		
		18,20		32,60		
	NC	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁵ células) no muestra colonias en placa.

Tratamiento con conservante Poly-Q

Tabla 18: Resultados obtenidos con *Escherichia coli* y tratamiento con conservante Poly-Q (24h a temperatura ambiente):

<i>E. coli</i> – Muerte por conservante Poly-Q - Operario 2					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>E. coli</i> 10 ⁶ células	11,60	11,56	error mix	20,19	8,62
	11,33		21,55		
	11,30		19,31		
	10,85		18,30		
	12,73		21,58		
<i>E. coli</i> 10 ⁵ células	13,40	13,67	23,28	26,59	12,92
	13,81		22,62		
	13,37		30,10		
	14,23		32,51		

ES 2 626 481 T3

<i>E. coli</i> – Muerte por conservante Poly-Q - Operario 2					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
	13,53		24,43		
NC	34,98	35,06	31,00	31,80	
	35,14		32,59		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) muestra una gran cantidad de colonias en la placa (> 300). El tratamiento no es efectivo al 100%.

Tabla 19: Resultados obtenidos con *Pseudomonas aeruginosa* y tratamiento con conservante Poly-Q (24h a temperatura ambiente):

<i>P. aeruginosa</i> - Muerte por conservante Poly-Q - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁶ células	16,10	16,19	24,35	24,34	8,15
	16,39		25,62		
	16,65		24,41		
	15,56		24,07		
	16,24		23,22		
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁵ células	19,53	19,53	26,65	27,19	7,66
	20,04		28,11		
	19,47		27,65		
	19,43		27,45		
	19,18		26,10		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

Tabla 20: Resultados obtenidos con *Staphylococcus aureus* y tratamiento con conservante Poly-Q (24h a temperatura ambiente):

<i>S. aureus</i> - Muerte por conservante Poly-Q - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. aureus</i> 10 ⁶ células	13,46	12,89	22,99	22,94	10,05
	12,82		23,06		
	12,67		21,45		
	12,61		23,01		
	12,89		24,19		

S. aureus - Muerte por conservante Poly-Q - Operario 1					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
S. aureus 10 ⁵ células	16,07	16,34	24,39	26,02	9,68
	16,77		26,08		
	16,14		26,47		
	16,27		26,39		
	16,46		26,76		
NC	Negativo	36,29	Negativo	Negativo	
	36,29		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) muestra pocas colonias sobre la placa (30). El tratamiento no es efectivo al 100%.

Tabla 21: Resultados obtenidos con *Serratia marcescens* y tratamiento con conservante Poly-Q (24h a temperatura ambiente):

S. marcescens - Muerte por conservante Poly-Q					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
S. marcescens 10 ⁶ células	11,60	11,93	21,40	22,48	10,55
	12,10		24,50		
	12,30		22,90		
	11,70		21,10		
S. marcescens 10 ⁵ células	15,30	16,04	31,20	29,50	13,46
	15,20		25,40		
	15,80		29,40		
	16,10		33,00		
	17,80		28,50		
NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) muestra colonias sobre la placa (> 300). El tratamiento no es efectivo al 100%.

Tratamiento con conservante IPBC

Tabla 22: Resultados obtenidos con *Aspergillus brasiliensis* y tratamiento con conservante IPBC (del día 1 al día 7 a temperatura ambiente):

A. brasiliensis- Tratamiento con conservante IPBC					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas

<i>A. brasiliensis</i> - Tratamiento con conservante IPBC						
	Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
Día 1	<i>A. brasiliensis</i> 10 ⁶ células	11,00	10,98	15,20	15,48	4,50
		11,20		15,20		
		10,80		15,20		
		10,50		15,80		
		11,40		16,00		
Día 2	<i>A. brasiliensis</i> 10 ⁶ células	11,00	10,98	26,30	25,22	14,24
		11,20		23,80		
		10,80		24,60		
		10,50		24,30		
		11,40		27,10		
Día 7	<i>A. brasiliensis</i> 10 ⁶ células	11,00	10,98	24,80	23,72	12,74
		11,20		23,50		
		10,80		23,10		
		10,50		22,70		
		11,40		24,50		
	NC	Negativo		Negativo		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) muestra colonias sobre la placa (> 300) en el día 1, y ninguna colonia en el día 2 y en el día 7.

