

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
9 de diciembre de 2010 (09.12.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/139820 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 1/12 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
C07K 14/42 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)

(74) Representante común: **UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID**; Avda. Séneca, 2.
28040 Madrid. (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/000244

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de junio de 2010 (02.06.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200901370 5 de junio de 2009 (05.06.2009) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**
[ES/ES]; Avda. Séneca, 2. 28040 Madrid. (ES).
SALGADO VELA, Eva María [ES/ES]; Facultad de
Veterinaria de la Universidad, Complutense de Madrid.,
Avda. Puerta de Hierro S/n., E-28040 Madrid. (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **LOPEZ
RODAS, Eduardo** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria de la
Universidad, Complutense de Madrid., Avda. Puerta de
Hierro S/n., E-28040 Madrid. (ES). **LOPEZ RODAS,
Victoria** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria de la
Universidad, Complutense de Madrid., Avda. Puerta de
Hierro S/n., E-28040 Madrid. (ES). **MATEOS SANZ,
María Aránzazu** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria de la
Universidad, Complutense de Madrid., Avda. Puerta de
Hierro S/n., E-28040 Madrid. (ES). **CARRERA
MARTINEZ, Daniel** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria
de la Universidad, Complutense de Madrid., Avda. Puerta
de Hierro S/n., E-28040 Madrid. (ES).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las
reivindicaciones y para ser republicada si se reciben
modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: METHOD AND KIT FOR RECOGNITION OF MICROCYSTIN-PRODUCING AND NON-MICROCYSTIN-PRODUCING STRAINS OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* (CYANOBACTERIA)

(54) Título : MÉTODO Y KIT DE RECONOCIMIENTO DE CEPAS DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* (CYANOBACTERIA) PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE MICROCISTINAS.

(57) Abstract: Method and kit for recognition of microcystin-producing and non-microcystin-producing strains of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). The present invention relates to a method for detecting microcystin-producing strains and strains that do not produce said toxin within populations of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) by means of the use of *Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA-1), of a probe for labelling the lectin and of the means necessary for detecting the probe. The invention likewise provides a kit for the recognition of microcystin-producing and non-microcystin-producing strains, based on the method described.

(57) Resumen: Método y kit de reconocimiento de cepas de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) productoras y no productoras de microcistinas. La presente invención se refiere a un método para detectar cepas productoras de microcistina y cepas no productoras de esta toxina dentro de poblaciones de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria), mediante la utilización de la lectina Aglutinina 1 de *Ulex europaeus* (UEA-1), de una sonda de marcaje de la lectina y de los medios necesarios para detectar la sonda. Así mismo la invención proporciona un kit para el reconocimiento de cepas productoras y no productoras de microcistina basado en el método descrito.

WO 2010/139820 A1

TÍTULO DE LA INVENCION

Método y kit de reconocimiento de cepas de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) productoras y no productoras de microcistinas.

5 SECTOR DE LA INVENCION

La invención se encuadra en el sector de la biotecnología para la sanidad ambiental, y más en concreto, en el relativo a métodos y dispositivos (kits) de reconocimiento de microorganismos productores de toxinas en agua.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las cianobacterias tóxicas engloban un amplio rango de microalgas capaces de proliferar en aguas continentales de todo el mundo, en especial cuando éstas tienen un alto grado de eutrofia, constituyendo una importante preocupación a nivel internacional.

- 15 Unas 40 especies de cianobacterias son capaces de producir toxinas (microcistinas). Estas toxinas son capaces de permanecer inalteradas durante largos periodos de tiempo en el medio acuático siendo un peligro potencial para la salud humana así como para la fauna doméstica y silvestre. Varios estudios científicos han demostrado que la microcistina produjo la muerte de
- 20 50 personas en Brasil; casos similares han sido descritos en otros países como China, donde los blooms o floraciones de cianobacterias tóxicas son ya un importante problema de salud pública (Zhang *et al.*, 2009. *Sci. Total Environ.* 407: 2191-9). Recientemente en Europa se ha asociado la presencia de microcistina en el agua de consumo con un incremento en la prevalencia
- 25 de cáncer de colon e hígado (Martínez *et al.*, 2009. *Med. Hypotheses* 72: 539-40).

