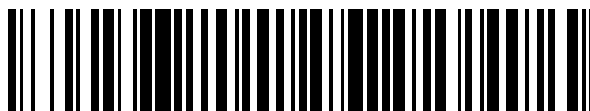


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 215**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12Q 1/24** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2010 E 10723931 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2443226**

54 Título: **Método para el aislamiento de células**

30 Prioridad:

**18.06.2009 EP 09007959**

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

**18.02.2015**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**ROSSMANITH, PETER;  
MESTER, PATRICK JULIAN y  
WAGNER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 529 215 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 el aislamiento de células

5 La presente invención hace referencia a un método y un kit para el aislamiento de células de una muestra. La muestra se trata con una solución de extracción que comprende al menos un líquido iónico, lo que da como resultado el aislamiento de, preferiblemente, células viables.

Antecedentes de la invención

10 El aislamiento de células a partir de muestras complejas para su identificación o caracterización o simplemente para un procesamiento adicional, se está volviendo cada vez más importante, en particular la identificación de patógenos en muestras como muestras de comida o muestras clínicas como sangre, tejido o heces. Sin embargo, para identificar claramente y opcionalmente para cuantificar las células comprendidas en una muestra, han de proporcionarse métodos para su aislamiento.

15 La PCR en tiempo real ha aumentado enormemente el campo de aplicación de la PCR como una herramienta cuantitativa en la biología molecular en general y para la cuantificación e identificación de microorganismos, en particular de patógenos. La PCR en tiempo real permite la detección fiable y la cuantificación hasta un único ácido nucleico diana por reacción en PCR pero requiere un ADN molde sumamente purificado. Especialmente cuando se trata del diagnóstico rutinario y de la detección cuantitativa de bacterias en ambientes complejos tales como los alimentos, estos requerimientos juegan un papel clave, ya que efectos inhibidores causados por componentes de estos ambientes pueden influenciar o incluso inhibir la reacción por PCR. Más aún, es crucial emplear un método de recuperación fiable y eficiente a ser utilizado para el aislamiento de los organismos diana a partir de muestras complejas como alimentos. Debido a que las muestras como alimentos implican, generalmente, volúmenes de muestras grandes, se utilizan normalmente métodos microbiológicos para el aislamiento y enriquecimiento de microorganismos. Estos métodos representan métodos del "estándar de oro" y deben evaluarse nuevas técnicas alternativas en comparación con los mismos.

20 Se han realizado importantes esfuerzos para establecer métodos para la separación de microorganismos, por ejemplo de bacterias, de alimentos que cumplan con los exigentes requerimientos de la PCR en tiempo real y otros métodos moleculares para el análisis aguas abajo (downstream) de los microorganismos.

25 Además se ha intentado el aislamiento del ADN directamente de la comida utilizando métodos de aislamiento del ADN utilizados de manera habitual en biología molecular. Otros métodos utilizan la afinidad de las biomoléculas con las estructuras superficiales de los microorganismos, en donde dichas biomoléculas pueden ser, por ejemplo, anticuerpos, proteínas de unión a bacterias de fagos y péptidos antimicrobianos (AMP por sus siglas en inglés), opcionalmente en combinación con perlas magnéticas, portaobjetos de vidrio silanizado o transferencia de colonias directa. Por ejemplo, para la detección directa de *Listeria monocytogenes* puede utilizarse un sistema de separación en dos fases acuoso (Lantz et al. Appl Environ Microbiol. (1994) 60:3416-3418).

30 La centrifugación en gradiente de densidad de flotación se ha establecido como una herramienta para la separación de bacterias de matrices de alimentos (Wolffs P. et al. Appl Environ Microbiol. (2005) 71:5759-5764). Otros métodos están basados en la separación física tal como la centrifugación y filtración simples. También han sido descritos métodos que aplican la digestión enzimática de la matriz de alimentos que utilizan proteinasa K y pronasa y/o extracción química de las bacterias de la comida que utilizan tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo, éter dietílico/cloroformo, y citrato de sodio/polietilenglicol. Se describen métodos actuales para el aislamiento de células, en particular microorganismos, a partir de muestras complejas en, por ejemplo, Stevens KA and Jaykus L-A (Crit Rev Microbiol (2004) 30:7-24).

35 La mayoría de estos métodos presentan desventajas como el tamaño insuficiente del volumen de muestra procesado, elevadas limitaciones de detección, tasas de recuperación bajas, aislamiento de células viables no cuantitativo, procedimientos que consumen mucho tiempo y costes elevados. Además la aplicación de estos métodos se ha restringido en la mayoría de los casos a únicamente una o a un número limitado de matrices de alimentos. En base a los requerimientos para la cuantificación directa de bacterias en alimentos, que son (i) un volumen de muestra grande, (ii) una tasa de recuperación reproducible sobre un amplio rango de concentración diana, y (iii) eliminación de inhibidores para ayudar a los métodos alternativos en el análisis aguas abajo, se han de proporcionar nuevos protocolos para la separación de células y microorganismos, como el patógeno alimenticio *L. monocytogenes*.

40 El documento WO 2008/017097 revela un método para el aislamiento de células a partir de matrices complejas, como productos alimenticios. Este método utiliza un tampón de extracción que comprende un agente caotrópico en combinación con un detergente.

Otra cuestión clave en el análisis de alimentos es la determinación de la viabilidad de las bacterias contaminantes. Hasta ahora la mayoría de los métodos no pueden distinguir entre células viables y células bacterianas muertas. Además de lisar la a menudo compleja matriz de muestras de alimentos, se necesitan condiciones de lisis que tengan un impacto negativo en la viabilidad de las células que van a ser aisladas a partir de tales muestras. Este problema reduce el beneficio de utilizar, por ejemplo, métodos de PCR para la monitorización rutinaria en el análisis de alimentos. Por un lado, algunas células resultan muertas durante la extracción, por otro lado, también se extraen y se determinan células no viables o dañadas que ya han estado presentes en la muestra antes de la extracción, aunque no tienen ningún efecto adicional en la calidad de la muestra.

O.F. D'Urso et al., en Food Microbiology 26 (2009) 311-316 han desarrollado un método basado en la filtración para el aislamiento de células viables. El tampón utilizado en este método comprende cantidades elevadas del agente caotrópico tiocianato de guanidina que a menudo interfiere con los procesos aguas abajo y por tanto ha de ser eliminado con procedimientos de lavado complicados.

En consecuencia, existe una clara necesidad de métodos reproducibles y cuantitativos para el aislamiento de células a partir de matrices complejas como alimentos y sangre con la posibilidad de aislar células viables.

Breve descripción de la invención

Se ha observado que los contaminantes celulares como las bacterias pueden ser aislados de forma muy efectiva de matrices complejas utilizando un tampón que comprende al menos un líquido iónico. Además, debido a las condiciones muy suaves pero efectivas de extracción, este método permite el aislamiento de células viables.

Por lo tanto la presente invención hace referencia a un método para el aislamiento de células rodeadas por una pared celular a partir de una muestra de alimentos, un fluido corporal, agua o una muestra de tejido que comprende las etapas de:

a) proporcionar dicha muestra,

b) incubar dicha muestra con una solución de extracción que comprende al menos un líquido iónico en concentraciones entre 0,5 y 20% en peso en base al peso de la mezcla,

c) aislar dichas células de la mezcla de la etapa b), mediante centrifugación, filtración, dielectroforesis y ultrasonido o afinidad de unión.

Descripción de la invención

Resultó de manera sorprendente que la incubación de una muestra compleja con una solución de extracción que comprende al menos  $MgCl_2$  y/o un líquido iónico da como resultado la disolución de la muestra sin afectar a las células que comprenden o que están rodeadas de una pared celular contenida en dicha muestra. Por lo tanto, el método de acuerdo con la presente invención puede ser empleado de manera adecuada para el aislamiento de tales células.

De acuerdo a la presente invención, el método puede ser utilizado preferiblemente para aislar células rodeadas por una pared celular, por lo cual el término "células rodeadas por una pared celular" hace referencia a todas las células conocidas que tienen o comprenden una pared celular como una barrera al entorno. Ejemplos de organismos o células que tienen una pared celular son bacterias, archaea, hongos, plantas y algas. En contraste con los mismos, los animales y la mayoría de otros protistas tienen membranas celulares sin paredes celulares que les rodeen.

El término "muestra compleja" hace referencia a una muestra o matriz de la muestra que comprende un mayor o menor número de diferentes compuestos de origen orgánico principalmente, algunos de los cuales son líquidos y otros de los cuales son sólidos. Una muestra compleja de acuerdo a la presente invención puede comprender una matriz que comprende péptidos, polipéptidos, proteínas (incluyendo además enzimas), carbohidratos (carbohidratos complejos y simples), lípidos, ácidos grasos, grasa, ácidos nucleicos, etc. La muestra de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente una baja cantidad de fibras/almidón.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término "muestra con una baja cantidad de fibras/almidón" se utiliza en un amplio sentido y pretende incluir una variedad de muestras que contengan o puedan contener células.

Las muestras preferidas comprenden menos del 20% (peso/peso), más preferiblemente menos del 10%, incluso más preferiblemente menos del 5%, de manera especialmente preferida menos del 1%, en particular ninguna cantidad (por debajo de o alrededor del límite de detección), de fibras/almidón. "Fibras", tal como se utiliza en el presente documento, comprende fibras de origen vegetal además de animal (por ejemplo, fibras de colágeno).

Muestras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, alimentos (por ejemplo leche de vacas, ovejas, cabras, yeguas, burros, camellos, yacs, búfalo acuático y reno, productos lácteos, carne de ternera, cabra, cordero, carnero, cerdo, ancas de rana, bovino, roedores, caballo, canguro, aves de corral, incluyendo pollo, pavo, pato, ganso, pichón o paloma, avestruz, emú, pescado y mariscos, incluyendo pescado de aleta tales como salmón y tilapia, y marisco de concha tales como moluscos y crustáceos y caracoles, productos cárnicos, productos vegetales, semillas, cereales procedentes de gramináceas, incluyendo maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo, y mijo, cereales procedentes de no gramináceas, incluyendo trigo sarraceno, amaranto, y quinua, legumbres, incluyendo alubias, cacahuetes, guisantes, y lentejas, frutos secos, incluyendo almendras, nueces, y piñones, plantas oleaginosas, incluyendo girasol, colza y sésamo, hortalizas tales como hortalizas de raíz, incluyendo patatas, tapioca y nabos, verduras de hoja, incluyendo amaranto, espinaca y acelgas, vegetales marinos, incluyendo dulce, kombu, y alaria esculenta, hortalizas de tallo, incluyendo brotes de bambú, nopal, y espárragos, hortalizas de flor, incluyendo alcachofas, brécol, y liliáceas, y hortalizas de fruto, incluyendo calabazas, oca y berenjenas, frutas, hierbas y especias, sangre entera, orina, esputos, saliva, líquido amniótico, plasma, suero, lavado pulmonar y tejidos, incluyendo pero sin limitarse a, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas y similares. Los expertos en el arte apreciarán que los lisados, extractos o material (homogeneizado) procedente de cualquiera de las anteriores muestras a modo de ejemplo o de las mezclas de dichas muestras a modo de ejemplo o composiciones que comprendan una o más de dichas muestras de los ejemplos, son también muestras que se encuentran dentro del alcance de la invención.

El término "tampón" tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a soluciones o composiciones acuosas que resisten los cambios en el pH cuando se añaden ácidos o bases a la solución o composición. Esta resistencia al cambio del pH se debe a las propiedades de amortiguación de tales soluciones. Por tanto, se hace referencia a las soluciones o composiciones que muestren actividad de amortiguación como tampones o soluciones tampón. Los tampones generalmente no tienen una habilidad ilimitada para mantener el pH de una solución o composición. Más bien son habitualmente capaces de mantener el pH dentro de determinados rangos, por ejemplo entre un pH 7 y un pH 9. Habitualmente, los tampones tienen la capacidad de mantener el pH dentro de un logaritmo por encima o por debajo de su pKa (ver por ejemplo, C. Mohan, Buffers, A guide for the preparation and use of buffers in biological systems, CALBIOCHEM, 1999). Los tampones y las soluciones tampón son generalmente elaboradas a partir de sales tampón o preferiblemente de componentes tampón no iónicos como TRIS y HEPES. El tampón añadido a la solución de extracción garantiza que el valor del pH en el transcurso de la disolución de la matriz se estabilizará. Un valor del pH estabilizado contribuye a resultados reproducibles, una lisis eficaz y a la conservación de las células aisladas.

De acuerdo con un modo de realización preferido de la presente invención las células aisladas son células viables.

Se observó de manera sorprendente que las células aisladas con el método de acuerdo a la presente invención son células viables (al menos un 10%, preferiblemente al menos un 30%, más preferiblemente al menos un 50%, incluso más preferiblemente al menos un 70%, de mayor preferencia al menos un 90% de las células intactas totales aisladas), y pueden ser cultivadas en medios de cultivo adecuados.

Tal como se utiliza en la presente patente, "células viables" incluyen células con metabolismo activo, preferiblemente que se propaga, especialmente células que son capaces de multiplicarse.

Las células a ser aisladas con el método de acuerdo con la presente invención son células bacterianas, preferiblemente células bacterianas Gram-positivas o Gram-negativas, células fúngicas, células archaeas, células de algas o células vegetales. Las células particularmente preferidas se seleccionan del grupo que consiste en *Listeria spp.*, *S. aureus*, *P. paratuberculosis*, *Salmonella spp.*, *C. jejuni* y *Penicillium roquefortii*.