Tabla 23: Resultados obtenidos con *Candida albicans* y tratamiento con conservante IPBC (del día 1 al día 7 a temperatura ambiente) (no pertenece a la invención):

<i>C. albicans</i> - Tratamiento con conservante IPBC						
	Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
Día 1	<i>C. albicans</i> 10 ⁵ células	18,30	18,10	29,00	29,70	11,60
		17,80		28,40		
		18,10		33,30		
		18,10		29,40		
		18,20		28,40		
Día 7	<i>C. albicans</i> 10 ⁶ células	18,30	18,10	32,30	32,70	14,60
		17,80		32,80		
		18,10		32,80		
		18,10		32,80		

<i>C. albicans</i> - Tratamiento con conservante IPBC						
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas	
	18,20		32,80			
Día 14	18,30	18,10	Negativo	36,43	18,33	
	17,80		37,00			
	18,10		36,60			
	18,10		35,30			
	18,20		36,80			
NC	Negativo		Negativo			

NC - Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10^5 células) muestra colonias sobre la placa (> 300) en el día 1, y ninguna colonia en el día 7 y en el día 14.

Tratamiento con disolución comercial de lentes de contacto

Tabla 24: Resultados obtenidos con *Escherichia coli* y tratamiento con una disolución comercial de lentes de contacto (24h a temperatura ambiente):

<i>E. coli</i> – Disolución comercial de lentes de contacto					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>E. coli</i> 10^6 células	12,90	13,72	32,20	29,80	16,08
	13,80		30,80		
	13,50		31,50		
	15,00		26,90		
	13,40		27,60		
<i>E. coli</i> 10^5 células	15,90	16,28	32,20	31,73	15,45
	17,40		34,00		
	15,70		31,90		
	16,90		28,80		
	15,50		NT		
NC	36,10	34,55	32,40	33,20	
	33,00		34,00		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10^6 células) no muestra colonias en placa.

Tabla 25: Resultados obtenidos con *Serratia marcescens* y tratamiento con una disolución comercial de lentes de contacto (24h a temperatura ambiente):

<i>S. marcescens</i> - Disolución comercial de lentes de contacto					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas

<i>S. marcescens</i> - Disolución comercial de lentes de contacto					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. marcescens</i> 10 ⁶ células	12,90	12,70	28,80	27,94	15,24
	12,20		27,80		
	12,70		27,70		
	12,30		27,80		
	13,40		27,60		
<i>S. marcescens</i> 10 ⁵ células	17,60	16,70	33,20	32,56	15,86
	16,90		31,70		
	16,20		33,90		
	17,00		31,30		
	15,80		32,70		
NC	38,30	38,35	Negativo	38,80	
	38,40		38,80		

NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa.

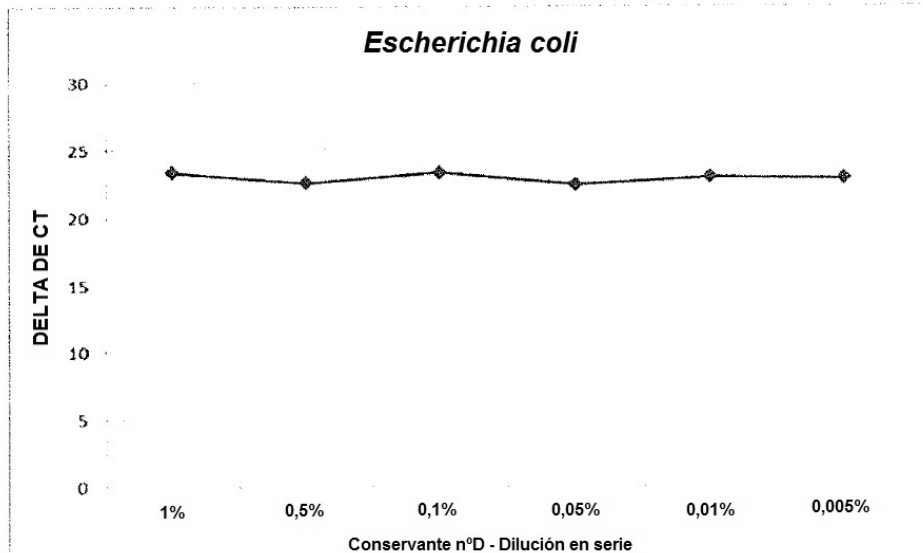
Tabla 26: Resultados obtenidos con *Candida albicans* y tratamiento con una disolución comercial de lentes de contacto (del día 1 al día 7 a temperatura ambiente):

