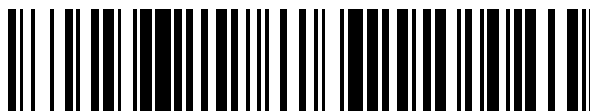


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 766**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/10 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2014 PCT/EP2014/074383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2014 E 14802348 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3068894**

54 Título: **Método para detectar condiciones bacteriolíticas en una muestra**

30 Prioridad:

13.11.2013 EP 13382459

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

02.12.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE BARCELONA (100.0%)
Centre de Patentes de la UB, Baldiri Reixac 4 - Torre D
08028 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MUNIESA PÉREZ, MARÍA TERESA;
IMAMOVIC, LEILA;
BALLESTÉ PAU, ELISENDA;
BLANCH GISBERT, ANICET;
LUCENA GUTIÉRREZ, FRANCISCO y
JOFRE TORROELLA, JOAN**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 733 766 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

Método para detectar condiciones bacteriolíticas en una muestra

- 5 La presente invención proporciona un método para detectar condiciones bacteriolíticas, tales como la presencia de bacteriófagos, particularmente colifagos somáticos, en una muestra de ensayo con aplicación en los campos de análisis alimentario, ambiental y médico.

Antecedentes de la técnica

10

La contaminación fecal en el agua está asociada con varios miles de muertes humanas por día, sirviendo como fuente de transmisión de patógenos.

- 15 En la técnica se conocen una gran cantidad de indicadores para controlar la contaminación fecal, denominada en lo sucesivo en el presente documento "contaminación fecal". Además de los indicadores bacterianos clásicos, se han sugerido varios grupos de bacteriófagos (también llamados simplemente "fagos") que infectan bacterias entéricas para determinar el nivel de contaminación fecal en el agua. Los bacteriófagos son virus que infectan y se replican dentro de una bacteria. Cuando se comparan con los indicadores bacterianos clásicos para la detección de contaminación fecal, los bacteriófagos son más resistentes a la desinfección y otros procesos de inactivación y se difunden a más distancia de las fuentes de contaminación. Por lo tanto, los bacteriófagos pueden servir como un mejor predictor de la calidad del agua y los alimentos. El valor potencial de los bacteriófagos como indicadores de calidad en el agua y los alimentos se ha investigado y revisado exhaustivamente (Lucena F.; Jofre J. "Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes". En SABOUR, P.M.; GRIFFITHS, M.W. (ed). Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens. ASM Press, Washington DC, 2010, págs 103-118). Entre los bacteriófagos, los colifagos somáticos, que son fagos capaces de infectar y replicarse en *E. coli* y algunas especies bacterianas de origen fecal estrechamente relacionadas con *E. coli*, se han incluido recientemente en las guías de calidad del agua, tales como las del agua subterránea en los Estados Unidos (USEPA, 2006, National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule; Final Rule; 40 CFR Partes 9, 141 y 142. Federal Register, vol. 71, No. 216. p. 65574-65660. Environmental Protection Agency. Washington DC) o para el reciclaje de agua en el estado de Queensland en Australia (Queensland Government, 2005, Water recycling guidelines. Queensland State EPA, Brisbane. Australia).
- 20
- 25
- 30

- Varias cepas de *E. coli* y medios de ensayo producen resultados diferentes en la determinación de colifagos somáticos. Para evitar esta fuente de variabilidad en la determinación, se han establecido métodos estandarizados para detectar y cuantificar este grupo de fagos y están disponibles en la actualidad (ISO 10705-2. 2000; APHA, AWWA y WPCF, 2001; o USEPA 2001a. Método 1602). Todos estos métodos estandarizados usan *E. coli* C como cepa huésped: la cepa silvestre ATCC13706 (APHA, 2001) o sus mutantes resistentes a nalidixico WG5 (ISO 10705-2, 2000) y CN13 (USEPA 2001a).
- 35

- 40 Sin embargo, se ha notificado que el método estándar de APHA tiene un rendimiento deficiente, mientras que los métodos basados en las cepas huésped WG5 y CN13 han demostrado una mejor precisión en entornos acuáticos. Los datos disponibles indican que estas cepas de *E. coli* son susceptibles a los mismos bacteriófagos (Muniesa et al., 2003, "Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages". Antonie van Leeuwenhoek 83: 305-315) y, cuando se usan en la detección de colifagos somáticos, ambos proporcionan resultados similares (Guzman et al., 2008, "Evaluation of Escherichia coli host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages". Appl. Environ. Microbiol.;74(2):531-4).
- 45

- El protocolo ISO actual que usa WG5 de *E. coli* para la detección de colifagos somáticos es un procedimiento de múltiples etapas que involucra la replicación de colifagos en células en fase de crecimiento exponencial de la *E. coli* huésped, seguido del depósito de una gota en agar sembrado para confirmación de la placa. El método es laborioso y requiere mucho tiempo, por lo que los resultados no estarán disponibles hasta al menos 18 horas. Adicionalmente, a pesar de su buen rendimiento, la falta de un ensayo listo para usar limita la implementación de este protocolo en muchos laboratorios para políticas generales de gestión de agua y alimentos.
- 50

- 55 El documento WO 9428179 A1 describe un método alternativo ("Fast phage") para detectar colifagos somáticos basándose en la medición de la liberación mediada por fagos de β -galactosidasa intracelular. El método comprende incubar una muestra de agua que contiene colifagos en un medio que comprende un huésped de *E. coli* que es susceptible a la infección por colifagos. El medio de incubación también contiene un compuesto que induce la expresión de altos niveles de beta-galactosidasa intracelular en el huésped de *E. coli*. La mezcla se incuba a continuación con un sustrato marcado para la beta-galactosidasa, que sufrirá un cambio detectable cuando sea escindido por esta enzima. Cuando la muestra contiene colifagos, la lisis mediada por fagos del huésped de *E. coli* libera la enzima beta-galactosidasa intracelular, que a su vez escinde el sustrato marcado, permitiendo la detección visual. El método muestra el gran inconveniente de la baja sensibilidad. Además de requerir la concentración de la muestra, para la detección de títulos de fagos bajos, el documento desvela largos tiempos de incubación con el sustrato marcado. Sin embargo, se desaconsejan las incubaciones que superen las dos horas (posiblemente porque las incubaciones más largas producirían un alto número de falsos positivos). De ello se deduce que la sensibilidad y
- 60
- 65

especificidad del método están desequilibradas. La detección de títulos bajos (alta sensibilidad) se ve comprometida por resultados falsos positivos (baja especificidad), mientras que realizar el método con alta especificidad conduce inevitablemente a una mala sensibilidad.

5 Salter presentó el concepto de "Fast Phage" (Fago rápido) en la determinación somática de colifagos estándar (método EPA 1601) (Salter et al., 2010, "Proposed modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for detection of coliphages in drinking water, with same-day fluorescence-based detection and evaluation by the performance-based measurement system and alternative test protocol validation approaches"; Appl Environ Microbiol. 76(23):7803-10). La modificación del método EPA 1601, incluido el fago rápido destinado a detectar títulos
10 de fago bajos con el mismo rendimiento que el método estándar. Para ello, el método requiere una etapa de enriquecimiento que consiste en incubar la muestra que contiene fagos con el huésped de *E. coli* y el inductor de beta-galactosidasa durante al menos 5 h. Esta etapa es necesaria para aumentar la cantidad de fagos en la muestra. El cultivo enriquecido se incuba después con un sustrato de beta-galactosidasa marcado por fluorescencia durante 3 h más. Todo el proceso implica al menos 8 horas para la detección final. Según lo notificado por los autores, los
15 resultados falsos positivos también son un problema al realizar este método.

Adams et al (documento WO0179528) intentaron reducir la señal de fondo en la detección de bacteriófagos utilizando sustratos enzimáticos como indicadores que se han inmovilizado en un soporte sólido insoluble. El uso de un sustrato enzimático inmovilizado evita que el sustrato enzimático atraviese la pared celular bacteriana para
20 reaccionar con células bacterianas intactas (no lisadas).

Un enfoque diferente ha sido descrito por Guzman (Guzman et al., 2009, "Detection of somatic coliphages through a bioluminescence assay measuring phage mediated release of adenylate kinase and adenosine 5'-triphosphate"; J Virol Methods. 161(1):107-13). El método desvelado detecta colifagos somáticos después de la infección por fagos de WG5 de *E. coli* y la liberación mediada por lisis de la adenilato cinasa (AK) y adenosina 5'-trifosfato (ATP) del
25 huésped bacteriano, mediante la detección de una señal bioluminiscente. Este enfoque requiere al menos 3 horas para la incubación del huésped de *E. coli* con la muestra que contiene fagos más el tiempo necesario para extraer la AK antes de proceder con la detección. Se requieren costosos equipos de laboratorio y reactivos para la extracción y detección de AK, por lo que este método presenta inconvenientes considerables relacionados con los altos costes y
30 la imposibilidad de la implementación en el punto de uso.

En vista de todo lo anterior, sigue existiendo la necesidad de proporcionar ensayos rápidos y rentables para la detección de colifagos somáticos con alta especificidad y sensibilidad.

35 Resumen de la invención

Los inventores han desarrollado un método para la detección de bacteriófagos en una muestra de ensayo que supera las desventajas de los métodos anteriores. Los inventores han descubierto además que este nuevo enfoque puede usarse no solo para la detección de bacteriófagos, sino también para detectar cualquier otra condición
40 presente en una muestra de ensayo que cause la lisis de células bacterianas (en el presente documento, estas condiciones se denominan "condiciones bacteriolíticas").

El enfoque del inventor se aprovecha de un huésped bacteriano que expresa una enzima intracelular particular que no puede ser secretada al medio y, al mismo tiempo, es incapaz de captar el sustrato específico para esa enzima particular del medio. El método comprende poner en contacto dichas bacterias con el sustrato específico para la
45 enzima intracelular particular, en donde el sustrato es tal que sufre un cambio detectable si es escindido por la enzima. En ausencia de condiciones bacteriolíticas, se impide el contacto entre la enzima intracelular y su sustrato, por lo que la enzima no puede ser escindida y no se detecta ningún cambio. Sin embargo, en presencia de condiciones bacteriolíticas, la célula bacteriana se lisa, liberando la enzima al medio donde encuentra y escinde el
50 sustrato, induciendo de este modo un cambio detectable en dicho sustrato.

Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para detectar una condición bacteriolítica seleccionada del grupo que consiste en estrés físico, la presencia de bacteriófagos, la presencia de proteínas bacteriolíticas y la presencia de compuestos químicos bacteriolíticos en una muestra de ensayo, comprendiendo
55 dicho método la etapa de poner en contacto la muestra de ensayo con una cepa bacteriana y un sustrato que experimenta un cambio detectable cuando es escindido por una enzima específica de dicha cepa bacteriana, en donde la cepa bacteriana es *E. coli* que sobreexpresa el gen *uidA* y que comprende los genes *uidB* y/o *uidC* alterados y el sustrato es glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico, y en donde detectar un cambio en la muestra de ensayo debido a la escisión del sustrato por su enzima bacteriana
60 específica indica que existe una condición bacteriolítica en la muestra de ensayo.

El método permite la detección de bacteriófagos y, particularmente, la detección de colifagos, con sensibilidad y especificidad comparables al método estándar ISO 10705 (*supra*) en 3,5 a 4,5 h, lo que es una reducción muy significativa en el tiempo de ensayo. Dependiendo de la cepa del fago, el método puede detectar 1 fago en un
65 tiempo total de 4,5 h, por lo que es el método más sensible para detectar microorganismos cultivables para la determinación de la contaminación fecal en el agua. Además, la invención supera particularmente los inconvenientes

- de los métodos que se basan en el principio del "Fago rápido", como los desvelados en el documento WO9428179 y Salter *et al* (*supra*). Los inventores han observado que estos métodos sufren la aparición de un alto porcentaje de resultados falsos positivos para muestras que contienen títulos de colifago bajos. Los inventores también han observado que esta falta de especificidad es el resultado de (i) alta señal basal en ausencia de colifagos debido a la captación del sustrato y la escisión dentro de la célula bacteriana incluso en ausencia de lisis mediada por fagos y/o (ii) largos períodos de enriquecimiento que promueven la lisis no relacionada con fagos. Al seleccionar o construir un huésped bacteriano incapaz de secretar la enzima y de captar el sustrato, la señal basal se reduce considerablemente, permitiendo de este modo una detección sensible de títulos de fagos bajos sin resultados falsos positivos y sin requerir una concentración previa de la muestra. Estas son claras ventajas en comparación con el método desvelado en el documento WO9428179. Además, el método de la invención es rápido, sin la necesidad de largos periodos de enriquecimiento, tal como se describe en Salter *et al*. Finalmente, no requiere reactivos tóxicos, manipulación compleja de la muestra o equipo pesado, comprendiendo de este modo un método fácil de usar y rentable que permite la detección en el punto de uso.
- 15 La invención también proporciona un kit para poner en práctica el método descrito anteriormente. El kit comprende reactivos y medios necesarios para realizar el método, particularmente la cepa bacteriana huésped y el sustrato enzimático que experimenta un cambio detectable cuando es escindido por la enzima, así como instrucciones para realizar el método correctamente. El kit de la invención se puede usar para la detección en el punto de uso de condiciones bacteriolíticas en una muestra de ensayo, por ejemplo, se puede usar para la detección in situ de la contaminación del agua en entornos remotos.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un kit para realizar el método como se ha definido anteriormente que comprende una cepa bacteriana y un sustrato que experimenta un cambio detectable cuando es escindido por una enzima específica de dicha cepa bacteriana, en donde la cepa bacteriana es *E. coli* que sobreexpresa el gen *uidA* y que comprende los genes *uidB* y/o *uidC* alterados y el sustrato es glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico.

Breve descripción de los dibujos

- 30 **Figura 1:** Esquema de la construcción de la cepa modificada.
Construcción del amplímero - Generación de tres fragmentos diferentes por PCR que contienen, cada uno, los genes *uidA* (cebadores SEQ ID NO:1-2), *uidB* (cebadores SEQ ID NO: 3-5) y *uidC* (cebadores SEQ ID NO:4-6). Los cebadores SEQ ID NO: 5-6 presentan una región de homología con el gen para la resistencia a cloranfenicol (*cat*), que se amplifica con los cebadores SEQ ID NO: 7-8.
- 35 PCR solapante - una vez que los tres fragmentos se generan y se solapa la PCR usando los fragmentos *uidB*, *uidC* y *cat* como modelos, se genera una construcción larga por PCR usando los cebadores SEQ ID NO:3-4.
Recombinación - las células de WG5 se transforman con el plásmido pKD46 que contiene el sistema de recombinasa Red. La incorporación del plásmido se confirma con los cebadores SEQ ID NO:11-12. El fragmento de PCR largo que contiene los tres fragmentos *uidB-cat-uidC* se electropora en células de WG5. Por recombinación, el fragmento se inserta entre los genes nativos *uidC* y *uidB*, que son sustituidos por el fragmento *uidC-cat-uidB*. Las colonias que incorporan el fragmento han perdido los genes *uidC* y *uidB* y han ganado resistencia al cloranfenicol. Las células cultivadas en placas de agar LB con cloranfenicol se confirman mediante la incorporación del fragmento mediante PCR. El plásmido pKD46 se elimina por crecimiento celular en serie a 37 °C, ya que este plásmido no puede replicarse a esta temperatura.
- 40 Clonación de *Uida*. El gen *uidA* se amplifica por PCR con los cebadores SEQ ID NO:1-2. El fragmento se liga en un vector pBAD-TOPO que permite la clonación de fragmentos de PCR sin restricción. La construcción pBad::*uidA* se transforma en células de WG5 de *E. coli* por electroporación. Las células que contienen la construcción se cultivan en placas de agar LB con ampicilina. Las células recombinantes completas se identifican mediante selección con ampicilina y cloranfenicol, y confirmación por PCR adicional.

50 **Figura 2:** Resultados de las diferentes concentraciones de fagos (ufp/tubo) después de 3 horas de incubación. El color azul (tubos 43, 21,5 y 4,3) mostró un resultado positivo, mientras que el amarillo (tubos 2,2 y 0,4) indica resultados negativos.

55 **Figura 3.** Comparación entre los resultados promediados calculados a partir de los tubos positivos del ensayo de color y los puntos positivos que muestran la lisis del fago evaluada por el ensayo de la gota. Los resultados se calculan por el número más probable (MPN) para cada intervalo (<100, 100, 1000 y 10000) (ufp/ml) y muestran que estos dos cálculos no son estadísticamente diferentes. Cuadrado: ensayo de color en tubo de ensayo. Círculo: lisis por ensayo de la gota.

Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención proporcionan un método para detectar cualquier condición bacteriolítica en una muestra de ensayo aprovechando la escisión mediada por lisis de un sustrato cuando entra en contacto con su enzima bacteriana específica. El método requiere el uso de una cepa bacteriana que exprese una enzima intracelular particular que no puede ser secretada al medio y, al mismo tiempo, es incapaz de captar el sustrato

específico para esa enzima particular del medio.

El término "secretado" significa transportado (de forma activa o pasiva) fuera de la célula bacteriana a través de la membrana celular intacta. El término "captado" (también denominado "ingerido" o "internalizado") significa transportado (de forma activa o pasiva) al interior de la célula bacteriana a través de la membrana celular intacta.

La expresión "incapaz de captar" cuando se refiere a la cepa bacteriana debe entenderse en el sentido de que la cepa bacteriana naturalmente no tiene mecanismos para el transporte del sustrato al interior de la célula bacteriana o, como alternativa, que la cepa bacteriana tiene mecanismos de transporte total o parcialmente inactivados para la captación del sustrato. Análogamente, la expresión "incapaz de secretar", cuando se refiere a la cepa bacteriana, debe entenderse en el sentido de que la enzima no es secretada naturalmente fuera de la célula bacteriana o, como alternativa, que la cepa bacteriana tiene una secreción total o parcialmente inactivada de la enzima. La expresión "parcialmente inactivada" se entiende como una reducción de al menos el 75 % en la captación del sustrato o la secreción de la enzima cuando se compara con la cepa de tipo silvestre. "Parcialmente inactivada" puede ser el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de la cepa de tipo silvestre. "Inactivación total" se refiere a una reducción del 100 % en la captación del sustrato o la secreción de la enzima cuando se compara con la cepa de tipo silvestre.

Para la detección sensible de condiciones bacteriolíticas, el método de la invención se beneficia de la activación de la cepa bacteriana para llevar la cepa a condiciones metabólicas óptimas. Habitualmente, esta etapa de activación comprende incubar la cepa bacteriana en un medio de crecimiento apropiado hasta que alcance dicha etapa metabólica óptima, que a menudo coincide con la fase de crecimiento logarítmico. Una característica relevante de esta etapa metabólica óptima en el sentido de la invención es la expresión de altos niveles de la enzima particular seleccionada para el sistema de detección. En cualquier caso, las condiciones para la etapa de activación dependen de la cepa bacteriana huésped. La etapa de activación puede tener una duración entre 2 y 18 h. Preferentemente, la etapa de activación requiere de 2 a 4 h, por ejemplo, 2,5 h. Es importante, además, que un número suficiente de células bacterianas se activen para su uso en el método de la invención. El experto en la materia será consciente de que esto puede hacerse teniendo un cultivo congelado o liofilizado de la cepa bacteriana que puede resuspenderse instantáneamente a densidades ópticas apropiadas para su uso en la presente invención.

La etapa de poner en contacto la cepa bacteriana con el sustrato habitualmente se realiza incubando la muestra de ensayo con la cepa bacteriana y el sustrato durante un tiempo comprendido entre 10 segundos y 6 horas. En realizaciones particulares, la etapa de contacto se realiza incubando durante un tiempo comprendido entre 1 min y 5 h, o entre 1 h y 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 o 1,5 h. El experto en la materia determinará el tiempo de contacto apropiado dependiendo de la cepa bacteriana, el sustrato y, particularmente, la condición bacteriolítica a detectar. Por ejemplo, para la detección de bacteriófagos, este tiempo de contacto debe ser suficiente para permitir la infección de las células bacterianas por los bacteriófagos. Para la detección de detergentes o proteínas bacteriolíticas, el tiempo de contacto debe ser suficiente para permitir la disolución o ruptura de la pared y la membrana bacterianas.