El método de la presente invención permite el aislamiento de células que tienen o que comprenden una pared celular.

La presente invención permite de manera específica el aislamiento de células microbianas en general, preferiblemente microbios patógenos y alimenticios, especialmente aquellos de relevancia para humanos, por ejemplo aquellos potencialmente presentes en alimentos o patógenos para humanos con relevancia clínica. Por lo tanto, el método de la presente invención permite aislar células bacterianas, células fúngicas, células archaeas, células de algas y células vegetales a partir de una muestra sumamente compleja (por ejemplo, alimentos).

De acuerdo con un modo de realización preferido de la presente invención, la muestra es una muestra de alimentos, un fluido corporal, en particular sangre, plasma o suero, agua o una muestra de tejido.

Las muestras particularmente preferidas son muestras con una matriz compleja (es decir, que comprenden entre otras proteínas, lípidos, carbohidratos, etc.) y/o una elevada viscosidad.

La muestra de alimento es preferiblemente un producto lácteo, preferiblemente leche, en particular leche cruda, leche en polvo, yogurt, queso o helado, un producto de pescado, preferiblemente pescado crudo, un producto cárnico, preferiblemente carne cruda, lavados de carne o salchichas, lavados de ensaladas, chocolate, huevo o productos a base de huevo, como la mayonesa.

5 Las muestras de alimento preferidas utilizadas en el método de acuerdo con la presente invención son muestras que se sabe que comprenden habitualmente organismos potencialmente patógenos (por ejemplo, *L.monocytogenes*) y de los cuales - debido a una matriz compleja - casi no pueden extraerse células con los métodos conocidos en el arte. En particular el queso es conocido como un alimento con una matriz compleja y una elevada viscosidad.

10 De acuerdo con la presente invención, la solución de extracción utilizada como sistema de lisis de la matriz comprende un líquido iónico. El  $MgCl_2$  - si se encuentra presente - está habitualmente presente en concentraciones entre 0,5 y 3 M, preferiblemente entre 0,5 y 2 M, más preferiblemente entre 1 y 2 M.

El líquido iónico se encuentra presente en concentraciones entre el 0,5 y el 20% en peso, preferiblemente entre el 1 y el 10% en peso, en base al peso de la mezcla. El líquido iónico puede ser un líquido iónico o una mezcla de dos o más líquidos iónicos.

15 La mejor concentración de  $MgCl_2$  y el líquido iónico dependen principalmente de la muestra a ser disuelta y de la especie celular a ser aislada. Estos parámetros pueden ser sometidos a prueba de manera sencilla por una persona experta en el arte.

20 La solución de extracción de la presente invención es una solución acuosa o una solución tampón. Tiene un valor de pH habitualmente mayor a 5 e inferior a 9, preferiblemente mayor a 6 e inferior a 8, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. La solución de extracción puede comprender adicionalmente hasta un 20% de uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua.

El tampón que puede ser utilizado en el método de la presente invención se selecciona preferiblemente del grupo de tampón de fosfato, tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), tampón de 2-amino-2-hidroximetil-1, 3-propanodiol (TRIS), tampón de solución salina tamponada con TRIS (TBS) y TRIS/EDTA (TE).

25 En contraste con métodos conocidos, de acuerdo con el método de la presente invención se añade a la solución de extracción dodecilsulfato sódico, CHAPS, Lutensol AO-7, de tipo no detergente, es decir de tipo no aniónico, ion dipolar o de tipo detergente no-iónico.

30 Es por supuesto posible añadir a la solución de extracción una o más de las sustancias adicionales tales como agentes desestabilizantes o enzimas de degradación de biopolímeros que ayudan a degradar las sustancias presentes en muestras específicas. Tal como se discute más adelante, un ejemplo es la adición de enzimas de degradación de almidón para muestras de alimentos que comprenden cantidades elevadas de colágeno y/o almidón.

La incubación es habitualmente realizada a temperaturas entre 18°C y 50°C, preferiblemente entre 25°C y 45°C, más preferiblemente entre 30°C y 42°C.

35 La muestra se incuba habitualmente con la solución de extracción durante un tiempo entre 10 minutos y 6 horas, preferiblemente entre 20 minutos y 1 hora.

Para disolver la muestra incluso de manera más eficiente y en un tiempo reducido, resulta ventajoso realizar la incubación a una temperatura elevada. Sin embargo, debe ponerse especial cuidado en que las elevadas temperaturas no afecten - si así se desea - a la viabilidad de las células a ser aisladas.

40 Después de la incubación de la muestra con la solución de extracción, y por tanto de la disolución y de la lisis de la matriz de muestra, las células pueden aislarse mediante centrifugación, filtración, dielectroforesis y ultrasonidos o afinidad de unión, por ejemplo utilizando anticuerpos, lectinas, proteínas de unión viral, aptámeros o péptidos antimicrobianos (AMP) que preferiblemente se inmovilizan en perlas. Preferiblemente, las células se aíslan mediante filtración o centrifugación, de mayor preferencia mediante centrifugación.

45 La centrifugación se realiza habitualmente a 500 a 10000 g, más preferiblemente a 1500 hasta 6000 g, incluso más preferiblemente a 2000 hasta 5000 g. Después de la etapa de centrifugación las células pueden ser encontradas en el pellet y el sobrenadante puede ser desechado.

Si la mezcla de la muestra/solución de extracción se filtra, las células son retenidas en la superficie de dicho filtro, cuando el tamaño de poro del filtro se adapta al tamaño de las células a ser aisladas. Por supuesto, puede también ser posible aplicar más de una etapa de filtración con diferentes filtros que tengan diversos tamaños de poro.

Después de la etapa de filtración las células pueden lavarse de la superficie del filtro (ver por ejemplo, Stevens KA y Jaykus L-A, Crit Rev Microbiol (2004) 30:7-24). La filtración de la muestra lisada se requiere en particular cuando la muestra compleja comprende material que difícilmente será lisado o no será lisado en absoluto con el método de la presente invención.

5 Habitualmente, estos materiales comprenden almidón y/o fibras.

Sin embargo, el método preferido para el aislamiento de las células de la mezcla de lisis es la centrifugación.

10 Por supuesto es además posible aislar las células del pellet disuelto formado después de la etapa de centrifugación mediante métodos inmunológicos que implican anticuerpos, en particular anticuerpos inmovilizados en perlas, preferiblemente perlas magnéticas, que están dirigidas a epítomos presentes en las células a ser aisladas. Debido a que el uso de perlas de anticuerpos para el aislamiento de células da como resultado, en algunos casos, una tasa de recuperación reducida, tales métodos pueden ser empleados, preferiblemente, principalmente para un aislamiento cualitativo.

15 Para facilitar la disolución de la muestra, dicha muestra puede ser, por ejemplo, homogeneizada utilizando un Stomacher previamente a su incubación con la solución de extracción. La disolución se soporta y/o acelera adicionalmente cuando la mezcla de la muestra/solución de extracción se agita durante la incubación.

La etapa de incubación puede – dependiendo de la matriz de muestra – repetirse una o varias veces, por ejemplo dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o diez veces. Entre estas etapas de incubación las células y la matriz de la muestra remanente pueden ser separadas del sobrenadante mediante por ejemplo centrifugación.

20 Las células aisladas con el método de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizadas para determinar cuantitativa y cualitativamente las células en la muestra. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el conteo de células, mediante métodos de PCR, en particular mediante PCR en tiempo real, utilizando lectinas o mediante métodos que implican anticuerpos, proteínas de unión viral, aptámeros o péptidos antimicrobianos (AMP) dirigidos a estructuras superficiales de dichas células (por ejemplo ELISA o RIA específica a células).

25 Después de la etapa de aislamiento las células se lavan preferiblemente con agua, una solución tampón y/o soluciones que comprenden detergente. Sin embargo, es por supuesto posible añadir al tampón de lavado una o más sustancias adicionales. La etapa de lavado puede repetirse diversas veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 10 veces) o solamente una vez. En el transcurso de la etapa de lavado las células son resuspendidas habitualmente en el tampón y a continuación se filtran o se centrifugan. Si se encuentran presentes partículas insolubles en la muestra disuelta (por ejemplo, partículas de fosfato de calcio de queso) dichas partículas pueden ser eliminadas bien  
30 mediante centrifugación a una velocidad de rotación inferior o dejando las partículas establecerse con el tiempo (las células permanecerán en ambos casos en el sobrenadante).

Las células pueden además lavarse con soluciones que comprenden detergente. Esto permitirá eliminar más aún las grasas remanentes potencialmente contenidas en la suspensión de células. Detergentes preferidos a ser utilizados en esta etapa del método son aquellos detergentes utilizados de manera habitual para la eliminación de grasas.

35 Una ventaja del método de acuerdo a la presente invención es que la solución de extracción únicamente comprende líquidos iónicos en concentraciones moderadas pero no detergentes. Como consecuencia, en contraste con métodos conocidos donde el tampón de extracción comprende habitualmente detergentes y cantidades elevadas de caotrópicos, es posible omitir o reducir de forma significativa las etapas de lavado si la matriz de la muestra lo permite, es decir, si no comprende por ejemplo remanentes de grasas que necesiten ser eliminados con tampones  
40 de lavado que comprendan detergente. Esta característica del presente método permite reducir el tiempo de extracción y directamente o al menos casi directamente, después de únicamente una o dos etapas de lavado, analizar las células con métodos (como ELISA) que de otro modo se verían alterados por la presencia de sustancias caotrópicas o detergentes.

45 Debido al hecho de que preferiblemente no hay presente ningún detergente en la solución de extracción, es además posible aislar directamente las células que utilizan anticuerpos preferiblemente unidos a un soporte sólido (por ejemplo, perlas, en particular perlas magnéticas). La unión de las células a anticuerpos permite aislar específicamente un determinado tipo de células. Eso resulta especialmente de interés cuando la muestra comprende más de una especie de células.

Se determina la cantidad de células en la muestra de acuerdo a un modo de realización de la presente invención.

50 La cantidad de células en la muestra puede ser determinada mediante cualquier método conocido en el arte, en particular mediante métodos microbiológicos (por ejemplo, diluciones en serie), conteo celular, análisis FACS, PCR en tiempo real, etc.

Se aísla el ADN o ARN de las células de acuerdo con otro modo de realización preferido de la presente invención.

5 Dependiendo de las células pueden emplearse diversos métodos para extraer el ADN (por ejemplo el ADN genómico, plásmidos) o el ARN (por ejemplo ARNm). Todos estos métodos son conocidos en el arte y los protocolos individuales dependen principalmente de la célula a ser lisada. El aislamiento puede además requerir la adición de enzimas como la lisozima.

Para aumentar la lisis de las muestras, en particular de las muestras con elevada viscosidad (por ejemplo, queso), dicha muestra es procesada mediante un stomacher o mezclador previamente a su incubación con la solución de extracción.

10 Para determinar o para monitorizar la eficiencia del procedimiento de aislamiento, a la muestra se puede añadir una cantidad definida de células de control. Las células de control son habitualmente células bacterianas, preferiblemente células bacterianas Gram-positivas o Gram-negativas, células fúngicas, células archaeas, células de algas o células vegetales. Preferiblemente, son similares a las células que se presume están presentes en la muestra, pero preferiblemente no idénticas a las células que se presume están presentes en la muestra. La cantidad de las células de control añadidas recuperadas permite determinar la eficacia del método de la presente invención y  
15 puede además indicar la cantidad de células a ser aisladas y determinadas que están presentes en la muestra inicial.

Es además posible incubar previamente la muestra con un compuesto que muestre propiedades protectoras ante el estrés osmótico para las células.

20 Para incrementar la resistencia de las células contra el estrés osmótico, la muestra que comprende (potencialmente) las células a ser aisladas pueden ser incubadas con al menos un compuesto que es capaz de inducir respuestas protectoras osmóticas en dichas células.

Compuestos que muestran tales características y que se utilizan preferiblemente en el método de la presente invención son la glicina betaína y/o la beta-lisina.

25 De acuerdo con un modo de realización de la presente invención la muestra se incuba adicionalmente con al menos una enzima de degradación de biopolímeros.

Algunas muestras a partir de las cuales las células se aíslan comprenden estructuras de biopolímeros que no pueden ser lisadas o que sólo pueden ser lisadas de forma ineficaz, mediante la adición de la solución de extracción. Si la muestra, en particular la muestra de alimento, comprende por ejemplo colágeno y/o almidón en una cantidad de, por ejemplo, por encima del 10%, dicha muestra puede ser tratada con sustancias capaces de degradar al  
30 menos parcialmente el contenido de colágeno y almidón previamente a su incubación con el sistema de lisis de la matriz de la presente invención.

Por lo tanto, la muestra se incuba adicionalmente preferiblemente con al menos una enzima de degradación de biopolímeros. Las muestras que se incuban preferiblemente con enzimas de degradación de biopolímeros son por ejemplo carne, pescado, etc. El helado, los huevos, la sangre, la leche, los productos lácteos, etc. no necesitan  
35 habitualmente la adición de una enzima de degradación de biopolímeros. Resultó sorprendentemente que el uso de enzimas solas no permite el aislamiento de células.

40 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "biopolímero" hace referencia a proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos como celulosa, almidón y glucógeno, etc. Por lo tanto, una "enzima de degradación de biopolímeros" es una enzima que es capaz de degradar un biopolímero (por ejemplo almidón, celulosa), que puede ser insoluble en un tampón acuoso, a sustancias de bajo peso molecular o incluso a monómeros.