<i>C. albicans</i> - Disolución comercial de lentes de contacto						
	Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
Día 1	<i>C. albicans</i> 10 ⁵ células	17,10	17,32	32,20	30,26	12,94
		17,20		32,90		
		17,70		29,90		
		17,50		28,00		
		17,10		28,30		
Día 7	<i>C. albicans</i> 10 ⁵ células	17,10	17,32	35,10	31,16	13,84
		17,20		31,10		
		17,70		30,30		
		17,50		29,70		
		17,10		29,60		
	NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	

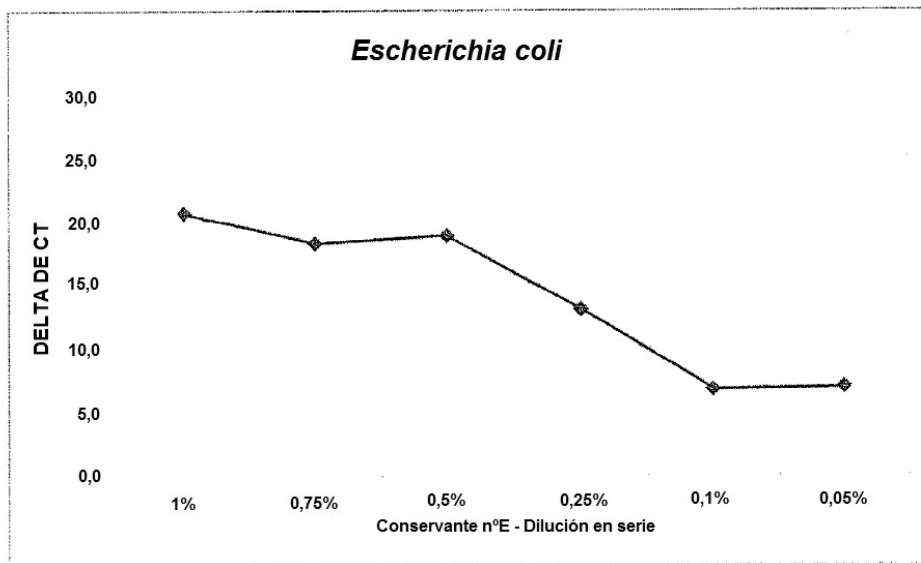
NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁵ células) no muestra colonias en placa.

Aplicación de cribado de conservantes

Tabla 27: Resultados obtenidos con *Escherichia coli* y una aplicación de cribado de conservante.



Este conservante D es efectivo entre 1% y 0,005%. La placa de control de células tratadas (10^6 células) no muestra colonias en placa para todas las diluciones de conservante.



Este conservante E no es efectivo a bajas concentraciones. La placa de control de células tratadas (10^6 células) muestra colonias sobre la placa (> 300) para 0,25%, 0,1% y 0,05%.

10 Tal como se ilustra en la presente memoria, el tiempo para obtener resultados usando el método y el kit de la presente invención se reduce significativamente. Se llevaron a cabo ensayos pre-ARNr y ARNm EF-3 en dos días (dependiendo de la duración del tratamiento con conservante), mientras que los métodos convencionales requieren cinco días o más, dependiendo de las tasas de crecimiento del organismo seleccionado.

15 Además, las células viables pero no cultivables son detectadas mediante RT-PCR, pero no mediante métodos basados en crecimiento, por lo que se reduce el número de falsos negativos. Adicionalmente, los datos experimentales demuestran que utilizar como objetivo el pre-ARNr con un sistema RT-PCR es una herramienta útil para distinguir células viables (no tratadas) de no células no viables (tratadas).

Los problemas técnicos observados con los ensayos de RT-PCR dirigidos a secuencias de ARNr maduras se solventan usando este sistema. Se obtuvo un ΔCt de cuatro a cinco usando las secuencias de ARNr maduras (datos no mostrados) mientras que usando los sistemas pre-ARNr se obtuvo un $\Delta Ct \geq 10$.