Se pueden considerar otras condiciones al realizar la etapa de contacto. Por ejemplo, la etapa de contacto puede requerir la incubación a una determinada temperatura o atmósfera, en presencia de cofactores para la actividad enzimática, inductores de la expresión de la enzima, etc. Por ejemplo, la temperatura debe ser tal que soporte el crecimiento de la cepa bacteriana. En realizaciones particulares, la etapa de contacto se realiza a una temperatura comprendida entre 20 y 45 °C, por ejemplo 25, 30, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44 °C. La etapa de contacto también se realiza en presencia de una relación apropiada de células bacterianas respecto a moléculas de sustrato. En algunas realizaciones, se usan células bacterianas en una cantidad tal, que la densidad óptica del cultivo (medida a 600 nm) está comprendida entre 0,01 y 10, en particular entre 0,1 y 1, y la concentración del sustrato está comprendida entre 0,01 y 10 mg/ml, en particular, entre 0,05 y 0,5 mg/ml. Sin embargo, estas condiciones pueden variar. El experto en la materia determinará las condiciones apropiadas dependiendo de la cepa bacteriana, el sustrato y la condición bacteriolítica a detectar.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana es una cepa bacteriana modificada genéticamente. Una cepa bacteriana modificada genéticamente también se denomina cepa bacteriana "recombinante". Como se usa en el presente documento, la cepa bacteriana "recombinante" es una cepa relacionada con, derivada de, o que contiene material genéticamente modificado. La cepa bacteriana comprende las siguientes modificaciones: (a) inactivación de la captación del sustrato a partir del medio o (b) inactivación de la secreción de la enzima específica para el sustrato al medio. El término "inactivada" se entiende como inactivación total o parcial. Las expresiones "inactivación parcial o total" se han definido anteriormente (véase las expresiones "parcial o totalmente inactivada").

En el primer caso (a), las modificaciones pueden implicar alterar los genes responsables del transporte del sustrato a través de la pared y la membrana bacterianas. Los términos "alteración" o "cepa de alteración", como se usan en el presente documento, se refieren a una cepa bacteriana en la que el gen o promotor nativo está mutado, deletado, reemplazado, interrumpido o regulado negativamente para disminuir la transcripción del gen. Un gen puede estar completamente (100 %) regulado negativamente por inactivación o eliminación de toda la secuencia de ADN genómico. El uso de una mutación de cambio de marco, un codón de terminación temprana, mutaciones puntuales de residuos críticos, o deleciones o inserciones, y similares, puede desactivar total o parcialmente el producto génico al prevenir o reducir la transcripción y/o la traducción de la proteína activa. En el segundo caso (b),

las modificaciones pueden implicar la alteración del péptido señal de la enzima.

Como será evidente para el lector experto, la opción (a) de inactivar la captación del sustrato a partir del medio solo se requiere cuando la cepa de tipo silvestre naturalmente contiene mecanismos de transporte para dicha captación.

5 Análogamente, la opción (b) de inactivar la secreción de la enzima fuera de la célula bacteriana solo se requiere cuando la cepa de tipo silvestre naturalmente secreta la enzima.

La cepa bacteriana puede modificarse para mostrar una mayor actividad para una enzima específica en comparación con la cepa de tipo silvestre. "Actividad aumentada" se entiende como un aumento de al menos el 110
10 % en comparación con la actividad de la cepa de tipo silvestre. En realizaciones particulares, las cepas bacterianas muestran un aumento del 125 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 700 %, 900 % o 1000 % en comparación con la cepa de tipo silvestre. El aumento de la actividad se puede lograr mediante la sobreexpresión de la enzima en particular, de modo que más copias de la enzima produzcan una mayor actividad, o modificando el gen que codifica la enzima para producir una forma más activa o una forma que sea resistente a la inhibición.

15 "Sobreexpresión" se entiende como la expresión artificial de un gen en mayor cantidad. La sobreexpresión se puede lograr eliminando los represores, añadiendo múltiples copias del gen al genoma bacteriano, regulando positivamente el gen endógeno o introduciendo un vector exógeno que contiene un gen que codifica la enzima y que permite la transcripción de dicho gen dentro de la cepa bacteriana. También se puede lograr un aumento de la actividad
20 eliminando los inhibidores, añadiendo activadores y similares.

Los métodos para regular positivamente, regular negativamente o sobreexpresar genes son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, J Sambrook y DW Russell 2001, "Molecular cloning: a laboratory manual", 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y; M Muniesa et al, 2006, "T Active genetic elements present in the
25 locus of enterocyte effacement in Escherichia coli 026 and their role in mobility", Infect Immun 74(7):4190-9).

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana recombinante de la invención muestra una sobreexpresión de la enzima del 110 % al 1000 % en comparación con la cepa de tipo silvestre. En realizaciones particulares, la cepa bacteriana recombinante de la invención muestra una sobreexpresión de la enzima correspondiente al 125 %,
30 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 700 % o 900 % con respecto a la cepa de tipo silvestre. En algunos ejemplos, el huésped bacteriano no expresa naturalmente una enzima específica y se modifica para comprender un vector que contiene un gen que codifica la enzima específica y que permite la transcripción de dicho gen en el interior de la cepa bacteriana,

35 En una realización particular, la cepa bacteriana comprende un vector que contiene un gen que codifica una enzima específica y que permite la transcripción de dicho gen en el interior de la cepa bacteriana, en donde la transcripción de dicho gen es inducible. Por "inducible" se entiende que la transcripción del gen solo tiene lugar en presencia de un compuesto específico llamado "inductor". Ejemplos no limitantes de vectores inducibles adecuados para la incorporación del gen que codifica la enzima son vectores pLAC (que contienen un promotor T5 inducible por IPTG),
40 vectores rhaPBAD (que contienen un promotor inducible por ramnosa) y vectores pCMV-Tet3G (que contienen sistemas de expresión inducibles por tetraciclina). Cuando la cepa bacteriana contiene un vector inducible para la expresión de la enzima, la etapa de activación debe realizarse en presencia del compuesto inductor. Por ejemplo, una cepa bacteriana que comprende un vector de expresión pBAD que contiene un gen que codifica la enzima específica se activa en presencia de L-arabinosa.

45 En algunos ejemplos, la enzima contenida en la cepa bacteriana es una enzima glucosidasa. Las glucosidasas (también llamadas glicosidasas o glucosil hidrolasas) son enzimas que escinden enlaces glucosídicos en azúcares complejos. Las glucosidasas no limitantes que se contemplan como la enzima de elección para el método de la invención son glucosil hidrolasas, tales como beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, xilanasas, lactasa, amilasa,
50 quitinasa, sacarasa y maltasa.

El sustrato usado en el método de la invención es cualquier sustrato que pueda ser escindido por una de las enzimas de la cepa bacteriana, siempre que experimente un cambio detectable cuando se escinde. El cambio detectable es cualquier cambio que se puede detectar, por ejemplo, a simple vista, con un espectrofotómetro, un
55 fluorómetro, un luminómetro, un cromatógrafo, un espectrómetro, electroquímicamente, por un cambio de voltaje, o por cualquier otro medio.

En algunas realizaciones, el sustrato contiene un resto colorimétrico o fluorimétrico que es liberado por la acción de la enzima, causando un cambio de color o fluorescencia en la muestra de ensayo. Por "resto fluorimétrico", también
60 denominado "marca fluorimétrica", se entiende una parte de una molécula que presenta fluorescencia cuando se separa del resto de la molécula. El "resto colorimétrico", también denominado "marca colorimétrica", se refiere a parte de una molécula que muestra un color visible a simple vista cuando se separa del resto de la molécula. Cuando el sustrato contiene una marca colorimétrica, el cambio causado por la escisión de dicho sustrato por la enzima puede detectarse a simple vista, permitiendo la implementación del método económica y en el punto de uso.

65 En determinadas realizaciones, el sustrato es un compuesto de glucurónido, particularmente, glucurónido unido por

un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico. Los compuestos de glucurónido son el sustrato de la beta-glucuronidasa. La enzima hidroliza el compuesto de glucurónido que libera ácido glucurónico y el resto escindido correspondiente. Una realización particular de la invención usa sal de ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico ($C_{20}H_{26}BrClN_2O_7$) como sustrato y beta-glucuronidasa como enzima. En la técnica, este sustrato también se conoce como X-Glucurónido, término que también se usará en la presente solicitud. El uso de X-Glucurónido permite la detección colorimétrica de las condiciones bacteriolíticas en la muestra.

Otra realización de la invención usa 5-bromo-6-cloro-3-indolil beta-D-glucurónido como sustrato, también para detección colorimétrica. Una realización adicional usa 4 metil umbeliferil glucurónido (MUG) como sustrato, para la detección de fluorescencia. Otras realizaciones usan naftol AS-BI beta-D-glucurónido, sal sódica de fenoltaleína beta-D-glucurónido, 8-hidroxiquinolina glucurónido o resorufina glucurónido (ReG) como sustratos, cada uno puede ser detectado por su sistema de detección particular. Todavía una realización adicional de la invención usa p-nitrofenil beta-D-glucurónido (PNPG) como sustrato, para la detección espectrofotométrica.

Otros ejemplos usan galactosa unida por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico como sustrato para la enzima beta-galactosidasa. En ejemplos particulares, el sustrato es MUG (4-metilumbeliferil beta-D-galactopiranosido) o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido).

Se pueden usar varias bacterias como la cepa bacteriana para el método de la invención. En una realización, la cepa bacteriana de la invención es una cepa de *E. coli* recombinante que muestra una reducción en la captación de sustrato de beta-glucuronidasa de al menos el 75 %, en particular 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % y una sobreexpresión de la enzima beta-glucuronidasa de al menos el 110 %, en particular 125 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 700 %, 900 % o 1000 %, ambas con respecto a la cepa de tipo silvestre WG5 (ATCC 700078). En una realización adicional, dicha cepa de *E. coli* recombinante comprende la alteración del gen *uidB* transportador de beta-glucuronidasa y/o la alteración del gen *uidC* transportador de beta-glucuronidasa. En una realización, dicha alteración es una inactivación de los genes *uidB* y/o *uidC*. En otra realización, dicha construcción alterada comprende un gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) que reemplaza un fragmento de los genes *uidB* y *uidC*. Se entiende que el gen *cat* está unido operativamente y sigue siendo funcional. La expresión "unido operativamente" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de ácido nucleico acopladas funcionalmente con el objetivo de transcribir la proteína.

En otra realización de la invención, la cepa de *E. coli* recombinante comprende un vector, comprendiendo dicho vector un gen *uidA* que codifica la enzima beta-glucuronidasa unido operativamente con elementos reguladores adecuados para la expresión de dicho gen *uidA* en *E. coli*. En una realización particular, el gen *uidA* se clona dentro de un vector de expresión pBAD inmediatamente aguas abajo del promotor inducible P_{ara} , de modo que la expresión de la enzima beta-glucuronidasa es inducida por la L-arabinosa.