Debido a que la enzima de degradación de biopolímeros puede estar activa bajo determinadas condiciones de pH y de temperatura (el uso de tampones específicos puede también tener una función), resulta ventajoso realizar la incubación con dichas enzimas bajo condiciones opcionales. Estas condiciones dependen de la enzima utilizada y son conocidas en el arte. Además el tiempo de incubación depende de factores extrínsecos como el pH y la  
45 temperatura. Por lo tanto, el tiempo de incubación puede variar de 10s a 6h, preferiblemente de 30s a 2h.

La enzima de degradación de biopolímeros se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en proteasas, celulasas y amilasa. Ejemplos de estas enzimas son Savinase 24 GTT (Subtilina), Carezyme 900 T, Stainzyme GT. Las enzimas de degradación de almidón son por ejemplo ciclodextrina-glucanotransferasa, alfa-amilasa, beta-amilasa, glucoamilasa, pululanasa e isoamilasa, en particular  $\alpha$ -amilasa.

En métodos conocidos que utilizan tampones que comprenden agentes caotrópicos y detergentes las enzimas de degradación de biopolímeros no pueden ser añadidas durante la etapa de lisis de la matriz, ya que los caotrópicos y detergentes pueden influir negativamente en la actividad enzimática de manera que los biopolímeros no se degraden de manera eficaz en fragmentos o monómeros.

- 5 En contraste con esto, en el método de acuerdo con la presente invención, la enzima de degradación de biopolímeros puede ser incubada con la muestra previamente a la etapa b) y/o durante la etapa b) y/o después de la etapa c) (etapa b), donde la etapa de lisis es la etapa en la que la muestra es incubada con la solución de extracción, y donde la etapa c) es la etapa de aislamiento.

10 El método de acuerdo con la presente invención puede ser realizado en un periodo de unas pocas horas, habitualmente de 1 a 6 horas.

Los líquidos iónicos o sales líquidas tal como se utilizan en la presente invención son especies iónicas que consisten en un catión orgánico y un anión generalmente inorgánico. No contienen ninguna molécula neutral y habitualmente presentan puntos de fusión por debajo de 373 K.

- 15 El área de líquidos iónicos se está investigando actualmente de manera intensiva ya que las aplicaciones potenciales son múltiples. Artículos de análisis sobre líquidos iónicos son, por ejemplo, R. Sheldon "Catalytic reactions in ionic liquids", Chem. Commun., 2001, 2399-2407; M.J. Earle, K.R. Seddon "Ionic liquids. Green solvent for the future", Pure Appl. Chem., 72 (2000), 1391-1398; P. Wasserscheid, W. Keim "Ionische Flüssigkeiten - neue Losungen für die Übergangsmetallkatalyse" [Ionic Liquids - Novel Solutions for Transition-Metal Catalysis], Angew. Chem., 112 (2000), 3926-3945; T. Welton "Room temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis", Chem. Rev., 92 (1999), 2071-2083 or R. Hagiwara, Ya. Ito "Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions", J. Fluorine Chem., 105 (2000), 221-227.

En general, todos los líquidos iónicos de la fórmula general  $K^+A^-$  conocidos por los expertos en el arte, en particular aquellos que son miscibles con agua, son adecuados en el método de acuerdo con la invención.

- 25 El anión  $A^-$  del líquido iónico se selecciona preferiblemente del grupo que comprende halogenuros, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, cianamida, tiocianato o imidas de la fórmula general  $[N(R_f)_2]^-$  o de la fórmula general  $[N(XR_f)_2]^-$ , donde  $R_f$  indica un alquilo parcial o totalmente sustituido con flúor que tiene de 1 a 8 átomos de C, y X indica  $SO_2$  o CO. Los aniones halogenuros aquí pueden seleccionarse de aniones cloruro, bromuro y yoduro, preferiblemente de aniones cloruro y bromuro. Los aniones  $A^-$  del líquido iónico son preferiblemente aniones halogenuros, en particular aniones bromuro o yoduro, o tetrafluoroborato o cianamida o tiocianato.

- 30 No hay restricciones per se con respecto a la elección del catión  $K^+$  del líquido iónico. Sin embargo, se da preferencia a cationes orgánicos, de manera particularmente preferente a cationes de amonio, fosfonio, uronio, tiouronio, guanidinio o cationes heterocíclicos.

Los cationes de amonio pueden ser descritos, por ejemplo, por la fórmula (1)



- 35 donde

R en cada caso, independientemente uno del otro, indica

H, donde todos los sustituyentes R no pueden ser simultáneamente H,

OR', NR'<sub>2</sub>, con la condición de que un máximo de un sustituyente R en la fórmula (1) es OR', NR'<sub>2</sub>,

alquilo de cadena recta o ramificado que tiene 1-20 átomos de C,

- 40 alqueno de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

alquino de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces triples,

cicloalquilo saturado, parcial o totalmente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que pueden ser sustituidos por grupos alquilos que tienen 1-6 átomos de C, donde uno o más R pueden ser parcial o totalmente sustituidos por halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente por -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>, y donde uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R que no se encuentran en la posición  $\alpha$  pueden ser reemplazados por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -

- 45



SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'<sub>2</sub>-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- donde R' puede ser = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no-, parcialmente o perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X puede ser = halógeno.

Los cationes de fosfonio pueden ser descritos, por ejemplo, por la fórmula (2)



donde

R<sup>2</sup> en cada caso, independientemente uno del otro, indica

H, OR' o NR'<sub>2</sub>

alquilo de cadena recta o ramificado que tiene 1-20 átomos de C,

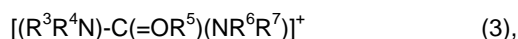
10 alqueno de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

alquino de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces triples,

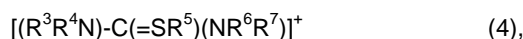
15 cicloalquilo saturado, parcial o totalmente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que pueden ser sustituidos por grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C, donde uno o más R<sup>2</sup> pueden ser parcial o totalmente sustituidos por halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente por -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>-, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>, y donde uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R<sup>2</sup> que no se encuentran en la posición α pueden ser reemplazados por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'<sub>2</sub>-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- donde R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no-, parcialmente o perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

20 Sin embargo, los cationes de las fórmulas (1) y (2) en las que todos los cuatro o tres sustituyentes R y R<sup>2</sup> están completamente sustituidos por halógenos están excluidos, por ejemplo el catión tris(trifluorometil)metilamonio, el catión tetra(trifluorometil)amonio o el catión tetra(nonafluorobutil)amonio.

Los cationes de uronio pueden ser descritos, por ejemplo, por la fórmula (3)



25 y los cationes de tiouronio por la fórmula (4),



donde

R<sup>3</sup> a R<sup>7</sup> cada uno, independientemente uno del otro, indica

hidrógeno, donde el hidrógeno se excluye de R<sup>5</sup>,

30 alquilo de cadena recta o ramificado que tiene 1-20 átomos de C,

alqueno de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

alquino de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces triples,

35 cicloalquilo saturado, parcial o totalmente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que pueden ser sustituidos por grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C, donde uno o más de los sustituyentes R<sup>3</sup> a R<sup>7</sup> pueden ser parcial o totalmente sustituidos por halógenos, en particular -F y/o Cl-, o parcialmente por -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>-, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>, y donde uno o más átomos de carbono no adyacentes en R<sup>3</sup> a R<sup>7</sup> que no se encuentran en la posición α pueden ser reemplazados por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'<sub>2</sub>-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- donde R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no-, parcialmente o perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

40

Los cationes de guanidinio pueden ser descritos por la fórmula (5)



donde

R<sup>8</sup> a R<sup>13</sup> cada uno, independientemente uno del otro, indica hidrógeno, -CN, NR'<sub>2</sub>, -OR'

5 alquilo de cadena recta o ramificado que tiene 1-20 átomos de C,

alqueno de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

alquino de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces triples,

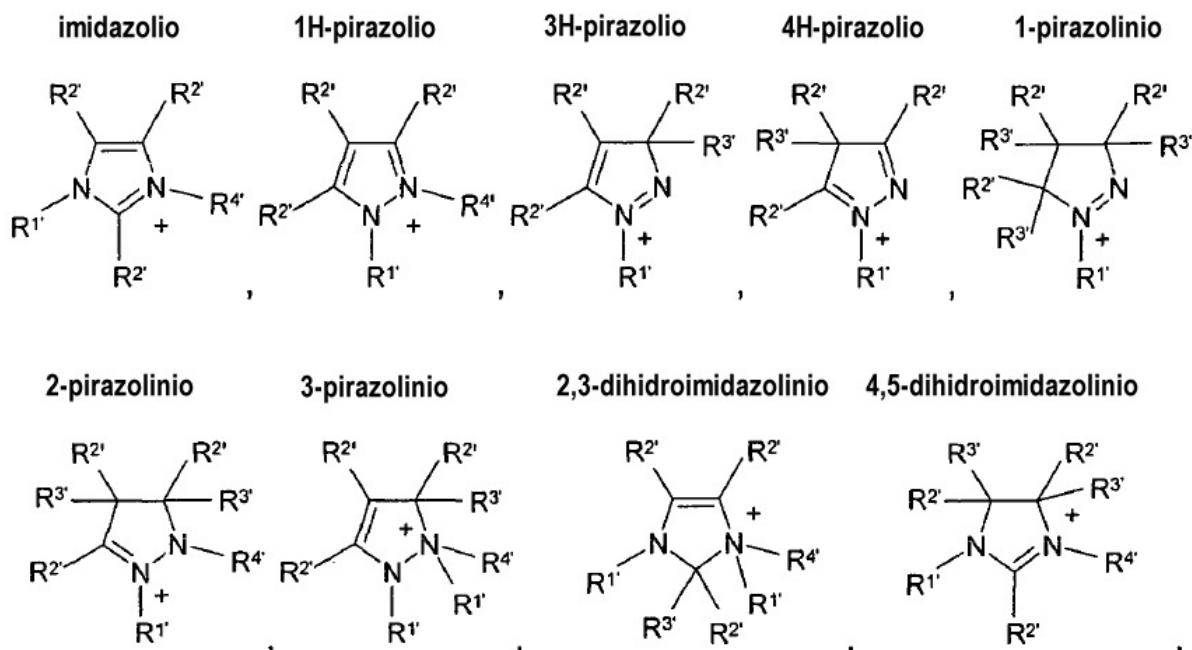
10 cicloalquilo saturado, parcial o totalmente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que pueden ser sustituidos por grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C, donde uno o más de los sustituyentes R<sup>8</sup> a R<sup>13</sup> pueden ser parcial o totalmente sustituidos por halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente por -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>, y donde uno o más átomos de carbono no adyacentes en R<sup>8</sup> a R<sup>13</sup> que no se encuentran en la posición α pueden ser reemplazados por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO<sub>2</sub>NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- donde R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no-, parcialmente o perfluorado, 15 cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

Además, es posible utilizar cationes de la fórmula general (6)

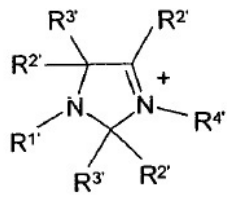


donde

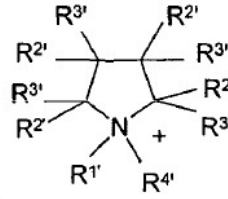
[HetN]<sup>+</sup> indica un catión heterocíclico seleccionado del grupo



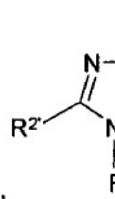
2,5-dihidroimidazolinio



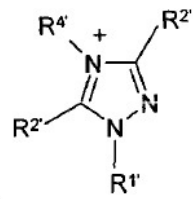
pirrolidinio



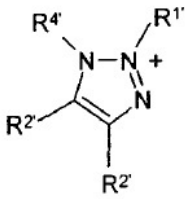
1,2,4-triazolio



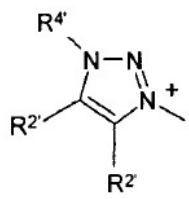
1,2,4-triazolio



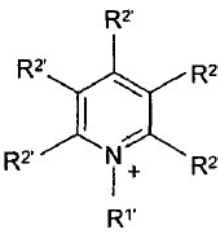
1,2,3-triazolio



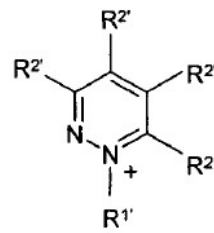
1,2,3-triazolio



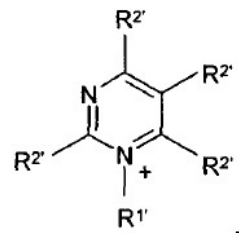
piridinio



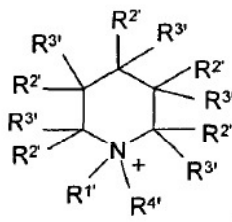
piridazinio



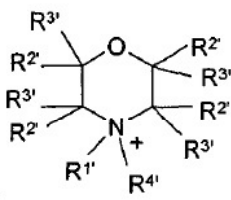
pirimidinio



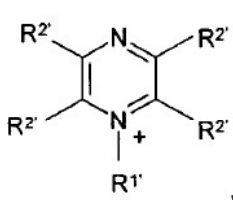
piperidinio



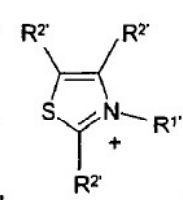
morfolinio



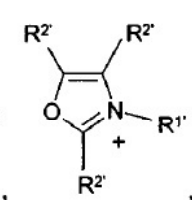
pirazinio



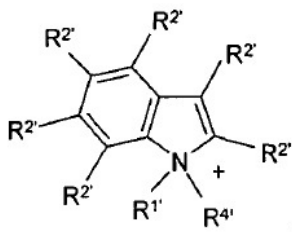
tiazolio



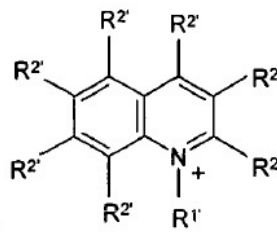
oxazolio



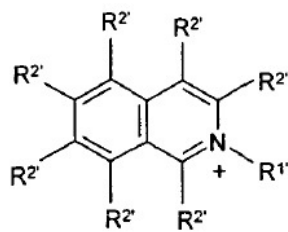
indolio



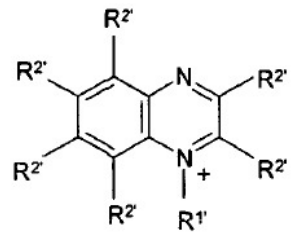
quinolinio



isoquinolinio

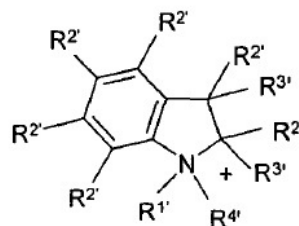


quinoxalinio



o

indolinio



donde los sustituyentes

$R^{1'}$ , a  $R^{4'}$ , cada uno, independientemente el uno del otro, indican hidrógeno, -CN, -OR', -NR'<sub>2</sub>, -P(O)R'<sub>2</sub>, -P(O)(OR')<sub>2</sub>, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, -C(O)R', -C(O)OR',