5 El tratamiento con Poly-Q no mostró una eliminación efectiva ya que las placas de control post-tratamiento todavía presentan crecimiento bacteriano, y por tanto el ΔCt es significativamente menor, especialmente para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

En general, en base a los datos obtenidos hasta la fecha, los sistemas diseñados seleccionados de pre-ARNr y ARNm son específicos de especie y pueden usarse para cribado de formulación y para el Ensayo de eficacia de conservante en una matriz filtrable.

10 Se pueden establecer nuevos protocolos optimizados en caso de interferencia de PCR debido a inhibidores procedentes de la matriz evaluada. Dichas optimizaciones pueden incluir nuevos tratamientos o etapas de lavado del filtro de membrana.

Los ensayos contemplados incluyen un Control de Proceso Interno (IPC) que asegura la eficacia del proceso de extracción y amplificación de pre-ARNr y ARNm.

15 Habiendo sido descritas algunas realizaciones de la invención, debería ser evidente para los especialistas en la técnica que todo lo anterior es meramente ilustrativo y no limitativo, habiendo sido presentado únicamente a modo de ejemplo. Numerosas modificaciones y otras realizaciones quedan al alcance del especialista en la técnica, y se contempla que entren dentro del alcance de la invención y de cualquier equivalente de la misma. Se puede apreciar que variaciones de la presente invención serían fácilmente evidentes para los especialistas en la técnica, y la presente invención pretende incluir dichas alternativas. Adicionalmente, puesto que a los especialistas en la técnica se les pueden ocurrir fácilmente numerosas modificaciones, no se desea limitar la invención a la construcción y operación exactas ilustradas y descritas y, por consiguiente, todas las modificaciones y equivalentes pueden clasificarse como pertenecientes al alcance de la invención.

20

Tratamiento con disolución comercial de lentes de contacto

25 Tabla 24: Resultados obtenidos con *Escherichia coli* y tratamiento con una disolución comercial de lentes de contacto (24h a temperatura ambiente):

E. coli – Disolución comercial de lentes de contacto					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	ΔCt Viables-Muertas
<i>E. coli</i> 10 ⁶ células	12,90	13,72	32,20	29,80	16,08
	13,80		30,80		
	13,50		31,50		
	15,00		26,90		
	13,40		27,60		
<i>E. coli</i> 10 ⁵ células	15,90	16,28	32,20	31,73	15,45
	17,40		34,00		
	15,70		31,90		
	16,90		28,80		
	15,50		NT		
NC	36,10	34,55	32,40	33,20	
	33,00		34,00		

<i>E. coli</i> – Disolución comercial de lentes de contacto					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10 ⁶ células) no muestra colonias en placa.					

Tabla 25: Resultados obtenidos con *Serratia marcescens* y tratamiento con una disolución comercial de lentes de contacto (24h a temperatura ambiente):

<i>S. marcescens</i> - Disolución comercial de lentes de contacto					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
<i>S. marcescens</i> 10 ⁶ células	12,90	12,70	28,80	27,94	15,24
	12,20		27,80		
	12,70		27,70		
	12,30		27,80		
	13,40		27,60		
<i>S. marcescens</i> 10 ⁵ células	17,60	16,70	33,20	32,56	15,86
	16,90		31,70		
	16,20		33,90		
	17,00		31,30		
	15,80		32,70		
NC	38,30	38,35	Negativo	38,80	
	38,40		38,80		
NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10 ⁶ células) no muestra colonias en placa.					

Tabla 26: Resultados obtenidos con *Candida albicans* y tratamiento con una disolución comercial de lentes de contacto (del día 1 al día 7 a temperatura ambiente):