- Los blooms de cianobacterias tóxicas también han sido responsables de mortandades masivas de fauna silvestre en reservas naturales protegidas como el caso del Espacio Natural de Doñana descrito por López-Rodas *et al.*
- 30 (2008. *Vet. Rec.* 162: 317-8).

La cianobacteria tóxica que aparece implicada en la mayoría de episodios tóxicos es *M. aeruginosa* (Kützinger), productora de microcistina-LR

(hepatotoxina). Sin embargo, no todos los blooms de *M. aeruginosa* son blooms tóxicos. De hecho, generalmente durante el periodo de máxima proliferación de éstas microalgas y en una misma masa de agua, existen variaciones en la concentración de microcistina. Sivonen y Jones (1999. En
5 Chorus, I. & Bartram, J. [Eds.] *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. pp. 41-111. Routledge. London.) indican que uno de los factores fundamentales responsables de la variación de concentración de toxina en el medio, por encima de las condiciones medioambientales, es la presencia de una mezcla
10 de cepas capaces de generar una alta producción de toxina junto con cepas no tóxicas.

En este sentido, diversos estudios han demostrado que existe una gran variabilidad genética respecto a la producción de microcistina en diferentes cepas de *M. aeruginosa*, concluyendo que existen cepas de *M. aeruginosa*
15 altamente tóxicas, cepas muy poco tóxicas y cepas no tóxicas (Martín *et al.*, 2004. *Limnetica* 23 1-2: 153-8)

Ante la toxicidad de *M. aeruginosa* se han implantado sistemas de control y redes de alerta temprana de la presencia de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* en los embalses destinados a la red abastecimiento urbano así como en
20 aquellas masas de agua de las que se abastecen ganado, y fauna silvestre de interés en conservación (p.e en el Espacio Natural de Doñana).

Para cumplir este objetivo es necesario contar con métodos de detección rápidos que permitan discriminar de manera inequívoca entre cepas tóxicas y
25 no tóxicas de *M. aeruginosa*. Por el momento no hay un procedimiento eficaz y rápido. Se puede hacer mediante la secuenciación del DNA buscando los genes de la microcistina, pero es un procedimiento complejo y lento. En este sentido el uso de lectinas conjugadas con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) es una alternativa mucho más sencilla y rápida.

30 Las lectinas son proteínas o glicoproteínas capaces de unirse mediante enlaces no covalentes a los residuos de monosacáridos u oligosacáridos presentes en la superficie celular. Las lectinas han sido ampliamente

utilizadas en la clasificación de bacterias, protozoos y otros microorganismos. La aplicación de lectinas conjugadas con FITC junto con técnicas de epifluorescencia microscópica han permitido diferenciar entre especies de dinoflagelados morfológicamente similares.

- 5 También se ha empleado lectinas conjugadas con FITC para discernir entre diferentes cepas de microorganismos productores de toxinas. Se han empleado diferentes lectinas para reconocer cepas tóxicas de *M. aeruginosa* (Alvarez *et al.*, 1998. En Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. y Wyatt, T. [Eds.] *Harmful algae*. pp. 291-5. Xunta de Galicia and Intergovernmental
- 10 Oceanographic Commission of UNESCO, París.), de *Alexandrium tamarense* (Cho *et al.*, 2001. *J. Plankton Res.* 23: 89-95), o para reconocer cepas de *Pseudonitzschia multiseries* Hasle productoras de ácido domóico (Cho *et al.*, 2002. *Bot. Mar.* 45: 346-72; y Cho, 2003. *J. Plankton Res.* 25: 309-15.). Recientemente, Hou y colaboradores (2008. *J. Appl. Phycol.* 20: 35-46) han
- 15 empleado lectinas para reconocer 23 cepas productoras de toxinas de 13 especies diferentes y típicamente problemáticas en aguas de China, incluyendo *Alexandrium tamarense*, *A. catenella*, *A. minutum*, *Karenia mikimotoi*, *Takayama pulchellum*, *Akashiwo sanguinea*, *Gyrodinium instriatum*, *Gymnodinium sp*, *Prorocentrum donghaiense*, y *P. minimum*.