5 alquilo de cadena recta o ramificado que tiene 1-20 átomos de C,

alqueno de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

alquino de cadena recta o ramificado que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces triples,

cicloalquilo saturado, parcial o totalmente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que pueden ser sustituidos por grupos alquilos que tienen 1-6 átomos de C,

10 heteroarilo-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o arilo-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> saturado, parcial o totalmente insaturado,

donde los sustituyentes  $R^{1'}$ ,  $R^{2'}$ ,  $R^{3'}$  y/o  $R^{4'}$  juntos pueden formar además un sistema de anillo,

donde uno o más de los sustituyentes  $R^{1'}$  a  $R^{4'}$  pueden ser parcial o totalmente sustituidos por halógenos, en particular -F y/o Cl-, o -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>, pero donde  $R^{1'}$  y  $R^{4'}$  no pueden ser totalmente sustituidos simultáneamente por halógenos, y donde, en los sustituyentes  $R^{1'}$  a  $R^{4'}$ , uno o dos átomos de carbono no adyacentes que no están enlazados a el heteroátomo pueden ser reemplazados por átomos y/o grupos de átomos seleccionados de -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO<sub>2</sub>NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- donde R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no-, parcialmente o perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

15

20 Para los propósitos de la presente invención, sustituyentes totalmente insaturados también se considera que significan sustituyentes aromáticos.

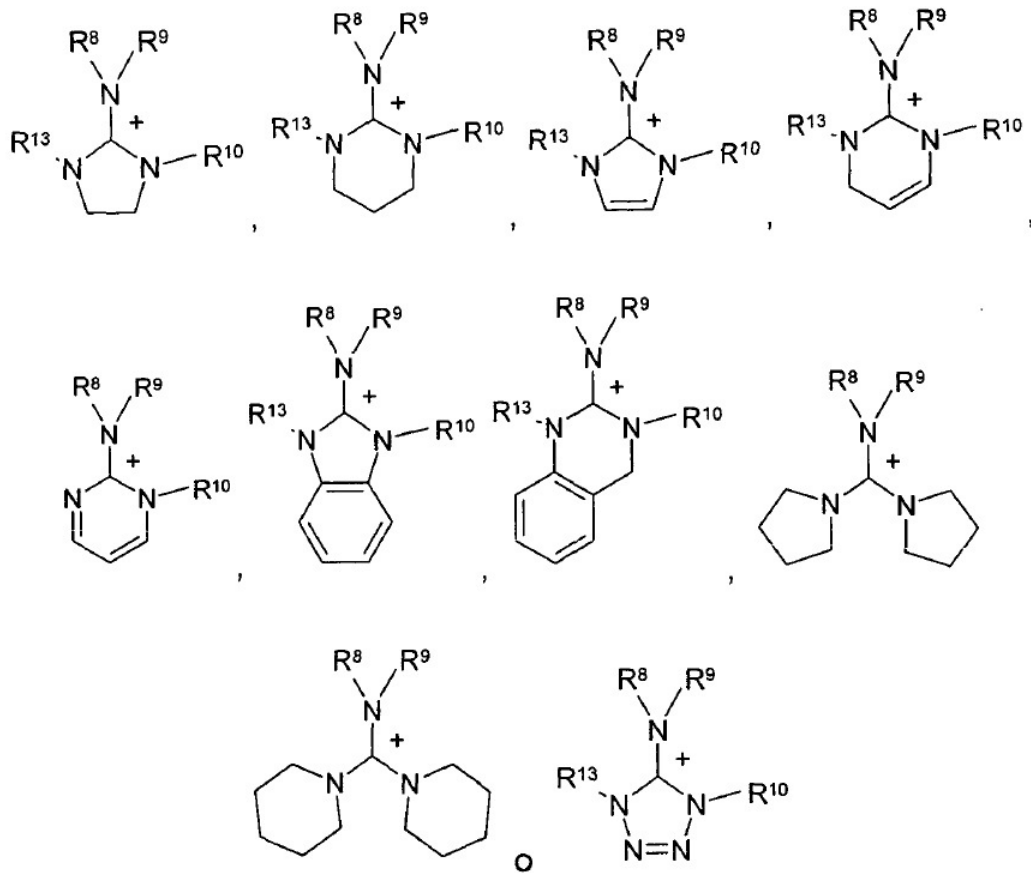
De acuerdo con la invención, sustituyentes adecuados R y R<sup>2</sup> a R<sup>13</sup> de los compuestos de las fórmulas (1) a (5), además de hidrógeno, son preferiblemente: grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub>, en particular C<sub>1</sub> a C<sub>14</sub>, y grupos cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> saturados o insaturados, es decir aromáticos, que pueden ser sustituidos por grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, en particular fenilo.

25 Los sustituyentes R y R<sup>2</sup> en los compuestos de la fórmula (1) o (2) pueden ser idénticos o diferentes aquí. Los sustituyentes R y R<sup>2</sup> son preferiblemente diferentes.

Los sustituyentes R y R<sup>2</sup> son de manera particularmente preferible metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, decilo o tetradecilo.

30 Hasta cuatro sustituyentes del catión guanidinio [C(NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)(NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)(NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>)]<sup>+</sup> pueden ser también enlazados en parejas de tal manera que se formen cationes mono-, bi- o policíclicos.

Sin una generalidad restrictiva, ejemplos de tales cationes de guanidinio son:

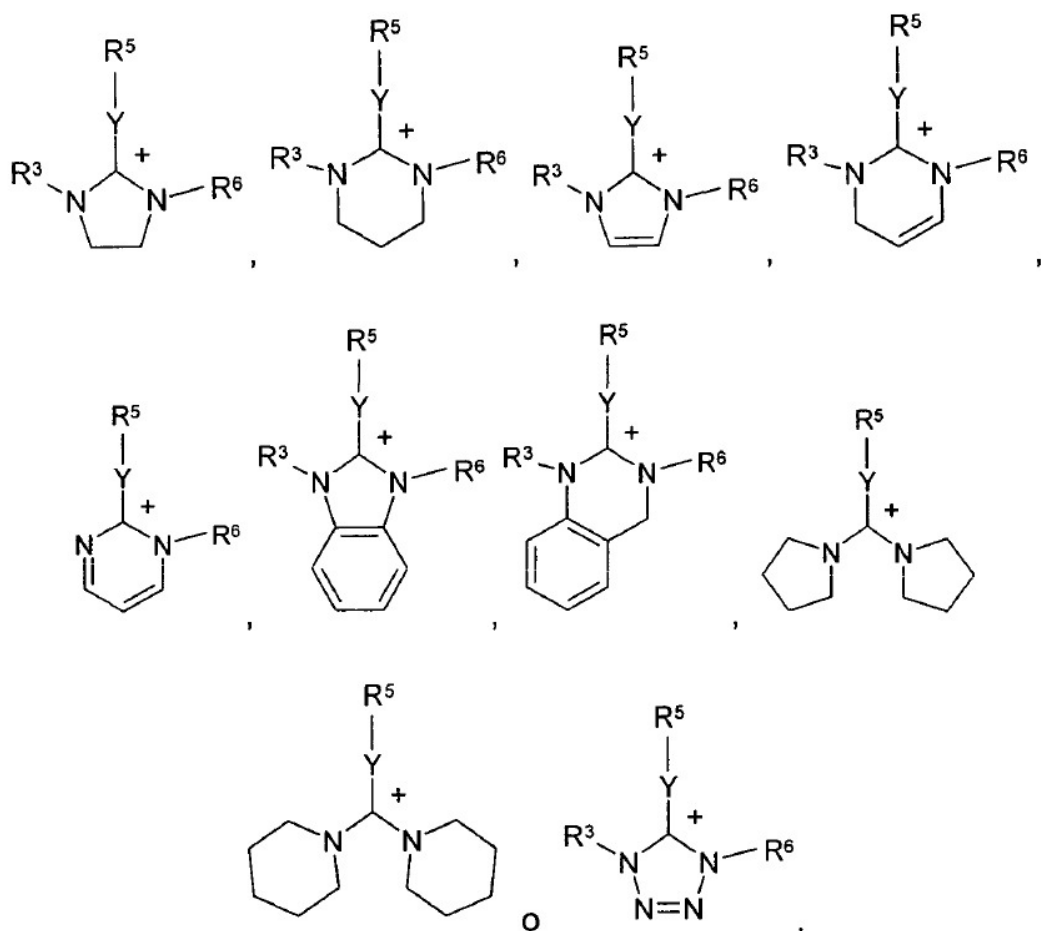


donde los sustituyentes R<sup>8</sup> a R<sup>10</sup> y R<sup>13</sup> pueden tener un significado o un significado particularmente preferido indicado anteriormente.

5 Si se desea, los anillos carbocíclicos o heterocíclicos de los cationes de guanidinio indicados anteriormente pueden además ser sustituidos por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, OH, alcoxi C<sub>1</sub>- C<sub>6</sub>, SCF<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, COOH, SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>X' o SO<sub>3</sub>H, donde X y R' tienen un significado indicado anteriormente, fenilo sustituido o no sustituido o un heterociclo sustituido o no sustituido.

10 Hasta cuatro sustituyentes del catión uronio [(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>N)-C(=OR<sup>5</sup>)(NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)]<sup>+</sup> o del catión tiouronio [(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>N)-C(=SR<sup>5</sup>)(NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)]<sup>+</sup> pueden además ser enlazados en parejas de tal manera que se formen cationes mono-, bi- o policíclicos.

Sin generalidad restrictiva, se indican ejemplos de tales cationes a continuación, donde Y = O o S:



donde los sustituyentes  $R^3$ ,  $R^5$  y  $R^6$  pueden tener un significado o un significado particularmente preferido indicado anteriormente.

5 Si se desea, los anillos carbocíclicos o heterocíclicos de los cationes indicados anteriormente pueden también ser sustituidos por alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , alqueno  $C_1$  a  $C_6$ ,  $NO_2$ , F, Cl, Br, I, OH, alcoxi  $C_1$  a  $C_6$ ,  $SCF_3$ ,  $SO_2CF_3$ , COOH,  $SO_2NR'_2$ ,  $SO_2X$  o  $SO_3H$  o fenilo sustituido o no sustituido o un heterociclo sustituido o no sustituido, donde X y Y' tienen un significado indicado anteriormente.

10 Los sustituyentes  $R^3$  a  $R^{13}$  son cada uno, independientemente uno del otro, preferiblemente un grupo alquilo de cadena recta o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de C. Los sustituyentes  $R^3$  y  $R^4$ ,  $R^6$  y  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^9$ ,  $R^{10}$  y  $R^{11}$  y  $R^{12}$  y  $R^{13}$  en compuestos de las fórmulas (3) a (5) pueden ser idénticos o diferentes.  $R^3$  a  $R^{13}$  son de manera particularmente preferible cada uno, independientemente uno del otro, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, fenilo o ciclohexilo, de manera muy particularmente preferible metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o n-butilo.

15 De acuerdo con la invención, sustituyentes adecuados  $R^{11}$  a  $R^{14}$  de los compuestos de la fórmula (6), además del hidrógeno, son preferiblemente: grupos alquilo  $C_1$  a  $C_{20}$ , en particular grupos alquilo  $C_1$  a  $C_{12}$ , y grupos cicloalquilo  $C_3$  a  $C_7$  saturados o insaturados, es decir aromáticos, que pueden ser sustituidos por grupos alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , en particular fenilo.

20 Los sustituyentes  $R^{11}$  y  $R^{14}$  son cada uno, independientemente el uno del otro, de manera particularmente preferible metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, decilo, ciclohexilo, fenilo o bencilo. Son de manera muy particularmente preferible metilo, etilo, n-butilo o hexilo. En compuestos de pirrolidinio, piperidinio o indolinio, los dos sustituyentes  $R^{11}$  y  $R^{14}$  son preferiblemente diferentes.