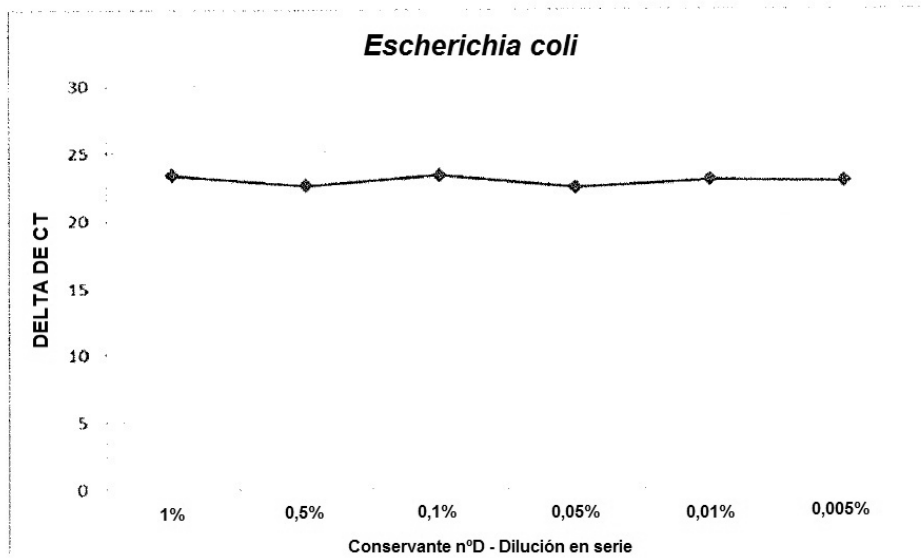
<i>C. albicans</i> - Disolución comercial de lentes de contacto					
Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
Día 1 <i>C. albicans</i> 10 ⁵ células	17,10	17,32	32,20	30,26	12,94
	17,20		32,90		
	17,70		29,90		

<i>C. albicans</i> - Disolución comercial de lentes de contacto						
	Muestras	Ct Viables	Ct medio	Ct Tratadas	Ct medio	Δ Ct Viables-Muertas
		17,50		28,00		
		17,10		28,30		
Día 7	<i>C. albicans</i> 10 ⁵ células	17,10	17,32	35,10	31,16	13,84
		17,20		31,10		
		17,70		30,30		
		17,50		29,70		
		17,10		29,60		
	NC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	

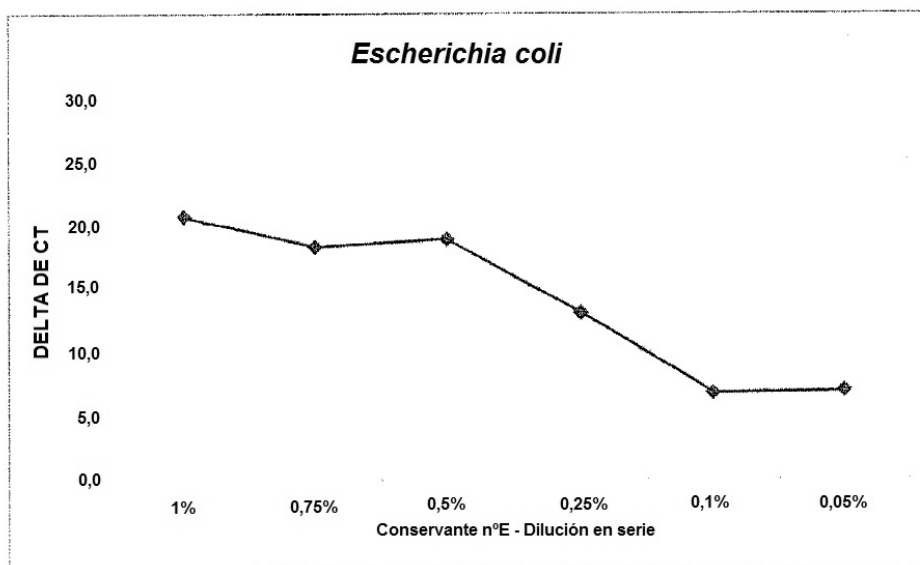
NC = Control Negativo - Placa de control de células tratadas (10⁵ células) no muestra colonias en placa.

Aplicación de cribado de conservantes

Tabla 27: Resultados obtenidos con *Escherichia coli* y una aplicación de cribado de conservante.



Este conservante D es efectivo entre 1% y 0,005%. La placa de control de células tratadas (10⁶ células) no muestra colonias en placa para todas las diluciones de conservante.



Este conservante E no es efectivo a bajas concentraciones. La placa de control de células tratadas (10^6 células) muestra colonias sobre la placa (> 300) para 0,25%, 0,1% y 0,05%.

5 Tal como se ilustra en la presente memoria, el tiempo para obtener resultados usando el método y el kit de la presente invención se reduce significativamente. Se llevaron a cabo ensayos pre-ARNr y ARNm EF-3 en dos días (dependiendo de la duración del tratamiento con conservante), mientras que los métodos convencionales requieren cinco días o más, dependiendo de las tasas de crecimiento del organismo seleccionado.