20

Cabe destacar que una de las conclusiones más importantes de los trabajos citados es que, aunque el reconocimiento de dinoflagelados tóxicos mediante lectinas es un método sencillo y rápido, la variabilidad genética de las distintas especies puede provocar problemas de falso reconocimiento y

25 discriminación (ver, por ejemplo, Hou *et al.*, 2008. *J. Appl. Phycol.* 20: 35-46). Por este motivo es necesario obtener lectinas que permitan superar el problema y discernir con total garantía y fiabilidad entre cepas productoras de toxinas y cepas no productoras, de forma que pueda implantarse su empleo rutinario en los sistemas de control y alerta temprana de calidad de agua.

- 30 Teniendo en cuenta que *M. aeruginosa* aparece implicada en la mayoría de episodios tóxicos de proliferaciones de cianobacterias a escala mundial, y que se caracteriza por una gran variabilidad genética respecto a la producción de

microcistina, resulta especialmente necesario e interesante la obtención de una lectina que permita reconocer y discernir inequívocamente entre cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina.

- 5 La presente invención tiene por objeto principal proporcionar un kit basado en una lectina que permite reconocer y discernir inequívocamente entre cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina. También se reivindica el método basado en dicho kit por el que se puede reconocer y discernir
- 10 inequívocamente entre cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina. Se trata de un procedimiento fiable, rápido y de sencillo desarrollo, de implantación idónea en los sistemas de red de alerta temprana en embalses de abastecimiento urbano y sistemas de control de aguas de abastecimiento
- 15 de ganado y aguas refugio de fauna silvestre.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que la lectina Aglutinina 1 de *Ulex europaeus* (UEA-I) es capaz de reconocer y discriminar
- 20 inequívocamente entre cepas de *Microcystis aeruginosa* productoras de microcistina de las no productoras.

- Los inventores han observado que la lectina UEA-I se une a la superficie celular de las cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina investigadas, y no se une a las cepas de *M. aeruginosa* productoras de
- 25 microcistina. Sin querer estar vinculado por ninguna teoría, se piensa que hay un ligamiento entre los genes que codifican las glicoproteínas transmembrana diana de la lectina UEA-I y los genes que codifican microcistinas en *M. aeruginosa*, lo que garantiza que la presencia de la glicoproteína diana de la lectina UEA-I en la superficie celular de *M. aeruginosa*, y por tanto, su
- 30 reconocimiento y unión por UEA-I, es incompatible con la producción de microcistina en *M. aeruginosa*.

De esta forma, mediante un kit que contenga lectina UEA-I y los medios necesarios para detectar la unión de dicha lectina con su glicoproteína diana de la superficie celular de *M. aeruginosa*, es posible discernir inequívocamente entre la presencia o ausencia de cepas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina en una muestra dada. El método para discernir inequívocamente entre la presencia o ausencia de cepas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina en una muestra dada comprende la exposición de dicha muestra a la lectina UEA-I en presencia de los medios necesarios para detectar la unión de dicha lectina con su glicoproteína diana de la superficie celular de *M. aeruginosa*, y la posterior detección de señal.

Un método de estas características, basado en el empleo de la lectina UEA-I, resulta en un procedimiento de total fiabilidad para la detección de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* en el medio, lo que supone un gran avance técnico en relación con los métodos basados en reconocimiento de la superficie celular de cepas tóxicas conocidos, que por su sencillez y rapidez, son más interesantes que otros métodos basados en secuenciación de DNA, de alta fiabilidad pero de mayor complejidad, duración, coste económico y requerimiento técnico.