25 El sustituyente  $R^{12}$  o  $R^{13}$  es en cada caso, independientemente uno del otro, en particular hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, ciclohexilo, fenilo o bencilo.  $R^{12}$  es de manera particularmente preferible hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo o sec-butilo.  $R^{12}$  y  $R^{13}$  son de manera muy particularmente preferible hidrógeno.

El grupo alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  es, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo o terc-butilo, adicionalmente también pentilo, 1-, 2- o 3-metilbutilo, 1,1-, 1,2- o 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo o dodecilo. De manera opcional difluorometilo, trifluorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo o nonafluorobutilo.

- 5 Un alqueno de cadena recta o ramificado que tiene 2 a 20 átomos de C, en el que una pluralidad de enlaces dobles pueden estar también presentes, es, por ejemplo, alilo, 2- o 3-butenilo, isobutenilo, sec-butenilo, adicionalmente 4-pentenilo, isopentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo,  $-C_9H_{17}$ ,  $-C_{10}H_{19}$  a  $-C_{20}H_{39}$ ; preferiblemente alilo, 2- o 3-butenilo, isobutenilo, sec-butenilo, de manera adicionalmente preferible 4-pentenilo, isopentenilo o hexenilo.

- 10 Un alquino de cadena recta o ramificado que tiene 2 a 20 átomos de C, en el que una pluralidad de enlaces triples pueden estar también presentes, es, por ejemplo, etinilo, 1- o 2-propinilo, 2- o 3-butinilo, adicionalmente 4-pentinilo, 3-pentinilo, hexinilo, heptinilo, octinilo,  $-C_9H_{15}$ ,  $-C_{10}H_{17}$  a  $-C_{20}H_{37}$ , preferiblemente etinilo, 1- o 2-propinilo, 2- o 3-butinilo, 4-pentinilo, 3-pentinilo o hexinilo. Aril-alquilo  $C_1$ - $C_6$  indica, por ejemplo, bencilo, feniletilo, fenilpropilo, fenilbutilo, fenilpentilo o fenilhexilo, donde tanto el anillo de fenilo y también la cadena de alqueno puede ser parcial o totalmente sustituida, tal como se describe anteriormente, por halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente por -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>.

- 20 Grupos cicloalquilo parcial o totalmente insaturados o saturados no sustituidos que tienen 3-7 átomos de C son, por lo tanto, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctenilo, cicloocta-1,3-dienilo, ciclohexenilo, ciclohexa-1,3-dienilo, ciclohexa-1,4-dienilo, fenilo, cicloheptenilo, ciclo-hepta-1,3-dienilo, ciclohepta-1,4-dienilo o ciclohepta-1,5-dienilo, cada uno de los cuales puede ser sustituido por grupos alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , donde el grupo cicloalquilo o el grupo cicloalquilo sustituido por grupos alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , puede a su vez ser sustituido por átomos de halógeno, tales como F, Cl, Br o I, en particular F o Cl, o por -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>.

- 25 En los sustituyentes  $R$ ,  $R^2$  a  $R^{13}$  o  $R^1$  a  $R^4$ , uno o dos átomos de carbono no adyacentes que no están enlazados en la posición  $\alpha$  al heteroátomo pueden ser también reemplazados por átomos y/o grupos de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO<sub>2</sub>NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- donde R' = alquilo  $C_1$  a  $C_6$  no-, parcialmente o perfluorado, cicloalquilo  $C_3$  a  $C_7$ , fenilo sustituido o no sustituido.

Sin una generalidad restrictiva, ejemplos de sustituyentes  $R$ ,  $R^2$  a  $R^{13}$  y  $R^1$  a  $R^4$  modificados de este modo son:

- 30 -OCH<sub>3</sub>, -OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>SC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>SCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -S(O)CH<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -SO<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -SO<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -O-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-O-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -CF<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>, -C(CF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CF<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>F<sub>4</sub>N(C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>)<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, -CHF<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>,

-C<sub>2</sub>F<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, -C<sub>3</sub>FH<sub>6</sub>, -CH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, -C(CFH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>C(O)OH, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -C(O)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> o P(O)(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>.

En R', cicloalquilo  $C_3$  a  $C_7$  es, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

- 35 En R', fenilo sustituido indica fenilo que es sustituido por alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , alqueno  $C_1$  a  $C_6$ , NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, OH, alcoxi  $C_1$ - $C_6$ , SCF<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, COOH, SO<sub>2</sub>X', SO<sub>2</sub>NR''<sub>2</sub> o SO<sub>3</sub>H, donde X' indica F, Cl o Br y R'' indica un alquilo  $C_1$ - $C_6$  no-, parcialmente o perfluorado o alquilo  $C_1$  a  $C_6$  o cicloalquilo  $C_3$  a  $C_7$  tal como se define para R', por ejemplo o-, m- o p-metilfenilo, o-, m- o p-etilfenilo, o-, m- o p-propilfenilo, o-, m- o p-isopropilfenilo, o-, m- o p-terc-butilfenilo, o-, m- o p-nitrofenilo, o-, m- o p-hidroxifenilo, o-, m- o p-metoxifenilo, o-, m- o p-etoxifenilo, o-, m-, p-(trifluorometil)-fenilo, o-, m-, p-(trifluorometoxi)fenilo, o-, m-, p-(trifluorometilsulfonil)fenilo, o-, m- o p-fluorofenilo, o-, m- o p-clorofenilo, o-, m- o p-bromofenilo, o-, m- o p-yodofenilo, de manera adicionalmente preferible 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dimetilfenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dihidroxi-fenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-difluorofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-diclorofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dibromofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dimetoxifenilo, 5-fluoro-2-metilfenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo o 2,4,5-trimetilfenilo.

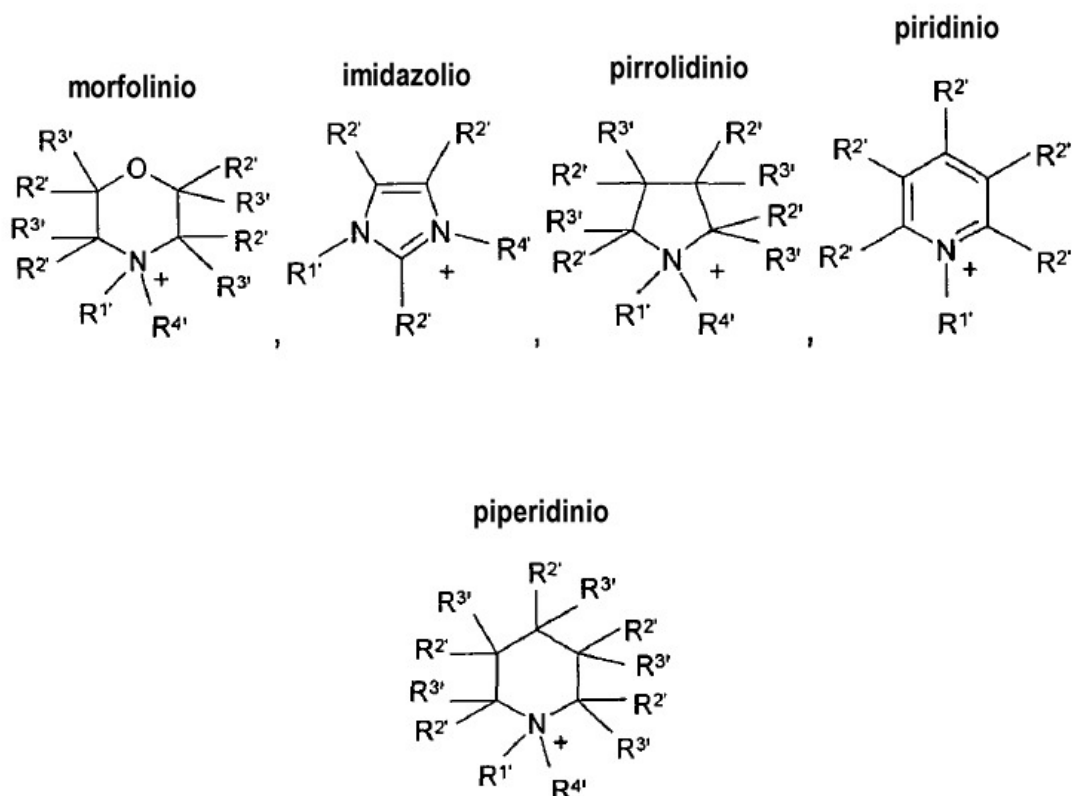
- 45 En R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup>, heteroarilo se considera que significa un radical saturado o insaturado heterocíclico mono- o bicíclico, con 5 a 13 elementos de anillo, en el cual 1,2 o 3 átomos de N y/o 1 o 2 de S u O pueden estar presentes y el radical heterocíclico puede ser mono- o poli-sustituido por alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , alqueno  $C_1$  a  $C_6$ , NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, OH, alcoxi  $C_1$  a  $C_6$ , SCF<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, COOH, SO<sub>2</sub>X', SO<sub>2</sub>NR''<sub>2</sub> o SO<sub>3</sub>H, donde X' y R'' tienen un significado indicado anteriormente.

- 50 El radical heterocíclico es preferiblemente 2- o 3-furilo, 2- o 3-tienilo, 1-, 2- o 3-pirrolilo, 1-, 2-,4- o 5-imidazolilo, 3-, 4- o 5-pirazolilo, 2-, 4- o 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 2-, 4- o 5-tiazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo, 2-, 3- o 4-piridilo, 2-, 4-, 5- o 6-pirimidinilo, de manera adicionalmente preferible 1,2,3-triazol-1-, -4- o -5-ilo, 1,2,4-triazol-1-, -4- o -5-ilo, 1- o 5-tetrazolilo, 1,2,3-oxadiazol-4- o -5-ilo, 1,2,4-oxadiazol-3- o -5-ilo, 1,3,4-tiadiazol-2- o -5-ilo, 1,2,4-tiadiazol-3- o -5-ilo, 1,2,3-tiadiazol-4- o -5-ilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-2H-tiopirano, 2-, 3- o 4-4H-tiopirano, 3- o 4-piridazinilo, pirazinilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzofurilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzo-tienilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-1 H-indolilo, 1-, 2-,4- o 5-

5 bencimidazolilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzopirazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoxazolilo, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-bencisoxazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzotiazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-bencisotiazolilo, 4-, 5-, 6- o 7-benz-2,1,3-oxadiazolilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-quinolinilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-isoquinolinilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 9-carbazolilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-acridinilo, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-cinnolinilo, 2-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-quinazolinilo o 1-, 2- o 3-pirrolidinilo, sustituido o no sustituido.

Heteroarilo-alquilo C<sub>1</sub> –C<sub>6</sub> es, de manera análoga a arilo-alquilo C<sub>1</sub> –C<sub>6</sub>, se considera que significa, por ejemplo, piridinilmetilo, piridiniletilo, piridinilpropilo, piridinilbutilo, piridinilpentilo, piridinilhexilo, donde los radicales heterocíclicos descritos anteriormente puede adicionalmente estar enlazados a la cadena de alquileo de esta manera.

10 HetN<sup>+</sup> es preferiblemente



15 donde los sustituyentes R<sup>1'</sup> a R<sup>4'</sup> cada uno, independientemente uno del otro, tienen un significado descrito anteriormente. Los cationes de morfolinio e imidazolio son particularmente preferidos en la presente invención, donde R<sup>1'</sup> a R<sup>4'</sup> en dichos cationes indican, en particular, en cada caso independientemente uno del otro, hidrógeno, alquilo de cadena recta o ramificado que tiene 1-20 átomos de C, donde uno o más sustituyentes R<sup>1'</sup> a R<sup>4'</sup> pueden ser parcialmente sustituidos por –OH o –OR', donde R<sup>1'</sup> = alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no-, parcialmente o perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido.

Los cationes del líquido iónico de acuerdo con la invención son preferiblemente cationes de amonio, fosfonio, imidazolio o morfolinio, de mayor preferencia son los cationes de imidazolio.

20 De manera muy particularmente preferida los sustituyentes R, R<sup>2'</sup>, R<sup>1'</sup> a R<sup>4'</sup> de los cationes de amonio, fosfonio, imidazolio o morfolinio preferidos se seleccionan de metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo, decilo, dodecilo, octadecilo, etoxietilo, metoxietilo, hidroxietilo o grupos hidroxipropilo.

25 Se prefiere que los cationes de imidazolio sean sustituidos por grupos alquilo, alqueno, arilo y/o aralquilo que pueden ellos mismos estar sustituidos por grupos funcionales tales como grupos que contienen nitrógeno, azufre y/o fósforo en donde son posibles diferentes estados de oxidación. Ejemplos preferidos de estos grupos funcionales de acuerdo con la invención son: grupos amina, carboxilo, carbonilo, aldehído, hidroxilo, sulfato, sulfonato y/o fosfato.



Uno o ambos de los átomos de N del anillo de imidazolio pueden ser sustituidos por sustituyentes idénticos o diferentes. Preferiblemente, ambos átomos de nitrógeno del anillo de imidazolio se sustituyen por sustituyentes idénticos o diferentes.

5 También es posible o se prefiere de acuerdo a la invención que las sales de imidazolio se sustituyan adicional o exclusivamente en uno o más de los átomos de carbono del anillo de imidazolio.

10 Como sustituyentes son preferidos los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tales como grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo y/o isobutilo. Sustituyentes que son también preferidos son grupos alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> tales como etileno, n-propileno, isopropileno, n-butileno y/o isobutileno, además también están comprendidos sustituyentes alquilo y alquenilo que tienen más de 4 átomos de C, en donde por ejemplo también sustituyentes alquilo o alquenilo C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> son también preferidos. Debido a la solubilidad del líquido iónico podría resultar favorable que estos grupos alquilo o alquenilo C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> tengan uno o más sustituyentes distintos tales como fosfato, sulfonato, amino y/o grupos fosfato en sus grupos alquilo y/o alquenilo.