10 Además, las células viables pero no cultivables son detectadas mediante RT-PCR, pero no mediante métodos basados en crecimiento, por lo que se reduce el número de falsos negativos. Adicionalmente, los datos experimentales demuestran que utilizar como objetivo el pre-ARNr con un sistema RT-PCR es una herramienta útil para distinguir células viables (no tratadas) de no células no viables (tratadas).

Los problemas técnicos observados con los ensayos de RT-PCR dirigidos a secuencias de ARNr maduras se solventan usando este sistema. Se obtuvo un ΔCt de cuatro a cinco usando las secuencias de ARNr maduras (datos no mostrados) mientras que usando los sistemas pre-ARNr se obtuvo un $\Delta Ct \geq 10$.

15 El tratamiento con Poly-Q no mostró una eliminación efectiva ya que las placas de control post-tratamiento todavía presentan crecimiento bacteriano, y por tanto el ΔCt es significativamente menor, especialmente para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

20 En general, en base a los datos obtenidos hasta la fecha, los sistemas diseñados seleccionados de pre-ARNr y ARNm son específicos de especie y pueden usarse para cribado de formulación y para el Ensayo de eficacia de conservante en una matriz filtrable.

Se pueden establecer nuevos protocolos optimizados en caso de interferencia de PCR debido a inhibidores procedentes de la matriz evaluada. Dichas optimizaciones pueden incluir nuevos tratamientos o etapas de lavado del filtro de membrana.

25 Los ensayos contemplados incluyen un Control de Proceso Interno (IPC) que asegura la eficacia del proceso de extracción y amplificación de pre-ARNr y ARNm.

30 Habiendo sido descritas algunas realizaciones de la invención, debería ser evidente para los especialistas en la técnica que todo lo anterior es meramente ilustrativo y no limitativo, habiendo sido presentado únicamente a modo de ejemplo. Numerosas modificaciones y otras realizaciones quedan al alcance del especialista en la técnica, y se contempla que entren dentro del alcance de la invención y de cualquier equivalente de la misma. Se puede apreciar que variaciones de la presente invención serían fácilmente evidentes para los especialistas en la técnica, y la presente invención pretende incluir dichas alternativas. Adicionalmente, puesto que a los especialistas en la técnica se les pueden ocurrir fácilmente numerosas modificaciones, no se desea limitar la invención a la construcción y operación exactas ilustradas y descritas y, por consiguiente, todas las modificaciones y equivalentes pueden clasificarse como pertenecientes al alcance de la invención.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar y cuantificar células microbianas en una o más muestras que contienen un microorganismo de interés, que comprende:
- 5 (a) la amplificación de ADN específico de especie procedente de muestras que contienen pre-ARNr usando una reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa, comprendiendo dicha etapa de amplificación:
- usar un primer cebador complementario a una región pre-ARNr de dicho microorganismo de interés;
- usar un segundo cebador complementario a una región de ARNr maduro de dicho microorganismo de interés; y
- llevar a cabo múltiples ciclos de amplificación usando dicho primer cebador y dicho segundo cebador para producir niveles detectables de ADN amplificado específico de especie; y
- 10 (b) la cuantificación de dicho ADN amplificado específico de especie, comprendiendo dicha etapa de cuantificación:
- usar una sonda de hibridación marcada fluorescentemente complementaria a dicha región de ARNr maduro de dicho microorganismo de interés;
- usar dicho primer cebador complementario a dicha región pre-ARNr de dicho microorganismo de interés;
- 15 usar dicho segundo cebador complementario a dicha región de ARNr maduro de dicho microorganismo de interés; y
- llevar a cabo múltiples ciclos de amplificación usando dicha sonda de hibridación marcada fluorescentemente y dicho primer cebador y dicho segundo cebador para producir niveles crecientes de señal de fluorescencia por encima de la fluorescencia de fondo;
- 20 en donde dicha amplificación de dicho ADN específico de especie indica la presencia de dichas células microbianas viables en dicha una o más muestras, y en donde dicha cuantificación de dicho ADN específico de especie proporciona una medida relativa de la cantidad de dichas células microbianas viables en dicha una o más muestras.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho microorganismo de interés se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*, y donde además dicho primer cebador, dicho segundo cebador y dicha sonda de hibridación marcada fluorescentemente se diseñan en el extremo 3' de ARNr 16S.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho microorganismo de interés se selecciona del grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, y donde además dicho primer cebador, dicho segundo cebador y dicha sonda de hibridación marcada fluorescentemente se diseñan en el extremo 5' de ARNr 23S.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho microorganismo de interés es *Aspergillus brasiliensis*, y donde además dicho primer cebador, dicho segundo cebador y dicha sonda de hibridación marcada fluorescentemente se diseñan en el extremo 5' de ARNr 5.8S.
5. El método de la reivindicación 1, que además comprende: recolectar células en un filtro de membrana y lisar dichas células recolectadas.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, que además comprende:
- aplicar dicha etapa de amplificación y dicha etapa de cuantificación tanto a una muestra de ensayo como a una muestra de control, en donde dicha muestra de control contiene células no tratadas; y
- 40 comparar la medida relativa de la cantidad de dichas células microbianas viables en dichas muestras de control con la medida relativa de la cantidad de dichas células microbianas viables en dicha muestra de ensayo.
7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha una o más muestras contienen una o más formulaciones o conservantes de cultivo celular que necesitan un cribado o un ensayo de eficacia.
8. Un método de cribado de formulación de cultivo celular o de ensayo de eficacia de conservante de cultivo celular, que comprende:
- 45 calibrar las células hasta una densidad deseada;
- recolectar las células en un filtro de membrana;
- aplicar nutrientes a dicha membrana para producir células enriquecidas;