20

Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente invención, se entiende por "lectinas", proteínas o glicoproteínas capaces de unirse mediante enlaces no covalentes a los residuos de monosacáridos u oligosacáridos presentes en la superficie celular. En concreto, la lectina Aglutinina 1 de *Ulex europaeus* (UEA-I), es una proteína o glicoproteína producida por *Ulex europaeus* con afinidad específica por residuos de L-fucosa.

Por "sonda", se entiende un elemento de marcaje que interacciona con una molécula diana, y es capaz de producir una señal detectable cuando en dicha molécula diana se produce un cambio de estado, por ejemplo, por efecto del reconocimiento de otra molécula, o de su unión con otra molécula. Una "sonda fluorescente" o "fluoróforo", es un elemento de marcaje capaz de

emitir luz fluorescente cuando se produce un cambio de estado de la molécula diana con la que interacciona. Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) es una sonda fluorescente que se emplea comercialmente unida a la lectina UEA-I para detectar una unión no covalente de dicha lectina a una molécula
5 diana que puede ser una glicoproteína, un glicolípido o un glúcido. La epifluorescencia es la técnica que permite detectar la fluorescencia emitida por la sonda fluorescente o fluoróforo. Puede aplicarse a un microscopio adaptado para la epifluorescencia.

Por "cepa" se entiende una variante genotípica de una especie dada que se
10 caracteriza por una propiedad bioquímica, fisiológica, morfológica, o de otra naturaleza. Así, por ejemplo, en el caso de *M. aeruginosa*, se pueden definir cepas distintas por su capacidad de producción de microcistina. Dicha capacidad viene definida por la funcionalidad de unos genes que codifican para heptapéptidos de efecto hepatotóxico conocidos como microcistinas.

15 Una solución PBS consiste esencialmente en una disolución de 0.02 M fosfato y 0.15 M NaCl en agua a pH 7.5.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un kit para el reconocimiento y discriminación de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina que
20 comprende:

- lectina UEA-I,
- una sonda que permite detectar la unión de dicha lectina UEA-I con su glicoproteína diana de la superficie celular de *M. aeruginosa*,
- medios para poner en contacto una muestra con dicha lectina UEA-I.

25 En una realización preferente de la presente invención, la sonda que permite detectar la unión de la lectina UEA-I con su glicoproteína diana de la superficie celular de *M. aeruginosa* es una sonda fluorescente. En una realización aun más preferente de la presente invención, dicha sonda es Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). En una realización particular de la
30 presente invención, el medio para poner en contacto una muestra con la lectina UEA-I, comprende un recipiente y una solución PBS. Dicho recipiente

puede ser un tubo de ensayo, un microtubo, un microtubo de tipo Eppendorf, o uno, o varios pocillos de una placa multipocillos.

En una realización más particular de la presente invención, el kit para la discriminación de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina comprende lectina UEA-I en una concentración entre 1 y 1000 microgramos de lectina por mililitro de muestra. En una realización aun más particular de la presente invención, el kit comprende dicha lectina en una concentración entre 50 y 500 microgramos de lectina conjugada con sonda por mililitro de solución que contiene la muestra. En una realización aun más particular de la presente invención, el kit comprende lectina UEA-I en una concentración entre 95 y 105 microgramos de lectina conjugada con sonda por mililitro de solución que contiene la muestra.

También es objeto de la presente invención el método para el reconocimiento y discriminación de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina que comprende:

- a) poner en contacto una muestra con la lectina UEA-I y con una sonda específica de dicha lectina UEA-I,
- b) detectar la señal emitida por dicha sonda, o la ausencia de señal.