15 Como sustituyentes arilo son preferidos de acuerdo con la invención grupos arilo mono- y/o bicíclicos, fenilo, bifenilo y/o naftaleno además de derivados de estos compuestos que llevan grupos hidroxilo, sulfonato, amino, aldehído, carbonilo y/o carboxilo. Ejemplos de sustituyentes arilo preferidos son fenol, bifenilo, bifenol, naftaleno, ácidos naftaleno carboxílicos, ácidos naftaleno sulfónicos, bifenilos, ácidos bifenilo carboxílicos, fenol, sulfonato de fenilo y/o ácidos fenol sulfónicos.

20 Se emplean de manera muy particularmente preferida tiocianatos de imidazolio, dicianamidas, tetrafluoroboratos, yoduros, cloruros, bromuros o hexafluorofosfatos en los métodos de acuerdo a la invención, donde bromuro de 1-decil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-decil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-decil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-decil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-decil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-dodecil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-dodecil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-dodecil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-dodecil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-dodecil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-hexil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-hexil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-hexil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-hexil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-octil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-octil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-octil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-octil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-butil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-butil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-butil-3-metilimidazolio, bromuro de 1-etil-3-metilimidazolio, yoduro de 1-etil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-etil-3-metilimidazolio, son especialmente preferidos en el método de acuerdo a la invención. De mayor preferencia son tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-butil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-butil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-etil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio, tiocianato de 1-hexil-3-metilimidazolio, dicianamida de 1-hexil-3-metilimidazolio.

40 Los líquidos iónicos utilizados de acuerdo con la invención son preferiblemente líquidos, es decir preferiblemente son líquidos que son iónicos a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Sin embargo, también pueden utilizarse líquidos iónicos que no son líquidos a temperatura ambiente pero que entonces deberían estar presentes en forma líquida o deberían ser solubles en la solución de extracción en la temperatura a la que el método de la presente invención se lleva a cabo.

Una solución de extracción para el aislamiento de células de una matriz compleja comprende al menos:

- MgCl<sub>2</sub> y/o un líquido iónico

45 habitualmente en agua o un tampón acuoso.

El MgCl<sub>2</sub> – si se encuentra presente – está habitualmente presente en la solución de extracción en concentraciones entre 0,5 y 3 M, preferiblemente entre 0,5 y 2 M, más preferiblemente entre 1 y 2 M.

El líquido iónico – si se encuentra presente – está habitualmente presente en concentraciones entre un 0,5 y un 20% en peso, preferiblemente entre un 1 y un 10% en peso, en base a la mezcla.

50 Preferiblemente la solución de extracción tiene un valor de pH mayor que 5 y menor que 9, preferiblemente mayor que 6 y menor que 8, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5.

El tampón de la presente invención se selecciona del grupo de tampón fosfato, tampón fosfato salino (PBS), tampón de 2-amino-2-hidroximetil-I, 3-propanodiol (TRIS), tampón de solución salina tamponada con TRIS (TBS) y TRIS/EDTA (TE).

Un kit para el aislamiento de células a partir de una matriz compleja comprende:

- 5 - una solución de extracción de acuerdo a la presente invención y
- al menos una enzima de degradación de biopolímeros (ver lo dicho anteriormente).

Preferiblemente, al menos una enzima de degradación de biopolímeros se selecciona del grupo que consiste en proteasas, celulasas y amilasas, preferiblemente amilasas  $\alpha$ .

- 10 El método y el kit de acuerdo con la presente invención ofrecen un sistema de lisis de la matriz efectivo y muy suave. La solución de extracción lisa de manera efectiva la matriz de la mayoría de las muestras complejas que son por ejemplo habituales en análisis de alimentos, mientras que las células diana permanecen no afectadas y por tanto viables. Debido a las condiciones de lisis de la matriz muy suaves, incluso las estructuras superficiales de las células permanecen habitualmente intactas y no afectadas. Las células muertas presentes en la muestra previamente a la lisis de la matriz pueden ser eliminadas previamente a la detección de células si fuera necesario.
- 15 Consecuentemente, el método y el kit de la presente invención ofrecen una manera simple y rápida de aislar células, preferiblemente células viables, a partir de muestras complejas y - combinadas con métodos de detección sensible como la PCR en tiempo real – permiten una detección rápida y sensible de patógenos en alimentos y otras muestras complejas.

- 20 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin embargo, sin estar restringida a los mismos.

La Figura 1 proporciona un diagrama de flujo a modo de ejemplo para las etapas del procedimiento que han de ser realizadas cuando se utiliza el método de acuerdo a la presente invención para detectar (cualitativa y/o cuantitativamente) células patógenas en muestras complejas como muestras de alimentos.

- 25 La Figura 2 muestra los resultados de la cuantificación del recuento de colonias de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* investigados en el Ejemplo de aplicación 5.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos representan aplicaciones prácticas de la invención.

### 1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

- 30 Se utiliza *Listeria monocytogenes* EGDe (1/2a, número interno 2964) como un organismo modelo para las bacterias Gram-positivas y como un estándar de cuantificación del ADN para la PCR en tiempo real. Se utiliza *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (NCTC 12023) como organismo modelo para bacterias Gram-negativas y como un estándar de cuantificación del ADN para la PCR en tiempo real. Las bacterias se mantienen a -80 °C utilizando tecnología MicroBank™ (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Canadá), y son parte de la colección de cepas bacterianas en el Instituto de Higiene Láctea, Tecnología Láctea y Ciencia Alimentaria, Universidad de medicina veterinaria, Viena, Austria. Todas las cepas bacterianas se cultivan durante la noche en caldos de soja y triptona con 0,6% (p/v) de extracto de levadura (TSB-Y; Oxoid, Hampshire, Reino Unido) a las respectivas temperaturas de crecimiento óptimas (37 °C, *L. monocytogenes* y 42 °C, *S. Typhimurium*).

### 2. Investigación microscópica.

- 40 Se realiza tinción de viabilidad añadiendo 1  $\mu$ l del componente A y 1  $\mu$ l del componente B del Kit de Viabilidad Bacteriana Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes, Willow Creek, OR, USA) a 1 ml de una dilución apropiada de los cultivos bacterianos en solución de Ringer filtrada estéril (Merck, Darmstadt, Alemania). Las muestras se incuban durante 15 minutos (min) en la oscuridad, se filtran 400  $\mu$ l en filtros de policarbonato negro de 13-mm con tamaño de poro de 0,22  $\mu$ l (Millipore, Billerica, MA, USA), utilizando una jeringuilla de 5 ml y un portafiltro Swinnex (Millipore). Se colocan discos de filtro de 12,7 mm para someter a ensayo antibióticos (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Alemania), bajo los filtros de policarbonato en el portafiltro para soporte. Se analizan quince campos por filtro para cada una de las muestras. La siguiente fórmula se utiliza para calcular el número de células coloreadas por ml de muestra:  $N = \text{número medio de células por campo} \times (\text{área de filtración efectiva} / \text{área del campo}) \times (1 / \text{factor de dilución}) \times (1 / \text{volumen filtrado en ml})$ . Se utiliza un microscopio de fluorescencia Leitz Laborlux 8 (Leitz, Alemania, Wetzlar) con un filtro de 470 nm para el análisis microscópico con un aumento de 1000 veces.

### 3. Inoculación de alimentos

Para la contaminación artificial de alimentos se transfiere un mililitro del cultivo de toda la noche a un mililitro de medio fresco y se incuba a la respectiva temperatura de cultivo óptima durante tres horas. Posteriormente, se añaden a las muestras 100 µl de las diluciones apropiadas en PBS (tampón fosfato salino). El método de recuento de colonias y placas de triptona soja agar complementadas con 0,6% (p/v) de extracto de levadura (TSA-Y; Oxoid, Hampshire, Reino Unido) se utilizan para la cuantificación de todas las cepas bacterianas utilizadas. Las placas de agar se incuban a la temperatura óptima respectiva durante 24 horas. Todas las matrices de las muestras se adquieren en supermercados locales. Todas las muestras utilizadas para la contaminación artificial se someten a ensayo para asegurar que son negativas a *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, utilizando el protocolo de lisis de la matriz y los ensayos de PCR en tiempo real tal como se describe a continuación. Todos los experimentos de inoculación se realizan por duplicado.

#### 4 A. Lisis de la matriz con solución de extracción que comprende líquido iónico.

Se utiliza una solución acuosa al 5% (v/v) de tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim]SCN; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) para helados y huevos. Una solución acuosa al 7,5% (v/v) de [emim]SCN se utiliza para leche con tratamiento de temperatura ultra alta (UHT). Si no se indica de otro modo, la lisis de la matriz se realiza tal como sigue a continuación: 12,5 g de líquido o 6,25 g de producto alimenticio sólido se mezclan con 10 ml de tampón de lisis y son homogeneizados dos veces cada uno en el mezclador de laboratorio Stomacher 400 (Seward, London, Reino Unido) durante 3 minutos cada uno. El homogenado se transfiere a tubos de polipropileno de 50 ml (Corning, NY, USA). El tampón de lisis se añade para llevar el volumen a 45 ml. Las muestras son incubadas horizontalmente en un baño de agua (a 37 °C para *L. monocytogenes* o a 42 °C para *S. Typhimurium*, respectivamente), y se agitan a 200 rpm durante 30 min. Las muestras a continuación se centrifugan a 3.220 x g durante 30 min a temperatura ambiente. El pellet es resuspendido en 40 ml de tampón de lavado (1% Lutensol AO-07, y PBS) y se incuba horizontalmente en un baño de agua, se agita a 200 rpm durante 30 min a las temperaturas utilizadas durante la etapa de lisis. Después de ello, las muestras se centrifugan a 3.220 X g durante 30 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se desecha cuidadosamente. El pellet es resuspendido en 500 µl de PBS, transferido a un tubo de plástico de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y lavado dos veces en 1 ml de PBS con centrifugación adicional durante 5 min a 5.000 X g.

#### 4 B. Lisis de la matriz con solución de extracción que comprende MgCl<sub>2</sub>.

El tampón de lisis (=solución de extracción) contiene 0,5 a 3 M de MgCl<sub>2</sub>, 1 x tampón de Tris, pH 5-7.

Se mezclan 12 g de producto alimenticio líquido o 6 g sólido con 10 ml de tampón de lisis y se homogeneiza dos veces cada uno en el mezclador de laboratorio Stomacher 400 (Seward, London, Reino Unido). El homogenado es transferido a tubos de polipropileno de 50 ml. El tampón de lisis se añade para llevar el volumen a 45 ml. Las muestras son incubadas horizontalmente en un baño de agua (a 37 °C para *L. monocytogenes* o a 42 °C para *S. Typhimurium*, respectivamente), y se agitan a 200 rpm durante 30 min. Las muestras a continuación se centrifugan a 3.220 x g durante 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante es cuidadosamente eliminado dejando aproximadamente 500 µl de la muestra en el tubo. La muestra restante y el pellet se resuspende en 40 ml de tampón de lavado (1% Lutensol AO-07, y 1 x PBS) y se incuba horizontalmente en un baño de agua, se agita a 200 rpm durante 30 min a las temperaturas utilizadas durante la etapa de lisis. Después de ello, las muestras se centrifugan a 3.220 X g durante 30 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se desecha cuidadosamente para dejar aproximadamente 250 µl de la muestra en el tubo. La muestra restante y el pellet se resuspende en 500 µl de 1 x PBS, se transfiere a un tubo de plástico de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Después, las muestras se centrifugan durante 5 min a 5.000 X g a temperatura ambiente y el sobrenadante se desecha cuidadosamente. El pellet restante se lava dos veces en 1 ml de PBS con centrifugación adicional durante 5 min a 5.000 X g.

### 5. Aislamiento del ADN.

El aislamiento del ADN del pellet bacteriano restante a continuación de la lisis de la matriz, se realiza utilizando el kit de tejidos NucleoSpin® (Machery-Nagel, Düren, Alemania) y el protocolo de soporte para las bacterias Gram-positivas. La etapa final del protocolo se modifica y por lo tanto se utilizan dos veces 50 µl de agua doble destilada para eluir el ADN de la columna.

### 6. Cuantificación de células viables.

La cuantificación de células viables a partir del pellet bacteriano restante a continuación de la lisis de la matriz, se lleva a cabo utilizando el método de recuento de colonias (PCM, por sus siglas en inglés) en ambos, placas de triptona soja agar no selectivas complementadas con 0,6% (p/v) de extracto de levadura (TSAY; Oxoid, Hampshire, Reino Unido). La xilosa lisina desoxicolato agar (XLD; Oxoid, Hampshire, Reino Unido) se utiliza para *S. Typhimurium* y *Listeria* Agar cromogénico Oxoid (OCLA; Oxoid, Hampshire, Reino Unido) para *L. monocytogenes*.

## 7. Estándar ADN para la cuantificación por PCR en tiempo real.

Se extrae el ADN genómico de un mililitro de cultivo de toda la noche de *L. monocytogenes*, utilizando el kit de tejido NucleoSpin® (Macherey - Nagel) y el protocolo de soporte para las bacterias Gram-positivas. La concentración de ADN se determina analíticamente mediante medición fluorimétrica utilizando un aparato Hoefer DyNA Quant200 (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA) y un espectrómetro de matriz de diodos 8452A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). El número de copia del gen *prfA* se determina asumiendo que, en base al peso molecular del genoma de *L. monocytogenes*, 1 ng de ADN es igual a  $3,1 \times 10^5$  copias del genoma entero, y que el gen *prfA* es un gen de una única copia. El número de copias de la *Salmonella* diana fue determinado de manera similar asumiendo  $1,9 \times 10^5$  copias del genoma *S. Typhimurium* entero por 1 ng de ADN.