En una realización particular del método de la invención, la cepa bacteriana es *E. coli* que sobreexpresa el gen *uidA* y que comprende los genes *uidB* y/o *uidC* alterados, y en donde el sustrato es glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico. En otra realización particular, el método usa X-Glucurónido como sustrato y una cepa de *E. coli* recombinante, teniendo dicha cepa de *E. coli* recombinante genes *uidB* y *uidC* inactivados, en donde un gen *cat* reemplaza un fragmento de dichos genes *uidB* y *uidC*, y un vector, comprendiendo dicho vector el gen *uidA*.

En otros ejemplos, la cepa bacteriana es una cepa de *Salmonella* o una cepa de *Shigella*. Las cepas de *Salmonella* o *Shigella* pueden ser *S. enterica* y *Shigella flexneri*, particularmente, la cepa de *Salmonella* puede ser *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium. En ejemplos particulares, dichas cepas de *Salmonella* o *Shigella* comprenden un vector, comprendiendo dicho vector una secuencia de ADN que codifica la enzima beta-glucuronidasa unida operativamente con elementos reguladores adecuados para la expresión de dicha secuencia de ADN en *Salmonella* o *Shigella*. En un ejemplo particular, la secuencia de ADN que codifica la beta-glucuronidasa es el gen *uidA*.

El método de la presente invención contempla la detección de condiciones bacteriolíticas de cualquier tipo. Por ejemplo, una condición bacteriolítica puede ser cualquier tipo de estrés físico, químico o biológico que cause la lisis de las bacterias. Ejemplos de estrés físico en el sentido de la invención son alta presión, alta temperatura o fricción mecánica. Los ejemplos de estrés químico incluyen la presencia de productos químicos bacteriolíticos, tales como detergentes o disolventes orgánicos (por ejemplo, cloroformo y fenol). Los ejemplos de estrés biológico incluyen la presencia de bacteriófagos, proteínas bacteriolíticas (tales como la lisozima) o antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.

En una realización particular, la condición bacteriolítica a determinar por el método de la invención es la presencia de bacteriófagos. En otra realización particular, dichos bacteriófagos son bacteriófagos fecales. Otra realización particular se refiere a la detección de bacteriófagos fecales en una muestra de ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde la etapa de contacto se realiza durante un tiempo comprendido entre 1 minuto y 6 h. Otra realización particular se refiere a la detección de colifagos somáticos en una muestra de ensayo de acuerdo con la invención poniendo en contacto la muestra con glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto

colorimétrico o fluorimétrico y una *E. coli* recombinante que comprende genes *uidB* y/o *uidC* alterados y/o un vector que contiene el gen *uidA* que permite la transcripción de dicho gen en el interior de la cepa de *E. coli* recombinante, en donde la etapa de contacto se realiza incubando a una temperatura comprendida entre 35 y 40 °C durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 6 h. Las condiciones particulares para la etapa de contacto para la detección de bacteriófagos fecales son: temperatura que varía entre 36 y 38 °C, por ejemplo, 37 °C, y un tiempo que varía entre 1 y 4,5 h, por ejemplo, 2,5 h.

El método de la presente invención se puede usar para detectar condiciones bacteriolíticas en cualquier tipo de muestra. La muestra puede ser una muestra de agua, tal como una muestra de agua de mar o una muestra de agua dulce, una muestra de lodo de aguas residuales y una muestra de alimento. Una aplicación particularmente interesante de la presente invención es detectar la presencia de bacteriófagos somáticos en estas muestras con el fin de determinar la contaminación fecal en el entorno. El método de la invención, sin embargo, encuentra aplicación en otros campos, tales como el campo médico. Por ejemplo, puede ser interesante determinar la presencia de antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.

El método de la invención contempla la manipulación de la muestra antes de poner en contacto dicha muestra con el huésped bacteriano y el sustrato. En este sentido, la invención contempla una o más de las siguientes manipulaciones: (i) concentración de la muestra, (ii) eliminación de materia no deseada de la muestra (purificación), (iii) homogeneización, (iv) propagación de microorganismos. La concentración y/o la purificación se pueden lograr mediante filtración, centrifugación, decantación o cualquier otro medio. La homogeneización se puede lograr mediante agitación en vórtice, agitación, uso de equipos especiales o cualquier otro medio. Por "propagación" se entiende aumentar la cantidad de microorganismo presente en la muestra.

Una realización particular de la presente invención se refiere a un método para la detección de colifagos somáticos en una muestra de agua, que comprende: añadir en dicha muestra un sustrato y una cepa de *E. coli*, siendo dicho sustrato un compuesto de glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico, en donde dicha cepa de *E. coli* sobreexpresa el gen *uidA* y comprende los genes *uidB* y/o *uidC* alterados, mostrando una reducción en la captación de dicho sustrato de al menos el 75 % y una sobreexpresión de la enzima beta-glucuronidasa de al menos el 150 %, ambas con respecto a la cepa de tipo silvestre WG5 (ATCC 700078); evaluar la solución resultante de la etapa anterior; y detectar la presencia de colifagos somáticos a partir de dicha evaluación después de un tiempo total de entre 3,5 h y 4,5 h para al menos 3 fagos, preferentemente a las 3,5 h. El "tiempo total" se refiere al tiempo global necesario para realizar el método de la invención, que resume el tiempo total de incubación, incluida la detección. En algunos casos, el tiempo total incluye el tiempo requerido para la etapa de activación y para la etapa de contacto. Como se muestra en los ejemplos a continuación, la detección de tan solo 3 fagos es posible en 3,5 h (2,5 h de activación + 1 h de contacto). Por lo tanto, el presente método implica una mejora significativa con respecto al tiempo requerido para detectar colifagos somáticos con alta sensibilidad y especificidad.

La invención también proporciona un kit para realizar el método descrito anteriormente. En una realización particular, el kit comprende reactivos apropiados para la detección de bacteriófagos en una muestra, comprendiendo dichos reactivos un sustrato que es glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico y una cepa de *E. coli* que sobreexpresa el gen *uidA* y que comprende los genes *uidB* y/o *uidC* alterados. En algunas realizaciones, las cepas de *E. coli* se modifican como en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En realizaciones particulares, el kit comprende un sustrato que es glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico y la cepa de *E. coli* recombinante que sobreexpresa el gen *uidA* y que comprende los genes *uidB* y/o *uidC* alterados muestra una reducción en la captación de sustrato de beta-glucuronidasa del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % y una sobreexpresión de la enzima beta-glucuronidasa del 110 %, 125 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 700 %, 900 % o 1000 %, ambas con respecto a la cepa de tipo silvestre WG5 (ATCC 700078). En otra realización particular, el método usa X-Glucurónido como sustrato y una cepa de *E. coli* recombinante que tiene los genes *uidB* y *uidC* inactivados, en donde un gen *cat* reemplaza un fragmento de dichos genes *uidB* y *uidC*, y en donde la cepa de *E. coli* contiene además un vector, comprendiendo dicho vector el gen *uidA*. En otra realización, el kit es para la detección colorimétrica de colifagos somáticos en una muestra de agua y comprende: sal de ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil b-D-glucurónico; una cepa de *E. coli*, mostrando dicha cepa una reducción en la captación de sal de ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil b-D-glucurónico de al menos el 98 %, preferentemente del 100 %, y una sobreexpresión de la enzima beta-glucuronidasa de al menos el 150 %, ambas en comparación con la cepa WG5 de tipo silvestre; siendo esta cepa de *E. coli* preferentemente una cepa de *E. coli* recombinante que comprende un gen *uidA* insertado en un vector y una inactivación de los genes *uidB* y *uidC* en el operón beta-glucuronidasa, incluso más preferentemente que comprende un gen *cat* que reemplaza un fragmento de dichos genes *uidB* y *uidC*; comprendiendo también el kit, más preferentemente, medios de cultivo, L-arabinosa, glicerol y cloruro de calcio.

En toda la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y las variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o se pueden aprender mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

Ejemplos

Las normas o regulaciones citadas son accesibles y conocidas por el experto en la materia medio y representan las más usadas en la técnica para los protocolos indicados.

5

Materiales

Se usó medio de caldo de Scholtten modificado (MSB) (ISO 10705-2; ISO 2000) como medio de cultivo básico. Cuando fue necesario, se añadió ampicilina (100 µg/ml) o cloranfenicol (20 µg/ml) al medio de cultivo. El MSB puede 10 contener el 0,7 % de agar (MSA semisólido) o el 1,4 % de agar (MSA). Se usó MSB como medio de cultivo de control.

El medio de ensayo es MSB suplementado con un 0,05 % de L-arabinosa, un 0,5 % de glicerol, 15 µl de CaCl 1 M y 0,1 mg/ml de X-glucuronido (sal de ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil b-D-glucurónico; 15 C₂₀H₂₆BrClN₂O₇).

El plásmido pKD46 (GenBank AY048746) para la expresión de la recombinasa Red se usó para insertar fragmentos de ADN en el cromosoma de *E. coli* (Datsenko KA, Wanner BL., 2000, "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". Proc Natl Acad Sci EE.UU. 97: 6640-6645). 20

El plásmido pKD3 (GenBank AY048742; Datsenko y Wanner, *supra*) se usó para obtener el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) para conferir resistencia al cloranfenicol. Todos los vectores se purificaron usando el kit de purificación de plásmidos Midi de Qiagen (Qiagen Inc.).

25 Los bacteriófagos en este estudio se usaron de un stock de título conocido que contiene un cultivo puro de un bacteriófago ΦX174 (ATCC 13706-B1) generado en el laboratorio según el protocolo ISO 10705-2, o con bacteriófagos de origen natural de aguas residuales urbanas sin procesar o agua de río que contiene cantidades variables de colifagos somáticos. Cuando se usaron fagos de origen natural, las muestras se filtraron a través de membranas de baja unión a proteínas (PES) de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, EE. UU.) para eliminar 30 bacterias y otros materiales particulados de las muestras.

Las PCR se realizaron con un sistema GeneAmp PCR 2400 (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems). El modelo de ADN se preparó directamente a partir de dos colonias de cada cepa suspendidas en 50 µl de agua doble destilada y se calentó a 96 °C durante 10 minutos antes de la adición de la mezcla de reacción. El ADN bacteriano o fago 35 purificado se diluyó 1:20 en agua doblemente destilada. Los oligonucleótidos usados en la invención se diseñaron a partir de la secuencia disponible para K-12 de *E. coli* (número de entrada al GenBank NC_000913).