- incubar dichas células enriquecidas;
- eliminar los nutrientes;
- añadir tampón de lisis a la membrana;
- recuperar los lisatos celulares;
- 5 transferir el lisato;
- extraer y purificar el ARN; y
- amplificar y cuantificar el ADN específico de especie mediante reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa de acuerdo con el método de la reivindicación 1.
- 10 **9.** Uso de un kit para llevar a cabo el método de la reivindicación 1, kit que comprende los cebadores y sondas seleccionados del grupo que consiste en ácidos nucleicos complementarios al extremo 3' de ARNr 16S, ácidos nucleicos complementarios al extremo 5' de ARNr 23S, y ácidos nucleicos complementarios al extremo 5' de ARNr 5.8S.

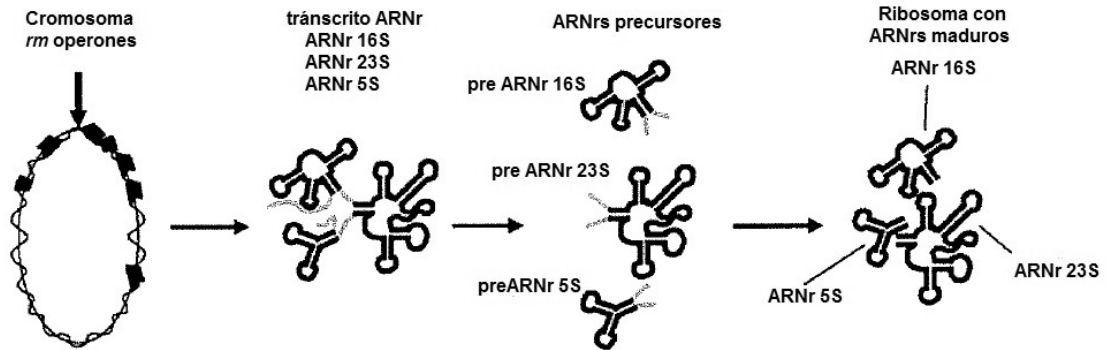


FIG. 1

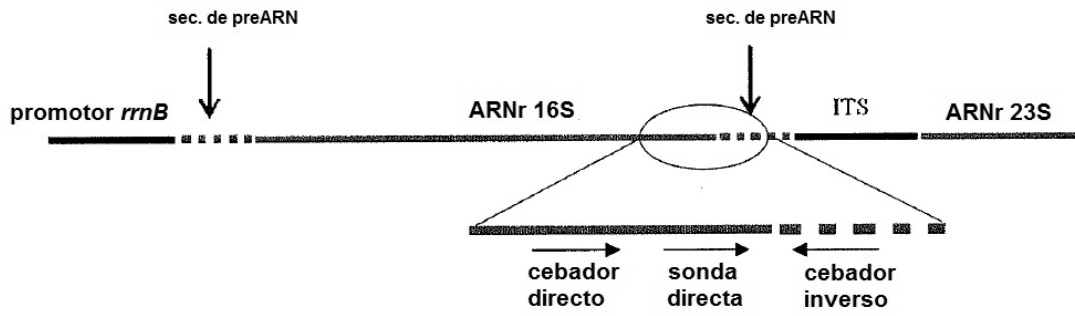


FIG. 2

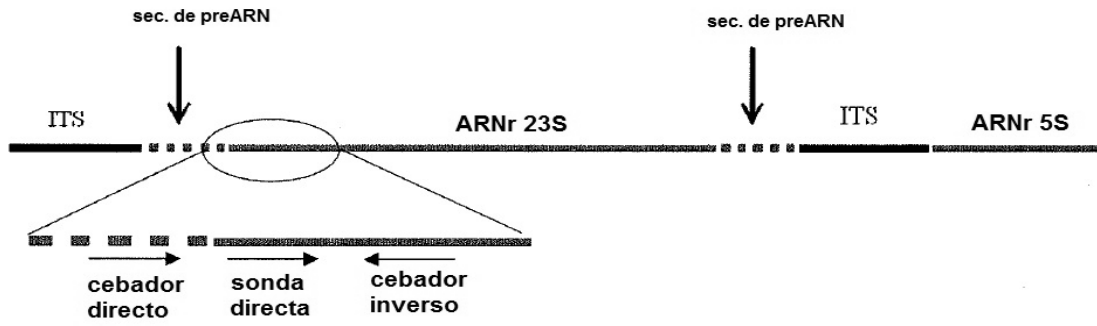


FIG. 3

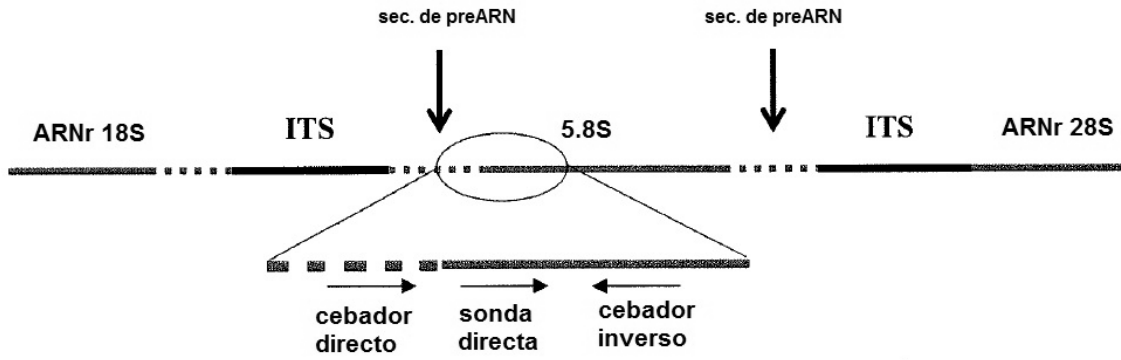


FIG. 4

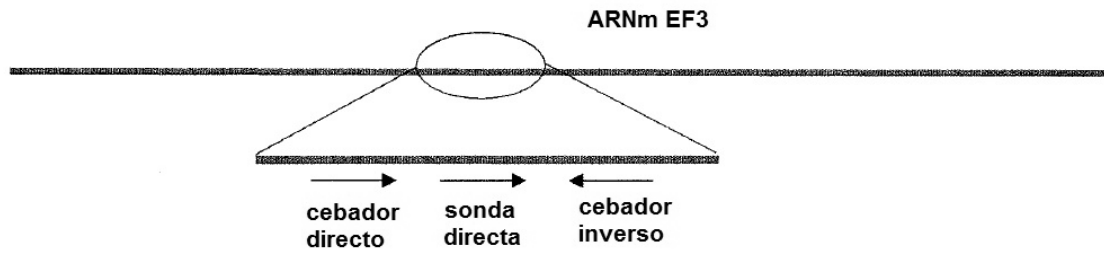


FIG. 5