En una realización particular de la presente invención, el método para la discriminación de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina comprende lectina UEA-I en una concentración entre 1 y 1000 microgramos de lectina por mililitro de muestra. En una realización aun más particular de la presente invención, dicho método comprende dicha lectina en una concentración entre 50 y 500 microgramos de lectina conjugada con sonda por mililitro de solución que contiene la muestra. En una realización aun más particular de la presente invención, dicho método comprende lectina UEA-I en una concentración entre 95 y 105 microgramos de lectina conjugada con sonda por mililitro de solución que contiene la muestra.

En una realización preferente de dicho método, la sonda que permite detectar la unión de dicha lectina UEA-I con su glicoproteína diana de la superficie celular de *M. aeruginosa* es fluorescente. En una realización preferente de dicho método, dicha sonda fluorescente es FITC, los medios para poner en
5 contacto una muestra con la lectina UEA-I comprenden un microtubo y una solución PBS, y la detección de la señal emitida por la sonda FITC, o la ausencia de señal, se realiza por epifluorescencia mediante un microscopio con filtro para FITC. En una realización particular de dicho método, se incluye una etapa de homogeneización y acondicionamiento de la muestra, previa a
10 poner en contacto dicha muestra con la lectina UEA-I y con una sonda específica de dicha lectina UEA-I, comprendiendo dicha etapa de homogeneización y acondicionamiento la centrifugación de la muestra y su resuspensión en una solución PBS.

La presente invención proporciona un kit que permite reconocer y discernir
15 entre cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina con total garantía y fiabilidad. El uso de este kit, y del método para la discriminación entre cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina basado en dicho kit, supone un avance definitivo
20 en el desarrollo de técnicas eficaces para prevenir y controlar la presencia de microorganismos productores de toxinas en aguas como es el caso de *M. aeruginosa*. Se trata de un procedimiento rápido y de sencillo desarrollo, de implantación idónea en los sistemas de red de alerta temprana en embalses de abastecimiento urbano y sistemas de control de aguas de abastecimiento
25 de ganado y aguas refugio de fauna silvestre. La fiabilidad y garantía que proporciona dicho kit y su empleo, sumados a las ventajas en cuanto a rapidez y sencillez técnica propias de los métodos de reconocimiento frente a otros métodos conocidos, supone el avance necesario y definitivo para su empleo rutinario por parte de empresas e instituciones encargadas de
30 garantizar la salubridad de las aguas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para facilitar la comprensión de las características de la invención y formando parte de la memoria descriptiva, se incluye la siguiente figura:

Figura 1: Imagen al microscopio del reconocimiento de distintas cepas de *M. aeruginosa* mediante el método descrito, empleando 100 microgramos de lectina UEA-I conjugada con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). La señal emitida por la sonda FITC, o la ausencia de señal, se detecta por epifluorescencia mediante un microscopio con filtro para FITC.

a) Imagen de una cepa de *M. aeruginosa* no productora de microcistina. b) Imagen de una cepa tóxica de *M. aeruginosa* productora de microcistina.

EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

A continuación se describe el método de empleo del kit objeto de la presente invención para detectar la presencia de cepas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina en muestras de agua tomadas en un embalse de agua dulce para abastecimiento de población humana.

Las muestras, tal y como llegaron al laboratorio, se homogeneizaron mediante agitación manual. Con ayuda de una micropipeta se depositó una alícuota de 1 mililitro de volumen de muestra en un microtubo tipo Eppendorf (Eppendorf Ibérica S.A.). El microtubo con la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 revoluciones por minuto y se retiró el sobrenadante con una pipeta de plástico. La pastilla sedimentada se resuspendió en 500 microlitros de solución PBS (disolución de 0.02M fosfato, 0.15M NaCl, pH 7.5) homogeneizándose mediante agitación suave. Se añadieron 50 microgramos de lectina UEA-I conjugada con la sonda fluorescente Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) de la disponible comercialmente (Sigma-Aldrich S.A.), para dar una concentración final de 100 microgramos de lectina conjugada por mililitro de muestra. El microtubo con la muestra se incubó en agitación durante 10 minutos a 20 grados centígrados y en oscuridad. Transcurrido ese