Tabla 7. Cebadores

	Nombre	oligo	Gen diana
SEQ ID NO: 1	UidA-For2-	CTTAATGAGGAGTCCCTT	<i>uidA</i>
SEQ ID NO: 2	UidA-Rev2.	CCAGGAGAGTTGTTGATT	<i>uidA</i>
SEQ ID NO: 3	uidB-UP	CTGGACTGGCATGAACTTC	<i>uidB</i>
SEQ ID NO: 4	uidC-LP	ACTTCAGCATAAAGTCATACT	<i>uidB</i>
SEQ ID NO: 5	UidB-Cm5	AAGTATAGGAAC TTC GAAGCAGCTCCAGCC TACACACACTGTCCA CCACTCGTCCG	<i>uidB</i> solapante con <i>cat</i>
SEQ ID NO: 6	UidC-Cm3	ACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGG ATATTCATATGACGCTGACATTTGC ACCGAT	<i>uidC</i> solapante con <i>cat</i>
SEQ ID NO: 7	Cm -5	TGTGTAGGCTGGAGCGCTTC	<i>cat</i> (gen de resistencia al cloranfenicol)
SEQ ID NO: 8	Cm -3	CATATGAATATCCTCCTTAG	<i>cat</i> (gen de resistencia al cloranfenicol)
SEQ ID NO: 9	pBADf	ATGCCATAGCATT TTTATCC	Vector pBAD
SEQ ID NO: 10	pBADr	GATTTAATCTGTATCAGG	Vector pBAD
SEQ ID NO: 11	RR46-UP	GAGCTCTAAGGAGTTAT	Vector pKD46 de recombinasa Red
SEQ ID NO: 12	RR46-LP	GTGCAGTACTCATTC	Vector pKD46 de recombinasa Red

GTT

Las reacciones de PCR se realizaron de la siguiente manera:

uidA. Cebadoras SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. 95 °C 5 min. 30 ciclos (95 °C 1 min, 50 °C 1,5 min, 72 °C 1min). 72 °C 4 min.

uidB. Cebadores SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:3-3. 95 °C 5 min. 30 ciclos (95 °C 1 min, 52 °C 1,0 min, 72 °C 1min). 72 °C 4 min.

uidC: Cebadores SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6. 95 °C 5 min. 30 ciclos (95 °C 1 min, 52 °C 1,0 min, 72 °C 1min). 72 °C 4 min.

cat: Cebadores SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. 95 °C 5 min. 30 ciclos (95 °C 1 min, 54 °C 1,5 min, 72 °C 1min). 72 °C 4 min.

Confirmación de la construcción pBAD: Cebadores SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:1 y cebadores SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO: 2. 95 °C 5 min. 30 ciclos 95 °C 1 min, 48 °C 1,5 min, 72 °C 1min). 72 °C 4 min.

pKD46: Cebadores SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12. 95 °C 5 min. 30 ciclos (95 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1min). 72 °C 4 min.

Se prepararon células electrocompetentes a partir de 50 ml de cultivo en medio SOB (caldo súper óptimo; Hanahan D. et al., 1983, "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids"; Journal of Molecular Biology 166 (4): 557-580) suplementado con L-arabinosa al 0,05% y se concentró por centrifugación a 3000 x g durante 5 min. A continuación se lavaron en 4 ml de agua doblemente destilada enfriada con hielo. Después de cuatro etapas de lavado similares, las células se suspendieron en 100 µl de agua doblemente destilada enfriada con hielo. Las células se mezclaron con la cantidad correspondiente de ADN (plásmido o amplificado por PCR, 0,5 µg) en un tubo de microcentrífuga enfriado con hielo y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad, Inc.). Las células se electroporaron a 2,5 kV con 25 F y 200 ohmios de resistencia. Después de la electroporación, 1 ml de medio SOC (Sambrook J. y D. W. Russellm, 2001, "Molecular cloning: a laboratory manual", 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y) se añadió a la cubeta. Las células se transfirieron a un tubo de polipropileno de 17 por 100 mm y se incubaron en medio SOC a 30 °C, para plásmidos sensibles a la temperatura, y a 37 °C, sin agitación. Las células se concentraron diez veces en un cultivo de 1 ml antes de colocarlas en placas en medio selectivo.

15

Modificación de las bacterias usadas como huéspedes.

Huésped de *E. coli*

20 La cepa WG5 de *E. coli* (ATCC 700078) recomendada por el método estándar ISO para la detección de colifagos somáticos se modificó genéticamente en varios etapas:

1) El gen que codifica la enzima beta-glucuronidasa (*uidA*; secuencia de K-12 de *E. coli* disponible en el número de entrada al GenBank NC_000913) se amplificó por PCR a partir de WG5 de *E. coli* con los cebadores identificados por la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2 y se clonó usando un kit de expresión pBAD-TOPO® TA. Este kit contiene un vector pBAD-TOPO que permitió la inserción del gen bajo el control de un promotor araBAD (InvitroGene Corporation). La inserción de *uidA* se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La construcción se transformó tanto en células electrocompetentes preparadas con WG5 de *E. coli* como en células recombinantes preparadas como se describe a continuación. En la construcción resultante, pBAD::uidA, el gen se colocó inmediatamente aguas abajo del promotor inducible P_{ara} en la orientación correcta, como se confirmó mediante PCR usando cebadores pBAD SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 y secuenciación. La expresión de *uidA* se optimizó mediante añadiendo L-arabinosa al medio a diferentes concentraciones finales (que variaban entre el 0 y el 0,2 %) según lo descrito por el fabricante (Invitrogen Corporation). Finalmente, se usó una concentración del 0,05 % de L-arabinosa. El plásmido contiene un marcador de ampicilina, por lo tanto, la cepa que contiene la construcción del plásmido se hizo crecer en presencia de ampicilina en una primera fase.

2) La construcción del amplímero que contiene el gen *cat* identificado por la SEQ ID NO:13, que se obtuvo del plásmido pKD3 (GenBank AY048742), insertado dentro de los genes *uidB* y *uidC* (secuencia de K-12 de *E. coli* disponible en el número de entrada al GenBank NC_000913), se realizó de la siguiente manera: los pares de cebadores Cm5-Cm3 identificados por las SEQ ID NO:7 y 8 se usaron para la amplificación del gen *cat* (fragmento 2: 1015 pb), en las condiciones descritas anteriormente. Los pares de cebadores uidB-up/uidB-Cm5, identificados por la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:5, se usaron para la amplificación desde el codón inicial de la subunidad *uidB* hasta la región 5' de cada casete de resistencia (fragmento 1: 258 pb). Los cebadores uidC-Cm3/uidC-lp identificados por la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:4, se usaron para la amplificación desde la región 3' de cada casete de resistencia hasta el codón final de la subunidad *uidC* (fragmento 3: 241 pb) (figura 1). Las condiciones usadas para todas las combinaciones de cebadores se describieron anteriormente.

Los fragmentos de *uidB* y *uidC* se hibridaron en su región solapante localizada en los cebadores SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 con el gen *cat*. A continuación se amplificaron por PCR como un solo fragmento con los cebadores externos uidB-UP (SEQ ID NO:3) y uidC-LP (SEQ ID NO:4) en los que la región dentro de los genes uidB-uidC fue reemplazada por el gen *cat* con una temperatura de hibridación de 50 °C y un tiempo de alargamiento de 2 min. El fragmento se escindió a continuación del gel y se purificó usando el kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen Inc.). El producto final se usó para la transformación en los lisógenos.

3) El plásmido pKD46 (GenBank AY048746) se transformó por electroporación como se describió anteriormente en la cepa WG5 de *E. coli*. Esto se realizó en células electrocompetentes preparadas a partir de 5 ml del cultivo (aproximadamente 5×10^9 UFC/ml). La transformación del vector se confirmó mediante PCR, usando el par de cebadores RR46 UP/IP (SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO: 12).

4) la transformación de 30 µl del fragmento *uidB-cat-uidC*, correspondiente a 0,1-0,5 µg de ADN amplificado, que contiene el fragmento entre los genes *uidB* y *uidC* truncados por la inserción del gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) y preparado como se ha descrito anteriormente (véase técnicas de PCR), se realizó en células electrocompetentes. Estas células se prepararon a partir de cultivos de 50 ml (aproximadamente 5×10^{10} UFC/ml) de la cepa WG5 que contenía el plásmido pKD46, se cultivaron a 30 °C en medio SOB con ampicilina y el 0,05 % de L-arabinosa a una DO_{600} de 0,6. Se esperaba que los genes *uidB* y *uidC* se delecionaran mediante sustitución, a través de recombinación, del fragmento *uidB-uidC* por el fragmento *uidB-cat-uidC*. Después de la recuperación en medio SOC y la incubación durante 4 horas, y con el fin de seleccionar los clones recombinantes, las bacterias se cultivaron en medio de agar que contenía cloranfenicol (20 µg/ml). Las colonias resistentes al cloranfenicol se confirmaron mediante PCR, usando los cebadores uidB-UP-UidC-LP identificados por la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4. Los tiempos y temperaturas de ciclación se han descrito anteriormente. Las colonias positivas también fueron confirmadas por secuenciación. La cepa se vio obligada a perder el plásmido pKD46 al crecer varias etapas a 37 °C sin ampicilina, ya que pKD46 no se puede replicar a más de 30 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirmó por PCR.

5) El recombinante que carece de los genes *uidB-uidC*, *WG5AuidBuidC::cat*, se transformó con el plásmido pBAD::uidA generando *WG5AuidBuidC::cat* (pBAD::uidA). Este recombinante tiene varias propiedades. El transporte de β-glucurónido en la cepa se bloqueó, ya que los genes de transporte se delecionaron. La enzima β-glucuronidasa se sobreexpresó en el vector de expresión pBAD con un promotor inducible en presencia de L-arabinosa.

Huéspedes de *Salmonella* y *Shigella*

La cepa WG49 (ATCC 700730) de *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium y la cepa 668 (fuente clínica) de *Shigella flexneri* se usaron como cepas huésped. Ambas cepas no pudieron transportar el sustrato (X-glucurónido) ya que carecen de los genes *uidB* y *uidC*. Adicionalmente, ambas cepas carecen del gen *uidA* o cualquier otro gen capaz de usar el sustrato. Esto se confirmó usando agar Chromocult (laboratorios Merk). El medio contiene el sustrato X-glucurónido que es escindido por la enzima β-D-glucuronidasa que es característica de *E. coli*. Las colonias de *E. coli* en este agar aparecen de color azul oscuro, mientras que las colonias de *Salmonella* y *Shigella* aparecieron negativas.