## 8. PCR en tiempo real.

La detección por PCR en tiempo real de *L. monocytogenes* estableciendo como diana un fragmento de 274 bp del gen *prfA* se realiza de acuerdo a los formatos publicados previamente (P. Rossmann et al., Research in Microbiology, 157 (2006) 763-771)). Se detecta *S. Typhimurium* utilizando el kit SureFood® (R-Biofarm, Darmstadt, Alemania), de acuerdo al manual de instrucciones. Se realiza la PCR en tiempo real en un termociclador de PCR en tiempo real Mx3000p (Stratagene, La Jolla, CA, USA). El volumen de 25 µl contiene 5 µl de ADN molde. Los resultados de la PCR en tiempo real se expresan como equivalentes de células bacterianas (ECB). Todas las reacciones de PCR en tiempo real se realizan por duplicado.

### Ejemplos de aplicación

#### 1. PCR en tiempo real de *S. Typhimurium* de helado y huevos a continuación de la lisis de la matriz.

El helado y los huevos contaminados artificialmente, que contenían una dilución en serie decimal de 4 etapas de *S. Typhimurium*, comenzando en  $6,67 \times 10^5$  UFC (desviación estándar (DE):  $\pm 2,54 \times 10^5$ ) por 6,25 g de muestra, se someten a aislamiento de ADN y a PCR en tiempo real después de la lisis de la matriz. La cantidad media de ECB por muestra obtenida mediante PCR en tiempo real es  $3,31 \times 10^6$  (DE:  $\pm 4,00 \times 10^5$ ) y  $5,02 \times 10^5$  (DE:  $\pm 2,87 \times 10^5$ ) del huevo para  $6,67 \times 10^5$  UFC de células inoculadas,  $3,34 \times 10^5$  (DE:  $\pm 4,57 \times 10^4$ ) y  $9,23 \times 10^5$  (DE:  $\pm 6,26 \times 10^4$ ) del huevo para  $6,67 \times 10^4$  UFC de células inoculadas,  $2,68 \times 10^4$  (DE:  $\pm 4,73 \times 10^3$ ) y  $1,30 \times 10^4$  (DE:  $\pm 2,73 \times 10^3$ ) del huevo para  $6,67 \times 10^3$  UFC de células inoculadas y  $2,74 \times 10^3$  (DE:  $\pm 1,46 \times 10^3$ ) y  $8,11 \times 10^2$  (DE:  $\pm 4,82 \times 10^2$ ) del huevo para  $6,67 \times 10^2$  UFC de células inoculadas (Tabla 1). La cantidad media de ECB lograda para la eficacia del aislamiento de ADN de la muestra de control antes de la lisis de la matriz es  $3,06 \times 10^4$  (DE:  $\pm 3,06 \times 10^3$ ) para  $6,67 \times 10^3$  UFC de células inoculadas. La cantidad media respectiva de células bacterianas inoculadas contada mediante recuentos de células de microscopio es  $1,84 \times 10^4$  (DE:  $\pm 4,97 \times 10^3$ ) (Tabla 4).

#### 2. PCR en tiempo real de *L. monocytogenes* de leche UHT a continuación de la lisis de la matriz.

La leche UHT contaminada artificialmente, que contiene una dilución en serie decimal de 4 etapas de *L. monocytogenes* comenzando en  $1,14 \times 10^6$  UFC (DE:  $\pm 2,28 \times 10^5$ ) por 12,5 ml de muestra, se somete a aislamiento de ADN y a PCR en tiempo real después de la lisis de la matriz. La cantidad media de ECB por muestra obtenida mediante PCR en tiempo real de leche UHT es  $1,70 \times 10^6$  (DE:  $\pm 1,90 \times 10^5$ ) para  $1,14 \times 10^6$  UFC de células inoculadas,  $1,49 \times 10^5$  (DE:  $\pm 2,22 \times 10^4$ ) para  $1,14 \times 10^5$  UFC de células inoculadas,  $1,60 \times 10^4$  (DE:  $\pm 3,27 \times 10^3$ ) para  $1,14 \times 10^4$  UFC de células inoculadas y  $1,97 \times 10^3$  (DE:  $\pm 7,09 \times 10^2$ ) para  $1,14 \times 10^3$  UFC de células inoculadas (Tabla 1). La cantidad media de ECB lograda para la eficacia del aislamiento de ADN de la muestra de control antes de la lisis de la matriz es  $1,48 \times 10^4$  (DE:  $\pm 1,93 \times 10^3$ ) para  $1,14 \times 10^4$  UFC de células inoculadas. La cantidad media respectiva de células bacterianas inoculadas contadas mediante recuentos de células de microscopio es  $2,94 \times 10^4$  (DE:  $\pm 7,64 \times 10^3$ ) (Tabla 4).

De acuerdo a los protocolos dados en el Ejemplo de aplicación 1 y 2, el protocolo de lisis de la matriz utilizando una solución de extracción que comprende al menos un líquido iónico se somete a prueba en combinación con PCR en tiempo real para demostrar la habilidad para la cuantificación directa de *L. monocytogenes* de la leche UHT, además de *S. Typhimurium* de helado y huevos. En comparación con las UFC del inoculado antes de la lisis de la matriz, se obtienen tasas recuperación de equivalentes de células bacterianas (ECB) del 190% para *L. monocytogenes* a partir de 12,5 ml de leche UHT y del 298% para *S. Typhimurium* a partir de 6,25 g de helado y huevos después de la lisis de la matriz (Tabla 4). Estas tasas de recuperación son el resultado de una subestimación del recuento celular real por muestra aplicando el PCM. Esta conclusión se verifica por el hecho de que los recuentos de ECB después de la lisis de la matriz se correlacionan mucho mejor con los recuentos celulares de la investigación con microscopio realizada para contar el inoculado antes de la lisis de la matriz, y con los resultados de control de la PCR en tiempo real (tabla 4). En comparación con los recuentos celulares mediante investigación con microscopio del inoculado antes de la lisis de la matriz, *L. monocytogenes* se recupera de la leche con una tasa de 75% y *S. Typhimurium* con un 108%. En comparación con el control con PCR en tiempo real antes de la lisis de la matriz, *L. monocytogenes* se recupera de la leche con una tasa del 114% y *S. Typhimurium* con un 65% (Tabla 4). Las tasas de recuperación

para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* son consistentes para todos los niveles de inoculación y para todos los productos alimenticios sometidos a prueba (Tabla 1). Esto demuestra que el protocolo de lisis de la matriz utilizando una solución de extracción que comprenda al menos un líquido iónico permite una diferenciación adecuada del contaminante en medidas de escala logarítmica.

5 TABLA 1. Cuantificación con PCR en tiempo real de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* de diversos productos alimenticios después de la lisis de la matriz

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	
Nivel de Inoculación de los productos alimenticios antes de la lisis de la matriz UFC <sup>a</sup> /ml (DE <sup>b</sup> )			
	1,14 X 10 <sup>9</sup> (± 2,28 X 10 <sup>8</sup> )	6,67 X 10 <sup>8</sup> (± 2,54 X 10 <sup>8</sup> )	
Recuperación después de la lisis de la matriz ECB <sup>c</sup> /ml (DE)			
Tasa <sup>d</sup> de Dil. X	Leche (UHT)	huevo	helado
10 <sup>-3</sup>	1,70 X 10 <sup>6</sup> (± 1,90 X 10 <sup>5</sup> )	5,02 X 10 <sup>5</sup> (± 2,87 X 10 <sup>5</sup> )	3,31 X 10 <sup>6</sup> (± 4,00 X 10 <sup>5</sup> )
10 <sup>-4</sup>	1,49 X 10 <sup>5</sup> (± 2,22 X 10 <sup>4</sup> )	9,23 X 10 <sup>4</sup> (± 6,26 X 10 <sup>4</sup> )	3,34 X 10 <sup>5</sup> (± 4,57 X 10 <sup>4</sup> )
10 <sup>-5</sup>	1,60 X 10 <sup>4</sup> (± 3,27 X 10 <sup>3</sup> )	1,30 X 10 <sup>4</sup> (± 2,73 X 10 <sup>3</sup> )	2,68 X 10 <sup>4</sup> (± 4,73 X 10 <sup>3</sup> )
10 <sup>-6</sup>	1,97 X 10 <sup>3</sup> (± 7,09 X 10 <sup>2</sup> )	8,11 X 10 <sup>2</sup> (± 4,82 X 10 <sup>2</sup> )	2,74 X 10 <sup>3</sup> (± 1,46 X 10 <sup>3</sup> )

a UFC: unidades formadoras de colonias según se obtienen por recuento de colonias.

b DE: desviación estándar

c ECB: equivalentes de células bacterianas (en términos de recuentos de PCR en tiempo real)

d Diluciones en serie a partir de los niveles de concentraciones de la inoculación inicial

**3. Cuantificación de recuento de colonias de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* de productos alimenticios a continuación de la lisis de la matriz.**

10 Los productos alimenticios contaminados artificialmente, que contenían dilución en serie decimal de 4 etapas de o bien *L. monocytogenes* o de *S. Typhimurium*, se someten a cuantificación de recuento de colonias después de la lisis de la matriz. La recuperación media de *L. monocytogenes* a partir de muestras de 12,5 ml es del 108% en placas de TSA-Y agar, en comparación con la muestra de control. *S. Typhimurium* se recupera de muestras de 6,25 g de huevos en placas de TSA-y agar con una media del 60%. La cuantificación de *S. Typhimurium* en TSA-Y agar de helado no es posible por la flora microbiana de fondo del producto alimenticio. Se logra una recuperación media del 36% (Tabla 2) cuando se utiliza XLD agar selectivo.

20 La recuperación en placas de agar selectivo se reduce en comparación con las placas de agar no selectivo. Se cuantifica *L. monocytogenes* a partir de 12,5 ml de leche UHT con una recuperación media del 68% sobre OCLA agar, y *S. Typhimurium* con una tasa del 34% a partir de 6,25 g de huevos sobre XLD agar, respectivamente (Tabla 3). Estos resultados se correlacionan con el hecho conocido de que el crecimiento bacteriano sobre placas de agar selectivo puede ser reducido en comparación con el crecimiento en placas de agar no selectivo.

25 Las tasas de recuperación para ambos organismos son consistentes para todos los niveles de inoculación, lo que muestra que el protocolo de lisis de la matriz permite la adecuada diferenciación del contaminante en medidas de escala logarítmica. Sin embargo, considerando la elevada desviación estándar y la subestimación observada de los recuentos celulares reales (Tabla 4), el PCM parece ser menos apropiado para fines de cuantificación en comparación con la PCR en tiempo real.

TABLA 2. Cuantificación de células viables de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* de varios productos alimenticios después de la lisis de la matriz

	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
	Leche <sup>a</sup> UHT	Huevo <sup>a</sup>	Leche <sup>a</sup> UHT	Helado <sup>b</sup>
Control <sup>c</sup> UFC/ml (DER <sup>d</sup> )	4,30 X 10 <sup>8</sup> (26,4%)	6,85 x 10 <sup>8</sup> (18,5%)	4,30 X 10 <sup>8</sup> (26,4%)	6,99 X 10 <sup>8</sup> (19%)
Producto alimenticio medio después de lisis de matriz	4,65 X 10 <sup>8</sup> (36,8%)	4,14 X 10 <sup>8</sup> (37,4%)	4,65 X 10 <sup>8</sup> (36,8%)	2,54 X10 <sup>8</sup> (22,2%)
Tasa de recuperación (%) <sup>e</sup>	108%	60%	108%	36%

a Los resultados están basados en valores de triptona soja agar + 0,6% (p/v) de extracto de levadura.

b Los resultados están basados en valores de xilosa lisina desoxicolato agar.

c Nivel de inoculación de los productos alimenticios antes de la lisis de la matriz.

d DER: desviación estándar relativa.

e La recuperación se calcula en base a los recuentos de UFC antes y después de la lisis de la matriz.

**4. Comparación de la cuantificación por recuento de colonias de *L. monocytogenes* de leche UHT y *S. Typhimurium* de huevos a continuación de la lisis de la matriz sobre placas de agar selectivo y no selectivo.**

6,25 g de huevos contaminados artificialmente, que contenían dilución en serie decimal de 4 etapas de *S. Typhimurium* con 6,85 X 10<sup>8</sup> UFC/ml (desviación estándar relativa (DER): 18,5%) se someten a cuantificación por recuento de colonias sobre placas de TSA-Y y XLD agar después de la lisis de la matriz. La cantidad media de UFC por muestra obtenida mediante PCM de huevo es 4,14 X 10<sup>8</sup> (DER: 37,4%) sobre placas de TSA-Y agar y 2,33 X 10<sup>8</sup> (DER: 12,5%) sobre placas de XLD agar. La tasa de recuperación de *S. Typhimurium* de huevo es del 34% en agar selectivo y del 60% en agar no selectivo (Tabla 3).