tiempo, con ayuda de una micropipeta, se depositaron 20 microlitros de la muestra incubada en un portaobjetos para microscopía como los disponibles comercialmente en el mercado. La preparación con la muestra dispuesta en el portaobjetos se examinó por observación en un microscopio de la marca
5 Zeiss Axiovert dotado con un filtro para FITC de excitación en un rango de longitud de onda de 450-490 nanómetros y emisión en un rango de 520-560 nanómetros. Las muestras en las que se observó una luz verde fluorescente se registraron como muestras negativas a la presencia de cepas *M. aeruginosa* productoras de microcistina. Las muestras en las que no se
10 detectó luz fluorescente se registraron como positivas a la presencia de cepas *M. aeruginosa* productoras de microcistina. En todos los casos se emplearon controles positivos (células teñidas con naranja de acridina) y negativos (células incubadas con lectinas no conjugadas con FITC).

Ejemplo 2

15 A continuación se describe un ejemplo de certificación de la fiabilidad del kit de reconocimiento de cepas productoras de microcistina basado en la lectina UEA-I conjugada con la sonda FITC.

Se tomaron 29 muestras de clones de cepas de *M. aeruginosa* disponibles en
20 la colección de Cultivo de Algas Tóxicas de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España). Las 29 cepas habían sido aisladas en embalses de agua para suministro de agua potable o lagos localizados en Andalucía (sur de España). Los clones se obtuvieron a partir de una única célula vegetativa aislada de las muestras mediante un micromanipulador-microinyector
25 comercial de los disponibles en el mercado (Zeiss-Eppendorf). Las cepas crecieron en frascos de cultivo (Greiner, Bio-One Inc. Longwood, NJ, USA) que contenían 30 mililitros de solución BG-11 como la descrita por Rippka *et al.* (1979. *Gen. Microbiol.* 111: 1-61), a 20 grados centígrados y 120 micromoles de fotones por metro cuadrado y Segundo producidos por tubos
30 de luz blanca funcionando en ciclos continuos. Los clones se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial mediante transferencia a medio fresco cada 15 días. La ausencia de bacterias se monitorizó periódicamente mediante

epifluorescencia y tinción con naranja de acridina, y observación al microscopio.

La producción de microcistina de las distintas cepas se midió mediante un test específico ELISA de los disponibles comercialmente siguiendo las indicaciones del fabricante (Enviro Gard Microcystin Quantitube Test Kit; Strategic Diagnostic, Newark, N.J., USA). Se realizaron medidas adicionales de certificación de los resultados utilizando un test comercial (Microcystest) basado en inhibición de fosfatasas según las indicaciones del fabricante (ZEU-Immunotech, Zaragoza, España).

- 5 indicaciones del fabricante (Enviro Gard Microcystin Quantitube Test Kit; Strategic Diagnostic, Newark, N.J., USA). Se realizaron medidas adicionales de certificación de los resultados utilizando un test comercial (Microcystest) basado en inhibición de fosfatasas según las indicaciones del fabricante (ZEU-Immunotech, Zaragoza, España).
- 10 A partir de muestras de los clones que se mantenían en fase de crecimiento exponencial se tomaron alícuotas que contenían 100.000 ± 1000 células, que fueron incubadas con la lectinas UEA-I fluorescente durante 1 hora a 20 grados centígrados en oscuridad, y examinadas tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 de la presente memoria.