Las cepas huésped recombinantes de *Salmonella* y *Shigella* se obtuvieron mediante electrotransformación de pBAD::uidA preparado como se ha descrito anteriormente en células competentes de *Salmonella* o *Shigella*. La confirmación de la clonación en ambas cepas se logró mediante el crecimiento de la cepa en ampicilina (amp) (100 µg/ml) y mediante PCR usando una combinación de cebadores con la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 (para el gen *uidA*) y la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10 (para el vector pBAD).

Pretratamiento de lodos y muestras de alimento

Las muestras se diluyeron 1/5 en tampón PBS. Las muestras de lodo se homogeneizaron durante 5 min usando un vórtice o las muestras de alimento se homogeneizaron usando un Stomacher durante 30 s. El homogeneizado se filtró a través de membranas de baja unión de 0,22 µm (PES, Millipore). El filtrado se diluyó diez veces sucesivamente y se usó para los experimentos como para el método descrito en muestras de agua.

45 Ejemplo 1: Detección de bacteriófagos con *E. coli* recombinante

La *WG5AuidBuidC::cat* (pBAD::uidA) se cultivó en caldo MSB estándar con ampicilina durante una noche a 37 °C. 1 ml del cultivo durante una noche se diluyó 1/100 en caldo MSB fresco con ampicilina y L-arabinosa hasta una fase de crecimiento exponencial, controlada por una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,3. En esta fase, se añadieron 0,5 ml de este cultivo activado a tubos que contenían 2,5 ml de medio de ensayo (MSB que contenía L-arabinosa, glicerol, CaCl₂ y X-glucurónico) y 0,1 ml de la suspensión de fagos correspondiente a partir de las diferentes muestras de ensayo. Un tubo sin fagos se mantuvo como control. Los tubos se incubaron estáticamente a 37 °C. Se observaron resultados positivos por cambio de color en los tubos que cambian de amarillo a azul después de algún tiempo. El control que contenía la cepa silvestre no mostró ninguna variación de color incluso después de 6 h de incubación (figura 2).

Los resultados positivos obtenidos por el método anterior fueron confirmados por el ensayo de la gota para evaluar la sensibilidad del método. Para ello, se extrajeron de los tubos partes alícuotas de 15 µl después de 4,5 horas de incubación y se colocaron en una monocapa de agar preparada como se describe en el método ISO 10705-2 que contenía la cepa *WG5AuidBuidC::cat* (pBAD::uidA) de *E. coli* recombinante. Las placas se incubaron a continuación a 37 °C. Aquellas placas que muestran lisis en el área de la gota indicaron que el tubo contenía fagos. La enumeración de fagos se realizó por el método del número más probable.

La primera evaluación fue que la modificación en la cepa no causó una disminución en el número de fagos detectados. La comparación de los recuentos de fagos por el método ISO entre la cepa WG5 de *E. coli* de tipo silvestre y la cepa recombinante mostrada en la tabla 1 no mostró diferencias significativas en las densidades de

fagos detectados por ambas cepas (Prueba de la T de Student para datos emparejados, P <0,05).

Tabla 1.- Enumeración de fagos mediante el método ISO que compara la WG5 de tipo silvestre y la *WG5ΔuidBuidC::cat (pBAD::uidA)* recombinante como cepas huésped

Ref. de la muestra	Fuente	WG5	<i>WG5ΔuidBuidC::cat (pBAD::uidA)</i>	Reducción logarítmica
SWG1	Aguas residuales	4,95x10 ⁴	3,80x10 ⁴	0,11
SWG2	Aguas residuales	7,27x10 ³	8,56x10 ³	-0,07
SWG3	Aguas residuales	1,95x10 ⁴	2,06x10 ⁴	-0,02
SWG4	Aguas residuales	7,91x10 ³	3,34x10 ³	0,37
SWG5	Aguas residuales	7,26x10 ³	5,12x10 ³	0,15
FW1	Agua de río	4,77x10 ¹	3,36x10 ¹	0,15
ΦX174	Laboratorio	5,70x10 ¹⁰	3,20x10 ¹⁰	0,25
Referencia:				
Mezcla de fagos*	Laboratorio	2,54·10 ⁶	2,14·10 ⁶	0,07

*La mezcla está compuesta por el fago ΦX174, un fago de *Siphoviridae* ambiental y un fago de *Myoviridae* ambiental.

5

Para estudiar adicionalmente el rendimiento del ensayo de color, se inocularon tubos que contenían 0,5 ml de cultivo activado y 2,5 ml de medio de ensayo a diferentes concentraciones de fagos a partir de muestras de agua dulce (FW) y aguas residuales (SW), así como a partir del stock de fagos, y se ensayaron usando el ensayo de color de la glucuronidasa. Cada dilución de fagos se ensayó por triplicado. La tabla 2 muestra aquellos tubos que muestran resultados positivos que se vuelven azules con respecto al número total de tubos analizados y los tiempos de detección correspondientes.

10

Tabla 2: resultados obtenidos por el ensayo de la invención a diferentes concentraciones de fagos, en tiempos de incubación de 2,5 a 4,5 horas.

Muestra	UFP/tubo ¹	Tubos positivos/tubos totales después de un tiempo de incubación de:		
		2,5 h	3,5 h	4,5 h
FW1	33,6	3/3	3/3	3/3
	16,8	2/3	2/3	3/3
	3,4	1/3	1/3	2/3
	1,7	0/3	0/3	2/3
	0,3	0/3	0/3	1/3
FW2	43	1/3	2/3	3/3
	21,5	1/3	2/3	3/3
	4,3	0/3	1/3	1/3
	2,15	0/3	0/3	1/3
	0,43	0/3	0/3	0/3
SW1	85,6	3/3	3/3	3/3
	17,1	1/3	3/3	3/3
	8,6	0/3	3/3	3/3
	1,7	0/3	2/3	2/3
	0,9	0/3	0/3	1/3
SW2	0,2	0/3	0/3	0/3
	33,4	3/3	3/3	3/3
	6,7	3/3	3/3	3/3
	3,3	2/3	3/3	3/3
	0,7	1/3	2/3	2/3
Mezcla de fagos ²	0,3	1/3	1/3	1/3
	0,1	0/3	0/3	1/3
	49,9	1/1	1/1	1/1
	16,6	1/2	1/2	2/2
	8,3	1/2	1/2	2/2
	1,7	0/2	0/2	1/2
	0,8	0/2	0/2	0/2
	0,5	0/2	0/2	0/2

¹Medidas después de calcular el título de fagos (ufp) en las muestras de agua mediante el método ISO.

²Mezcla compuesta por el fago ΦX174, un fago de *Siphoviridae* y un fago de *Myoviridae*.

15

El número de fagos inoculados por tubo se calculó mediante el método ISO. Se muestra que ya se pueden obtener resultados positivos a las 2,5 h a mayores densidades de fagos. A densidades más bajas, el tiempo de detección permanece dentro de las 6 horas, mientras que el control negativo sigue siendo negativo. Dependiendo de las

muestras, las densidades tan bajas como 1 fago/tubo muestran resultados positivos en al menos algunos de los tubos. A densidades tan bajas, la probabilidad de inocular un solo fago podría variar de un tubo a otro.

La relación entre los números de fagos contabilizados de acuerdo con el número más probable contabilizado, ya sea por cambio de color de los tubos de ensayo o por la evaluación de la replicación de fagos en los mismos tubos por el ensayo de la gota, se muestra en la figura 3. La comparación de los valores promediados a partir de las diferentes densidades de fagos ($<10^2$, 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp/ml) (figura 3) no mostraron diferencias significativas entre ambos cálculos en ninguno de los intervalos, lo que indica que la sensibilidad del método es similar a la del método de ensayo de la gota, aunque los valores obtenidos en el ensayo de la gota son, en todos los casos, ligeramente más altos que con el ensayo de color de glucuronidasa.

Se realizaron ensayos adicionales para detectar fagos en diferentes tipos de muestras. En particular, los lodos de aguas residuales y los mejillones contaminados con aguas residuales se pretrataron como se ha descrito anteriormente y se ensayaron con el ensayo de color de la invención. La tabla 4 muestra los resultados obtenidos. La tabla muestra los números de fagos (calculados por el método de doble capa de agar siguiendo el procedimiento ISO) en diferentes diluciones a partir de cada muestra y el resultado positivo/negativo correspondiente como se obtiene por el ensayo de cambio de color (resultado positivo: cambio de color de amarillo a azul; resultado negativo: sin cambio de color).

Tabla 4. Fagos en lodos de aguas residuales y mejillones contaminados con aguas residuales usando *E. coli* recombinante

Tipo de muestra	Ufp de fagos en muestras (V=0,5 ml)	Ensayo de color	
		Resultado	t de incubación
Lodo de aguas residuales Gavà 1	945	+++	2h 15min
	94,5	+++	
	9,45	+++	
Lodo de aguas residuales Gavà 2	515	+++	2h 28min
	51,5	+++	
	5,15	++-	
Lodo de aguas residuales Gavà 3	445	++	2h 15min
	44,5	++	
	4,45	+-	
	0,45	--	
	155	+++	
Mejillones contaminados con aguas residuales 1	15	+++	2h 30min
	1,5	---	
	1600	+++	
	33,5	+++	
Mejillones contaminados con aguas residuales 2	3	-+	2h 34min
	<0,25	---	

+, resultado positivo
 -, resultado negativo
 Cada muestra se ensayó por duplicado o por triplicado, por lo que cada signo + o - corresponde a un ensayo (+++ indica positivo para los tres ensayos; --- indica negativo para los tres ensayos)

Ejemplo 3. Detección de bacteriófagos en aguas residuales con cepas de *Salmonella* y *Shigella*

Los cultivos de *Salmonella* y *Shigella* que contienen el gen pBAD::uidA se evaluaron para la detección de bacteriófagos en aguas residuales.

La enumeración de fagos que infectan las cepas se realizó mediante el método de agar doble. En resumen, cada cepa se hizo crecer en LB + L-arabinosa al 0,05 % + amp a 37 °C hasta alcanzar una densidad de $DO_{600} = 0,3$.

Se mezcló 1 ml de cada cultivo con 1 ml o 0,5 ml de agua residual previamente filtrada a través de membranas de baja unión de 0,22 µm (PES, Millipore). La mezcla de fago-bacterias se mezcló suavemente con 3 ml de agar blando MSB (agar al 0,7 %) y se vertió en placas de agar MSB. Las placas se colocaron al revés hasta que el agar blando se solidificó y se incubaron a 37 °C durante 18 h. Los fagos se enumeraron contando las placas líticas (unidades formadoras de placas o ufp). El número estimado de fagos para cada bacteria fue

S. Typhimurium = $9,34 \cdot 10^2$ ufp/ml

Shigella flexneri = $5,10 \cdot 10^2$ ufp/ml.