12,5 ml de leche UHT contaminada artificialmente, que contenía dilución en serie decimal de 4 etapas de *L. monocytogenes* con 4,30 X 10<sup>8</sup> UFC/ml (DER: 26,4%), se somete a cuantificación por recuento de colonias sobre placas de TSA-Y y OCLA agar después de la lisis de la matriz. La cantidad media de UFC por muestra obtenida mediante PCM de la leche UHT es 4,65 X 10<sup>8</sup> (DER: 36,8%) sobre placas de TSA-Y agar y 2,90 X 10<sup>8</sup> (DER: 37,9%) sobre placas de OCLA agar. La tasa de recuperación de *L. monocytogenes* de leche UHT es del 67% sobre agar selectivo y del 108% sobre agar no selectivo (Tabla 3).

TABLA 3. Comparación de recuentos de células viables de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* de leche UHT y huevos después de la lisis de la matriz sobre placas de agar selectivo (XLD; OCLA) y no selectivo (TSA-Y).

	<i>L. monocytogenes</i> <sup>a</sup>		<i>S. Typhimurium</i> <sup>b</sup>	
	TSA-Y <sup>c</sup>	OCLA <sup>c</sup>	TSA-Y <sup>c</sup>	XLD <sup>c</sup>
Control <sup>d</sup> antes de lisis de matriz UFC/ml (DER <sup>e</sup> )	4,30 X 10 <sup>8</sup> (26,4%)	-	6,85 X 10 <sup>8</sup> (18,5%)	-
Producto alimenticio medio después de lisis de matriz UFC/ml (DER)	4,65 X 10 <sup>8</sup> (36,8%)	2,90 X 10 <sup>8</sup> (37,9%)	4,14 X 10 <sup>8</sup> (37,4%)	2,33 X 10 <sup>8</sup> (12,5%)
Tasa de recuperación (%)	108%	67%	60%	34%

20

<i>L. monocytogenes</i> <sup>a</sup>		<i>S. Typhimurium</i> <sup>b</sup>	
TSA-Y <sup>c</sup>	OCLA <sup>c</sup>	TSA-Y <sup>c</sup>	XLD <sup>c</sup>

a Producto alimenticio aplicado a la lisis de la matriz: huevo.

b Producto alimenticio aplicado a la lisis de la matriz: leche UHT

c TSA-Y: Triptona soja agar + 0,6% (p/v) de extracto de levadura; XLD: xilosa lisina desoxicolato agar; OCLA: *Listeria* Agar cromogénico Oxoid.

d Nivel de inoculación de los productos alimenticios antes de la lisis de matriz.

e DER: desviación estándar relativa.

f la recuperación se calcula en base a los recuentos de UFC antes y después de la lisis de la matriz.

TABLA 4. Determinación de la tasa de recuperación de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* de diversos productos alimenticios (ef) después de la lisis de la matriz tal como se determina mediante PCR en tiempo real

Recuperación relacionada con	PCR en tiempo real		Nivel <sup>a</sup> de inoculación			
	Control <sup>b</sup> ECB <sup>c</sup> /ml (DE <sup>d</sup> )	Media <sup>e,f</sup> de muestras de productos alimenticios después de la lisis de matriz ECB/ml (DE)	Microscopía <sup>a</sup>	(DE)	Células/ml	Método <sup>a</sup> de recuento de Colonias UFC/ml (DE)
<i>L. monocytogenes</i>	1,48 X 10 <sup>4</sup> (± 1,93 X 10 <sup>3</sup> )	1,69 X 10 <sup>4</sup> (± 1,71 X 10 <sup>2</sup> )		2,94 X 10 <sup>4</sup> (± 7,64 X 10 <sup>3</sup> )		1,14 X 10 <sup>4</sup> (± 2,28 X 10 <sup>3</sup> )
Tasa de recuperación (%) <sup>g</sup>						
Microscopía	50%	75%		100%		-
Método de Recuento de colonias	130%	190%		-		100%
PCR en tiempo real	100%	114%		-		-
<i>S. Typhimurium</i> <sup>f</sup>	3,06 X 10 <sup>4</sup> (± 3,06 X 10 <sup>3</sup> )	1,97 X 10 <sup>4</sup> (± 1,58 X 10 <sup>3</sup> )		1,84 X 10 <sup>4</sup> (± 4,97 X 10 <sup>3</sup> )		6,67 X 10 <sup>3</sup> (± 2,54 X 10 <sup>3</sup> )
Tasa de recuperación (%)						
Microscopía	166%	108%		100%		-
Método de Recuento de colonias	459%	295%		-		100%
PCR en tiempo real	100%	65%		-		-

a Nivel de inoculación de los productos alimenticios antes de la lisis de la matriz

b Cultivo bacteriano directamente procesado con kit de tejido NucleoSpin®, sin lisis de matriz como control para la eficacia del aislamiento del ADN.

c ECB: equivalentes de células bacterianas (en términos de conteos de PCR en tiempo real)

d DE: desviación estándar

e Producto alimenticio aplicado a la lisis de la matriz: leche UHT.

f Productos alimenticios aplicados a la lisis de la matriz: helado y huevo.

g la recuperación se calcula en base a los recuentos y valores mostrados en las respectivas filas verticales y en comparación con el valor relativo que representa el 100%

### 5. Cuantificación de recuento de colonias de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*.

5 Se investiga la influencia de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> sobre la viabilidad de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*. Los organismos diana se incuban durante 30 min con 3 concentraciones diferentes de MgCl<sub>2</sub> (1 M, 2 M y 3 M) y a 3 temperaturas diferentes (35°C, 38°C y 45°C) y las UFC sobre placas de TSA-Y agar después del tratamiento se comparan con la muestra de control.

10 2,78 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (desviación estándar relativa (DER): 23%) de células *Listeria monocytogenes* se someten a diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y a diferentes temperaturas. Con una temperatura de incubación de 35 °C las UFC/ml de *L. monocytogenes* son 3,86 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (DER: 22%) con 1 M de MgCl<sub>2</sub>, 3,10 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (DER: 23%) con 2 M MgCl<sub>2</sub> y 1,76 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (DER: 21 %) con 3 M MgCl<sub>2</sub>. Con una temperatura de incubación de 38 °C las UFC/ml de *L. monocytogenes* son 4,06 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (DER: 31%) con 1 M MgCl<sub>2</sub>, 3,64 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (DER: 21%) con 2 M MgCl<sub>2</sub> y 8,5 X 10<sup>8</sup> UFC/ml (DER: 34%) con 3 M MgCl<sub>2</sub>. Con una temperatura de incubación de 45 °C las UFC/ml de *L. monocytogenes* son 4,39 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (DER: 23%) con 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1,68 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (DER: 14%) con 2 M MgCl<sub>2</sub> y 1,5 X 10<sup>8</sup> UFC/ml (DER: 15%) con 3 M MgCl<sub>2</sub>.

20 2,22 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (RSD: 18%) de células de *Salmonella Typhimurium* se someten a concentraciones diferentes de MgCl<sub>2</sub> y a diferentes temperaturas. Con una temperatura de incubación de 35 °C las UFC/ml de *Typhimurium* son 1,15 X 10<sup>9</sup> UFC/ml (DER: 37%) con 1 M MgCl<sub>2</sub>, 2,3 X 10<sup>8</sup> UFC/ml (DER: 41%) con 2 M MgCl<sub>2</sub> y 5,75 X 10<sup>7</sup> UFC/ml (DER: 36%) con 3 M MgCl<sub>2</sub>. Con una temperatura de incubación de 38 °C las UFC/ml de *S. Typhimurium* son 8,33 X 10<sup>8</sup> UFC/ml (DER: 22%) con 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1,35 X 10<sup>8</sup> UFC/ml (DER: 69%) con 2 M MgCl<sub>2</sub> y 2,0 X 10<sup>7</sup> UFC/ml (DER: 50%) con 3 M de MgCl<sub>2</sub>. Con una temperatura de incubación de 45 °C la UFC/ml de *S. Typhimurium*, es 4,1 X 10<sup>8</sup> UFC/ml (DER: 23%) con 1 M MgCl<sub>2</sub>. Los resultados se visualizan en la Figura 2.

### 6. Recuento de células viables de *S. Typhimurium* de helado contaminado artificialmente después de la lisis de la matriz.

25 Los productos alimenticios contaminados artificialmente, que contienen diluciones en serie decimal de 4 etapas de *S. Typhimurium*, se someten a cuantificación de recuentos de colonias después de la lisis de la matriz. El protocolo de lisis de la matriz con 0,5 M MgCl<sub>2</sub> se somete a prueba en xilosa lisina desoxicolato agar para demostrar una cuantificación directa eficiente de *S. Typhimurium* del helado. Se recupera *S. Typhimurium* de 6,5 g de helado con una media del 38%.

30



**REIVINDICACIONES**

1. Método para el aislamiento de células rodeadas por una pared celular a partir de una muestra de alimentos, un fluido corporal, muestra de agua o tejido que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una muestra de alimentos, fluido corporal, muestra de agua o tejido,
- 5 b) incubar dicha muestra con una solución de extracción que comprende un líquido iónico en concentraciones entre 0,5% y 20% en peso, en base al peso de la mezcla
- c) aislar dichas células de la mezcla de la etapa b) mediante centrifugación, filtración, dielectroforesis y ultrasonidos, o afinidad de unión.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado porque** al menos un 30% de las células aisladas en la etapa c) son células viables.
3. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** las células son células bacterianas.
4. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la solución de extracción no comprende un detergente.
- 15 5. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** a la muestra se añade una cantidad definida de células de control previamente a la etapa b).
6. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la muestra se incuba previamente con un compuesto que muestra propiedades protectoras ante el estrés osmótico para las células.
7. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la muestra se incuba además con al menos una enzima de degradación de biopolímeros.
- 20 8. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** en una etapa adicional d) las células se analizan mediante recuento celular, métodos de PCR, utilizando lectinas o mediante métodos que implican anticuerpos, péptidos antimicrobianos (AMP), aptámeros o dominios de unión viral, dirigidos a las estructuras superficiales de dichas células.

**Fig. 1**

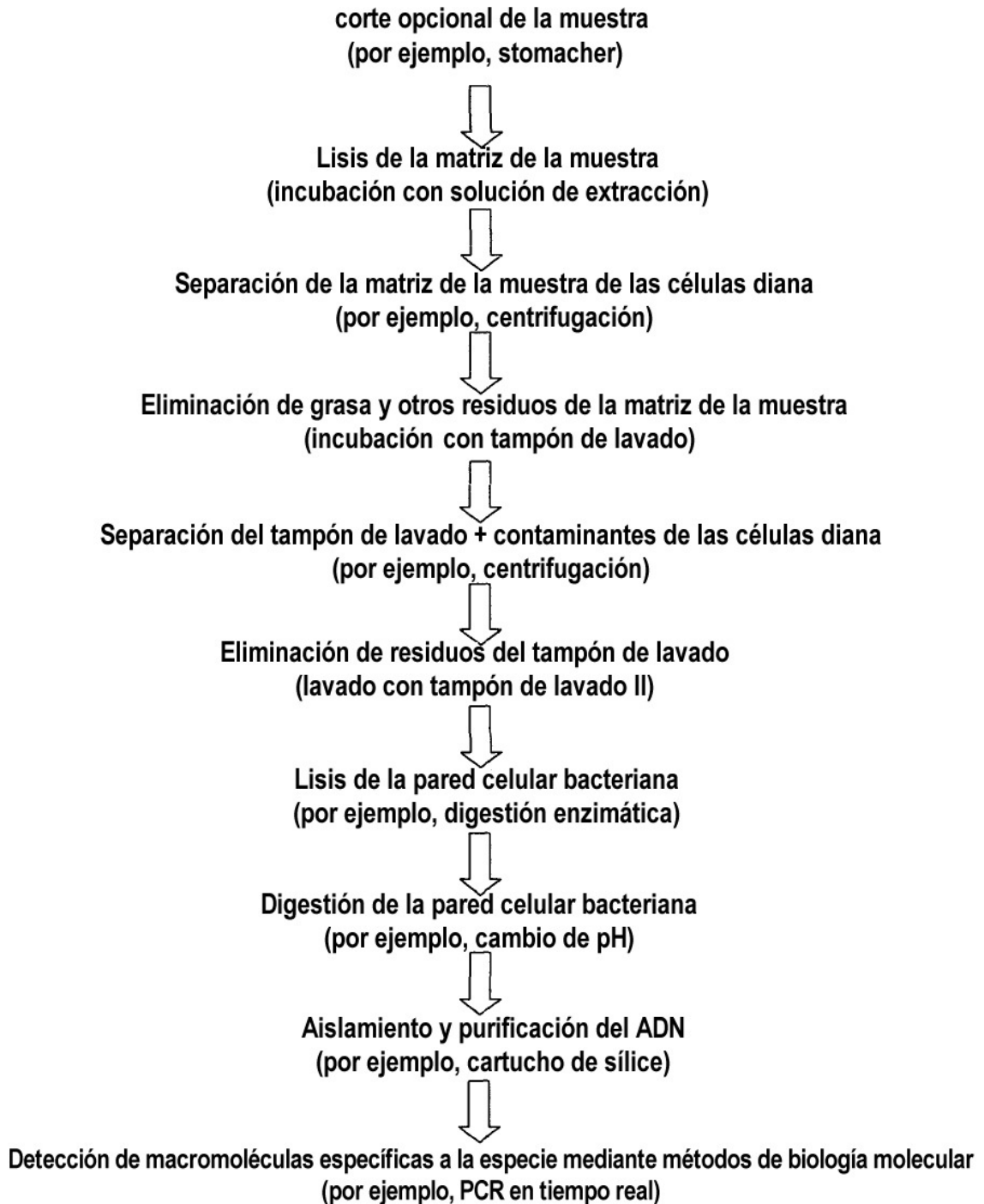


Fig. 2