15

20

Los resultados se indican en la **Tabla 1**

Cepas <i>M. aeruginosa</i>	Lectina UEA-I	Toxina (pg/célula)
1	-	0.33 ± 0.03
2	-	0.31 ± 0.03
3	-	0.28 ± 0.04
4	-	0.17 ± 0.04
5	-	0.16 ± 0.03
6	-	0.15 ± 0.04
7	-	0.12 ± 0.03
8	-	0.11 ± 0.04
9	-	0.10 ± 0.03
10	-	0.09 ± 0.03
11	-	0.09 ± 0.02
12	-	0.07 ± 0.02
13	-	0.07 ± 0.03
14	-	0.06 ± 0.03
15	-	0.05 ± 0.03
16	-	0.04 ± 0.02
17	-	0.04 ± 0.03
18	-	0.02 ± 0.02
19	-	0.02 ± 0.01
20	+	0.00 ± 0.00
21	+	0.00 ± 0.00
22	+	0.00 ± 0.00
23	+	0.00 ± 0.00
24	+	0.00 ± 0.00
25	+	0.00 ± 0.00
26	+	0.00 ± 0.00
27	+	0.00 ± 0.00
28	+	0.00 ± 0.00
29	+	0.00 ± 0.00

REIVINDICACIONES

- 1) Kit para el reconocimiento y discriminación de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina que comprende:
 - a) lectina UEA-I,
 - b) una sonda específica de la unión de la lectina UEA-I a la glicoproteína diana de dicha lectina UEA-I,
 - c) medios para poner en contacto una muestra con dicha lectina UEA-I.
- 2) Kit según la reivindicación 1 en el que la sonda es fluorescente.
- 3) Kit según la reivindicación 2 en el que la sonda es Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).
- 4) Kit según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los medios para poner en contacto la muestra con la lectina UEA-I comprenden un recipiente y una solución PBS.
- 5) Kit según la reivindicación 4 caracterizado porque el recipiente es un tubo de ensayo, un microtubo, un microtubo del tipo Eppendorf, o uno, o varios pocillos de una placa multipocillos.
- 6) Kit según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración de lectina UEA-I se encuentra entre 1 y 1000 microgramos de lectina por mililitro de solución que contiene la muestra.
- 7) Kit según la reivindicación 6, caracterizado porque la concentración de lectina UEA-I se encuentra entre 50 y 500 microgramos de lectina por mililitro de solución que contiene la muestra.
- 8) Kit según la reivindicación 7, caracterizado porque la concentración de lectina UEA-I se encuentra entre 95 y 105 microgramos de lectina por mililitro de solución que contiene la muestra.
- 9) Método para el reconocimiento y discriminación de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* productoras de microcistina y cepas de *M. aeruginosa* no productoras de microcistina que comprende:
 - a) poner en contacto una muestra con la lectina UEA-I y con una sonda específica de dicha lectina UEA-I

b) detectar la señal emitida por dicha sonda, o la ausencia de señal.

10) Método según la reivindicación 9, caracterizado porque la concentración de lectina UEA-I se encuentra entre 1 y 1000 microgramos de lectina por
5 mililitro de solución que contiene la muestra.

11) Método según la reivindicación 10, caracterizado porque la concentración de lectina UEA-I se encuentra entre 50 y 500 microgramos de lectina por mililitro de solución que contiene la muestra.

12) Método según la reivindicación 10 caracterizado porque la concentración
10 de lectina UEA-I se encuentra entre 95 y 105 microgramos de lectina por mililitro de solución que contiene la muestra.

13) Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque la sonda específica de la lectina UEA-I es fluorescente.