Se usaron 0,5 ml de cada dilución de la muestra de agua residual (directa, 1/10 y 1/100) para inocular un cultivo líquido de 2,5 ml que contenía MSB+sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolin-beta-D-glucurónico)+L-

arabinosa+glicerol+CaCl₂ (mismo medio líquido usando para el método descrito). A esta mezcla, se le añadieron 0,5 ml de cepas de *Salmonella* o *Shigella* crecidas a DO₆₀₀ = 0,3 y se incubaron a 37 °C.

Tabla 5. fagos en aguas residuales usando *S. Typhimurium* y *Shigella flexneri* recombinantes

Huésped de cepa bacteriana	Ufp en muestras (V=0,5 ml)	Ensayo de color	
		Resultado	t de incubación
<i>S. Typhimurium</i>	467	+	3,5 h
	46,7	+	
	4,67	-	
	255	+	
<i>Shigella flexneri</i>	25,5	-	305 h
	2,5	-	
	2,5	-	

+, resultado positivo
-, resultado negativo

5

Se observó un cambio de color después de 3,5 horas en ambas cepas y se mantuvo hasta 24 horas de incubación. No se observó cambio de color del control que no contenía muestras de aguas residuales, incluso después de 24 horas de incubación.

10 4. Detección de condiciones bacteriolíticas distintas a la presencia de bacteriófagos con cepas de *Salmonella* y *Shigella*

Los cultivos de *Salmonella* y *Shigella* que contenían el gen pBAD::uidA se evaluaron para detectar otras condiciones bacteriolíticas, en particular, sonicación y tratamientos térmicos.

15

Sonicación

Se añadieron 0,5 ml de cepas de *Salmonella* o *Shigella* cultivadas a DO₆₀₀ = 0,3 a una mezcla que contenía MSB + sustrato (5-bromo-4cloro-3indolin-beta-D-glucurónico)+L-arabinosa+glicerol+CaCl₂ (mismo medio líquido usado para el método descrito).

20

La muestra se incubó en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después del tratamiento, la muestra se incubó a 37 °C durante 24 horas. Se observó cambio de color después de 4 horas siendo más visible después de 24 horas. No se observaron cambios en el control sin tratamiento.

25

Tratamiento térmico

Se añadieron 0,5 ml de cepas de *Salmonella* o *Shigella* cultivadas a DO₆₀₀ = 0,3 a una mezcla que contenía MSB + sustrato (5-bromo-4cloro-3indolin-beta-D-glucurónico)+L-arabinosa+glicerol+CaCl₂ (mismo medio líquido usado para el método descrito).

30

La muestra se incubó en un baño a 90 °C durante 10 minutos. Después del tratamiento, la muestra se incubó a 37 °C durante 24 horas. Se observó cambio de color después de 24 horas. No se observaron cambios en el control sin tratamiento.

35

Tabla 6. Detección de condiciones de sonicación y alta temperatura usando *S. typhimurium* y *Shigella flexneri* recombinantes

Huésped de cepa bacteriana	Condición bacteriolítica	Ensayo de color	
		Resultado	t de incubación
<i>S. Typhimurium</i>	Sonicación	+	4 h
<i>S. Typhimurium</i>	Alta temperatura	+	24 h
<i>Shigella flexneri</i>	Sonicación	+	4 h
<i>Shigella flexneri</i>	Alta temperatura	+	24 h

+, resultado positivo
-, resultado negativo

REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

40

Lucena F.; Jofre J. "Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes". En SABOUR, P.M.; GRIFFITHS, M.W. (ed). Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens. ASM Press, Washington DC, 2010, págs 103-118

45

USEPA, 2006, National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule; Final Rule; 40 CFR Partes 9,

ES 2 733 766 T3

- 141 y 142. Federal Register, vol. 71, No. 216. p. 65574-65660. Environmental Protection Agency. Washington DC
- Queensland Government, 2005, Water recycling guidelines. Queensland State EPA, Brisbane. Australia
- 5 ISO 10705-2. 2000; APHA, AWWA y WPCF, 2001; o USEPA 2001a. Método 1602
- Muniesa et al., 2003, "Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages". *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 305-315
- 10 Guzman et al., 2008, "Evaluation of *Escherichia coli* host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages". *Appl. Environ. Microbiol.*;74(2):531-4
- Salter et al., 2010, "Proposed modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for detection of coliphages in drinking water, with same-day fluorescence-based detection and evaluation by the performance-based measurement system and alternative test protocol validation approaches"; *Appl Environ Microbiol.* 76(23):7803-10
- 15 Guzman et al., 2009, "Detection of somatic coliphages through a bioluminescence assay measuring phage mediated release of adenylate kinase and adenosine 5'-triphosphate"; *J Virol Methods.* 161(1):107-13
- 20 J Sambrook y DW Russell 2001, "Molecular cloning: a laboratory manual", 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y
- M Muniesa et al, 2006, "T Active genetic elements present in the locus of enterocyte effacement in *Escherichia coli* 026 and their role in mobility", *Infect Immun* 74(7):4190-9
- 25 Datsenko KA, Wanner BL., 2000, "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 97: 6640-6645
- 30 Hanahan D. et al., 1983, "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids"; *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557-580

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Universitat de Barcelona
- <120> Método para detectar condiciones bacteriolíticas en una muestra
- <130> WO-AVCRI215
- 40 <150> EP13382459.9
- <151> 13/11/2013
- <160> 13
- 45 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 18
- 50 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador UidA-For2
- 55 <400> 1
- cttaatgagg agtcctt 18
- <210> 2
- 60 <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 65 <223> cebador UidA-Rev2

ES 2 733 766 T3

<400> 2
 ccaggagagt tgttgatt 18

5 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador uidB-UP

<400> 3
 ctggactggc atgaactc 19

15 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador uidC-LP

<400> 4
 acttcagcat aaagtcatac t 21

25 <210> 5

<211> 56
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador UidB-Cm5

35 <400> 5
 aagtatagga acttcgaagc agctccagcc tacacacact gtccaccact cgtccg 56

<210> 6
 <211> 55
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220><223> cebador UidC-Cm3

45 <400> 6
 acttcggaat aggaactaag gaggatattc atatgacgct gacatttgca ccgat 55

<210> 7
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador Cm -5

55 <400> 7
 tgtgtaggct ggagctgct c 21

<210> 8
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <223> cebador Cm -3

ES 2 733 766 T3

	<400> 8 catatgaata tcctccttag	20
5	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador pBADf	
	<400> 9 atgcatagc attttatcc	20
15	<210> 10 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador pBADr	
	<400> 10 gatttaact gtatcagg	18
25	<210> 11 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador RR46 -UP	
	<400> 11 gagctctaag gaggttat	18
40	<210> 12 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador RR46-LP	
45	<400> 12 gtgcagtact cattcggt	18
50	<210> 13 <211> 1015 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Plásmido pKD3 modelo	
55	<400> 13	

ES 2 733 766 T3

	tgtgtaggct ggagctgctt cgaagttcct atactttcta gagaatagga acttcggaat	60
	aggaacttca tttaaatggc ggcgcttacg ccccgccctg cactcatcg cagtactgtt	120
5	gtattcatta agcatctgcc gacatggaag ccatcacaaa cggcatgatg aacctgaatc	180
	gccagcggca tcagcacctt gtcgccttgc gtataatatt tgcccatggt gaaaacgggg	240
10	gcgaagaagt tgtccatatt ggccacgttt aatcaaaac tggtgaaact cacccaggga	300
	ttggctgaga cgaaaaacat attctcaata aaccctttag ggaaataggc caggttttca	360
15	ccgtaacacg ccacatcttg cgaatatatg tgtagaaact gccggaaatc gtcgtggtat	420
	tcactccaga gcgatgaaaa cgtttcagtt tgctcatgga aaacgggtgta acaagggtga	480
20	acactatccc atatcaccag ctcaccgtct ttcattgcca tacgtaattc cggatgagca	540
	ttcatcaggc gggcaagaat gtgaataaag gccggataaa acttgtgctt atttttcttt	600
25	acggtcttta aaaaggccgt aatatccagc tgaacggctt ggttataggt acattgagca	660
	actgactgaa atgcctcaaa atgttcttta cgatgccatt gggatatatc aacgggtgga	720
30	tatccagtga tttttttctc catttttagct tccttagctc ctgaaaatct cgacaactca	780
	aaaaatacgc ccggtagtga tcttatttca ttatggtgaa agttggaacc tcttacgtgc	840
35	cgatcaacgt ctcattttcg ccaaaagttg gcccagggct tcccggtatc aacagggaca	900
	ccaggattta tttattctgc gaagtgatct tccgtcacag gtaggcgcgc cgaagttcct	960
	atactttcta gagaatagga acttcggaat aggaactaag gaggatattc atatg	1015

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una condición bacteriolítica seleccionada del grupo que consiste en estrés físico, la presencia de bacteriófagos, la presencia de proteínas bacteriolíticas y la presencia de compuestos químicos bacteriolíticos en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto la muestra de ensayo con una cepa bacteriana y un sustrato que experimenta un cambio detectable cuando es escindido por una enzima específica de dicha cepa bacteriana,
5 en donde la cepa bacteriana es *E. coli* que sobreexpresa el gen *uidA* y que comprende los genes *uidB* y/o *uidC* alterados y el sustrato es glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico, y en
10 donde detectar un cambio en la muestra de ensayo debido a la escisión del sustrato por su enzima bacteriana específica indica que existe una condición bacteriolítica en la muestra de ensayo.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa de activación antes de la etapa de contacto, en donde dicha etapa de activación comprende incubar la cepa bacteriana en un medio de crecimiento
15 apropiado hasta que alcanza la fase de crecimiento logarítmico.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la etapa de contacto se realiza incubando durante un tiempo comprendido entre 1 minuto y 6 horas.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de agua, una muestra de lodo de aguas residuales y una muestra de alimento.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la condición bacteriolítica es la presencia de bacteriófagos.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde los bacteriófagos son bacteriófagos fecales.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que es para detectar contaminación adicional en el entorno.
- 30 8. Un kit para realizar el método de las reivindicaciones 1-7, que comprende una cepa bacteriana y un sustrato que experimenta un cambio detectable cuando es escindido por una enzima específica de dicha cepa bacteriana, en donde la cepa bacteriana es *E. coli* que sobreexpresa el gen *uidA* y que comprende los genes *uidB* y/o *uidC* alterados y el sustrato es glucurónido unido por un enlace glucosídico a un resto colorimétrico o fluorimétrico.