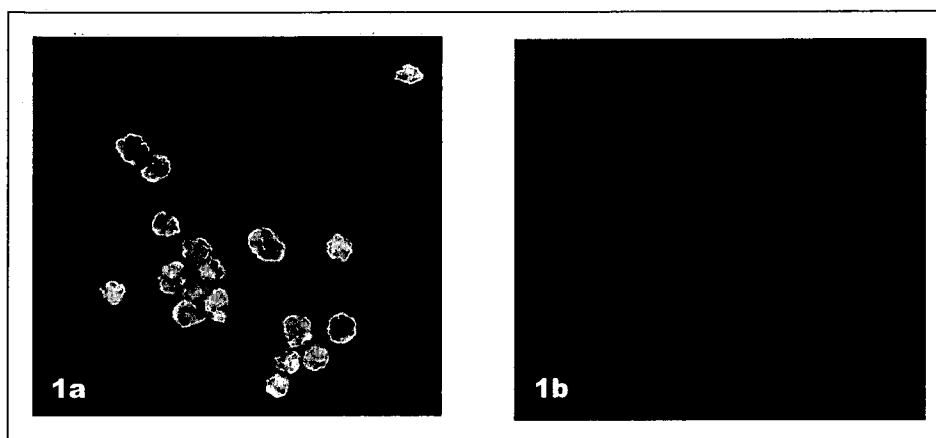
14) Método según la reivindicación 13, caracterizado porque la sonda
15 específica de la lectina UEA-I es Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).

15) Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizado porque los medios para poner en contacto la muestra con la lectina UEA-I comprenden un recipiente y una solución PBS.

16) Método según la reivindicación 15, caracterizado porque el recipiente es
20 un tubo de ensayo, un microtubo, un microtubo del tipo Eppendorf, o uno, o varios pocillos de una placa multipocillos.

17) Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, que incluye una etapa de homogeneización y acondicionamiento de la muestra, previa a poner en contacto dicha muestra con la lectina UEA-I y con una sonda específica de
25 dicha lectina UEA-I, comprendiendo dicha etapa de homogeneización y acondicionamiento la centrifugación de la muestra y su resuspensión en una solución PBS.

Figura 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/000244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C07K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RHODES L., HAYWOOD A. J., FOUNTAIN D. W. "FITC-conjugated lectins as a tool for differentiating between toxic and non-toxic marine dinoflagellates." New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research (1995) Vol. 29, pages 359-365. Pages 359-360, 363 and tables 2 and 3.	1-17
A	HOU j., HUANG, B., HU, J., LIN L., HONG H. "Fourteen FITC-conjugated lectins as a tool for the recognition and differentiation of some harmful algae in Chinese coastal waters." J. Appl. Phycol. (2008) Vol. 20, pages 35-46. Pages 36, 41-42, table 2.	1-17
A	LÓPEZ-RODAS V., COSTAS E. "Characterization of morphospecies and strains of Microcystis (Cyanobacteria) from natural populations and laboratory clones using cell probes (lectins and antibodies). " Journal of Phycology (1997) Vol. 33, pages 446-454. Pages 446-447, abstract and table 1.	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 September 2010 (06.09.2010)

Date of mailing of the international search report

(05/10/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Jesús García Bueno

Telephone No. +34 91 349 70 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/000244

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/12 (2006.01)

C07K 14/42 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2010/000244

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N, C07K, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	RHODES L., HAYWOOD A. J., FOUNTAIN D. W. "FITC-conjugated lectins as a tool for differentiating between toxic and non-toxic marine dinoflagellates." New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research (1995) Vol. 29, pages 359-365. Páginas 359-360, 363 y tablas 2 y 3.	1-17
A	HOU j., HUANG, B., HU, J., LIN L., HONG H. "Fourteen FITC-conjugated lectins as a tool for the recognition and differentiation of some harmful algae in Chinese coastal waters." J. Appl. Phycol. (2008) Vol. 20, pages 35-46. Páginas 36, 41-42, tabla 2.	1-17
A	LÓPEZ-RODAS V., COSTAS E. "Characterization of morphospecies and strains of Microcystis (Cyanobacteria) from natural populations and laboratory clones using cell probes (lectins and antibodies). " Journal of Phycology (1997) Vol. 33, pages 446-454. Páginas 446-447, resumen y tabla 1.	1-17

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

06 Septiembre 2010 (06.09.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

05-OCTUBRE-2010 (05/10/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Jesús García Bueno

N° de teléfono +34 91 349 70 00

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2010/000244

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/12 (2006.01)

C07K 14/42 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)