FIG. 1

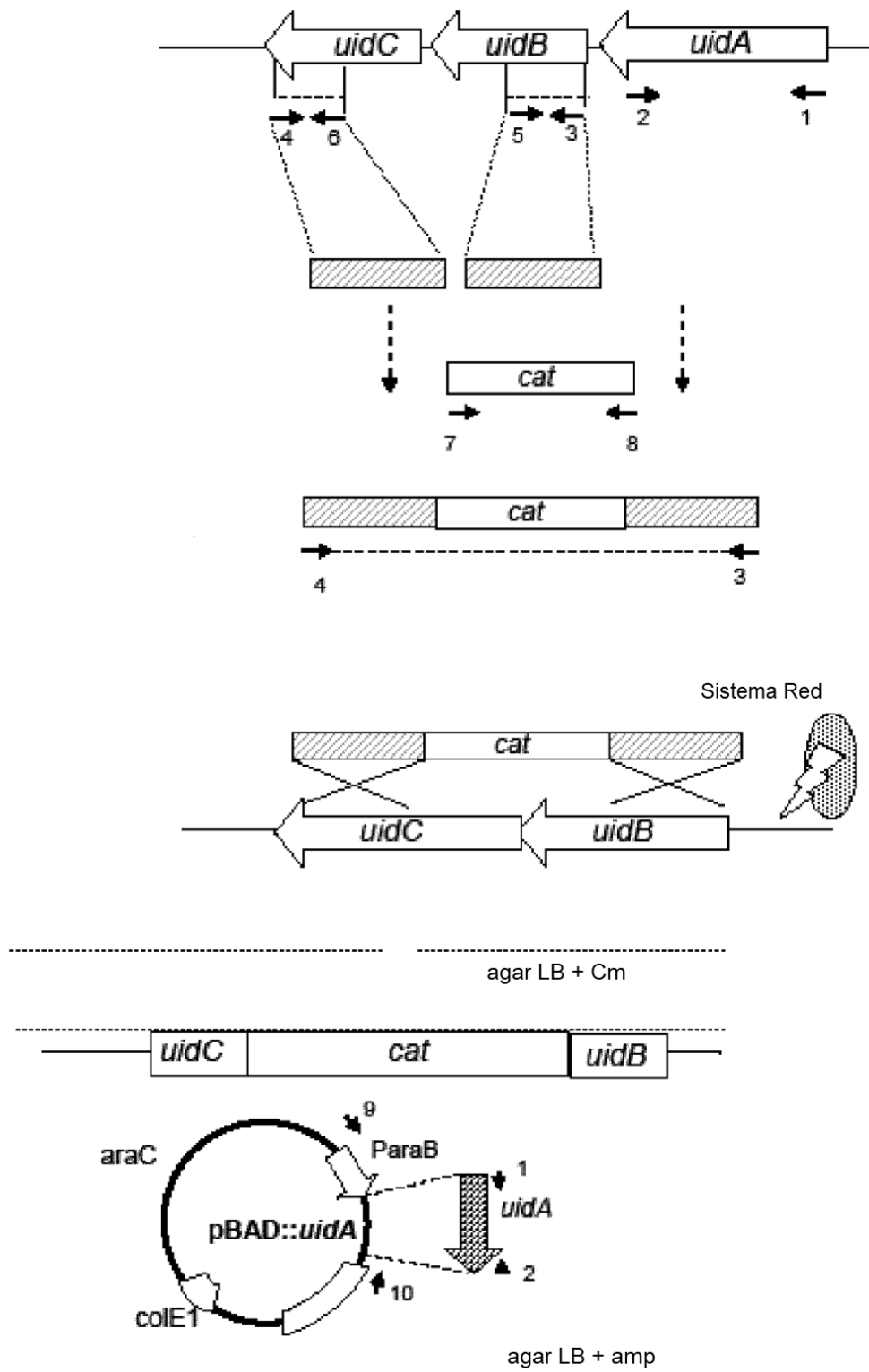


FIG. 2

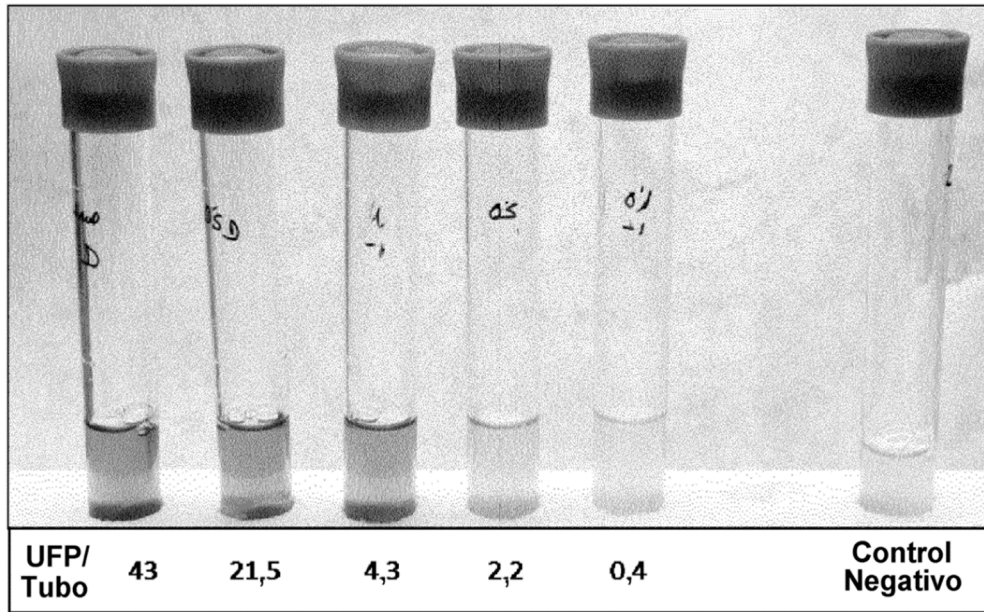
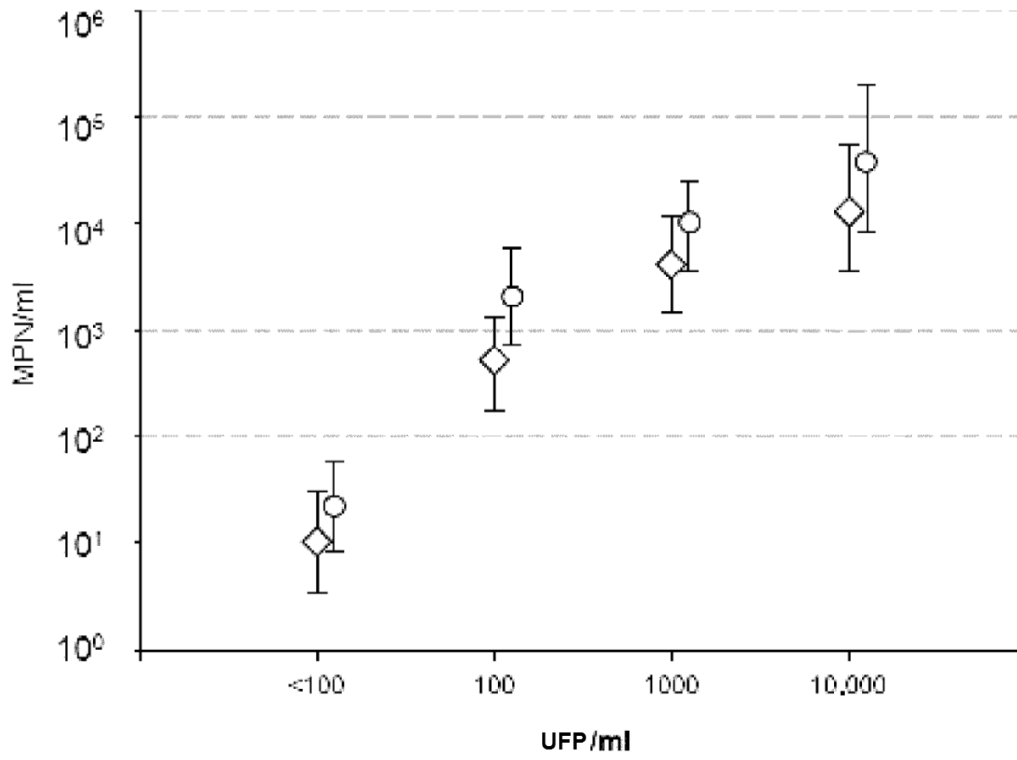


FIG. 3



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9428179 A1 [0007]
- WO 0179528 A, Adams [0009]
- WO 9428179 A [0015]
- EP 13382459 A [0079]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes. **LUCENA F.; JOFRE J.** Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens. ASM Press, 2010, 103-118 [0003] [0078]
- Federal Register. Environmental Protection Agency, vol. 71, 65574-65660 [0003] [0078]
- **MUNIESA et al.** Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, vol. 83, 305-315 [0005] [0078]
- **GUZMAN et al.** Evaluation of Escherichia coli host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74 (2), 531-4 [0005] [0078]
- **SALTER et al.** Proposed modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for detection of coliphages in drinking water, with same-day fluorescence-based detection and evaluation by the performance-based measurement system and alternative test protocol validation approaches. *Appl Environ Microbiol.*, 2010, vol. 76 (23), 7803-10 [0008] [0078]
- **GUZMAN et al.** Detection of somatic coliphages through a bioluminescence assay measuring phage mediated release of adenylate kinase and adenosine 5'-triphosphate. *J Virol Methods.*, 2009, vol. 161 (1), 107-13 [0010] [0078]
- **J SAMBROOK; DW RUSSELL.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0030] [0078]
- **M MUNIESA et al.** T Active genetic elements present in the locus of enterocyte effacement in Escherichia coli O26 and their role in mobility. *Infect Immun*, 2006, vol. 74 (7), 4190-9 [0030] [0078]
- **DATSENKO KA; WANNER BL.** One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2000, vol. 97, 6640-6645 [0053]
- **HANAHAN D. et al.** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 1983, vol. 166 (4), 557-580 [0057] [0078]
- **SAMBROOK J.; D. W. RUSSELLM.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0057]
- **DATSENKO KA; WANNER BL.** One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2000, vol. 97, 6640-6645 [0078]