



Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

PCT

EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE N°

03-38031

54. TÍTULO Proceso Para La Tipificación Rápida De  
MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS  
EMPLEADO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12Q 1/68

71. SOLICITANTE CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS (CNIC)

DOMICILIO Ave. 25 No. 15202 esq. a 158, Cubanacán, Playa,  
Ciudad de LA Habana 12100- CUBA

74. APODERADO DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTÁ, D. C. 07 MAYO 2003

QF

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I

☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC)

Dirección: Ave. 25 No. 15202 esq a 158,  
Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana  
12100, CUBA

Nacionalidad o Domicilio: CUBA

Lugar de Constitución: CUBA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE  
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CARRERA 9 No. 93-09

Teléfono: 610 74 80 Fax: 610 07 06

E-mail: [acastell@impeat.net.co](mailto:acastell@impeat.net.co)

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número 38'779.654 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: (VER ANEXO No. 1)

Dirección:

Nacionalidad o Domicilio (VER ANEXO No. 1)

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/CU01/00008

Fecha 2/11/01

Publicación Internacional No. WO 02/38802

Fecha 16/06/2002

⑥

Título (64)

PROCESO PARA LA TIPIFICACION RAPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADO

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12Q 1/68

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

CU

7/11/00

0247/2000

⑨

Comprobante de pago No.

03-30.988

Fecha

Mayo 6, 2003

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

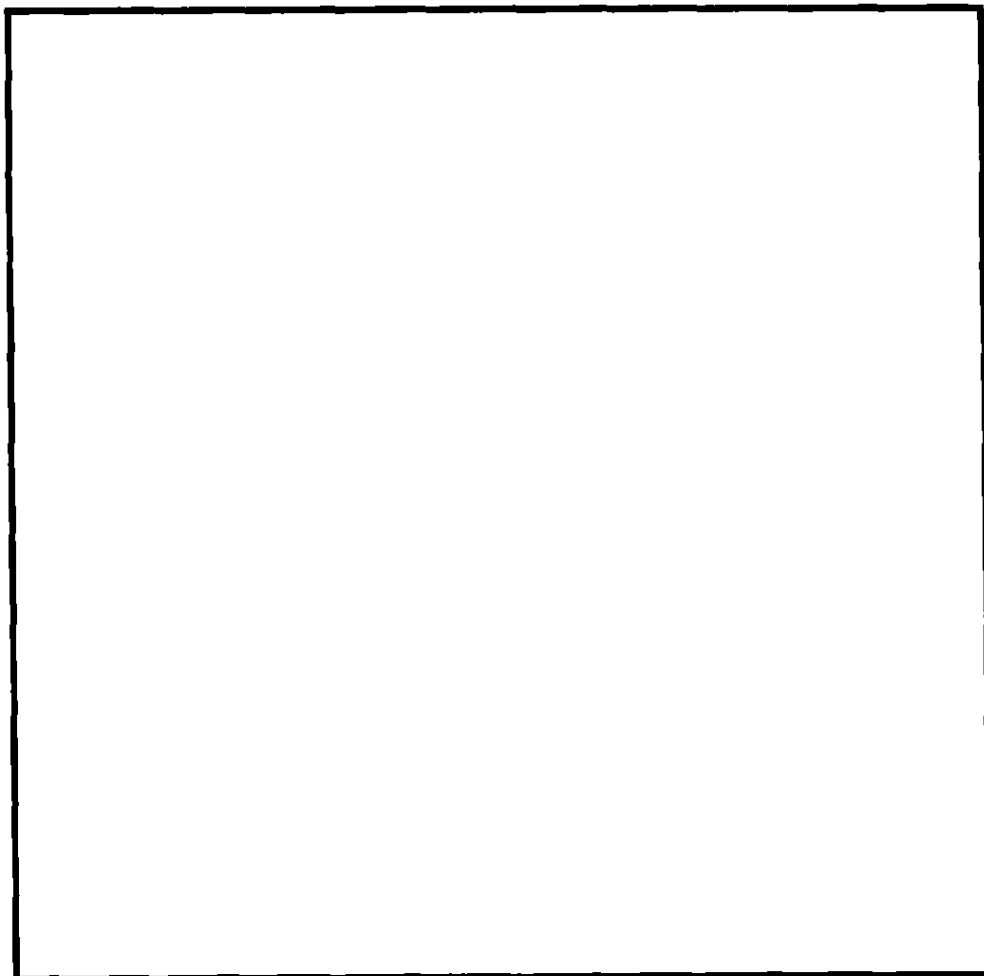
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, el fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA: Margarita Castellanos  
C.C. No. 39.779.854 Uruquén - TPA 70.819 C.B.J.

07 MAYO 2003

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.  
A B O G A D O S  
Carrera 9 No. 83-09  
Apartado 6348  
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

**ANEXO No. 1**

**INVENTORES**

**NOMBRE**

**DOMICILIO**

**1.- LILIA LOPEZ CANOVAS**

Calle 21 A No. 20814 entre 208a y 214, Atabey,  
Playa, Ciudad de la Habana 12100, CUBA

**2. ANA MARIA RIVERON ROJAS**

Calle 21 A No. 20814 entre 208a y 214, Atabey,  
Playa, Ciudad de la Habana 12100, CUBA

**3. DAVID HIGGISON CLARKE**

Calle 176 Edif. BB-3 entre 1ra y 5ta, Rto. Flores,  
Playa, Ciudad de la Habana 12100, CUBA

**4. AXEL SANCHEZ ALONSO**

Calle 23a entre 230 y 234 Apto. 52, La Lisa,  
Ciudad de la Habana 13600, CUBA

**5. ESTHER OROZCO OROZCO**

Via Ceti No. 20, Fracc. Luis Enrique Erro, Plane-  
tario Lindavista, México, D.F. 07000, MEXICO

**6. OSCAR ARENCIBIA DIAZ**

Calle 174 Edif. BBE -1, Apto 8, Rto. Flores, Playa,  
Ciudad de la Habana 12100, CUBA

**7. Ma. CONCEPCION ARIOSACUÑA**

Calle E No. 658 Apto. 204 entre 27 y 29, Plaza de  
la Revolución, Ciudad de la Habana 10400, CUBA

**8. HILDA TERESA CLARK DONDERIZ**

Calle 25 No. 868 Apto. 1 entre A y B, Plaza de la  
Revolución, Ciudad de la Habana 10400, CUBA

**9. REGNAR GIGATO PEREZ**

Calle 208 A No. 1922 entre 19 y 21, Atabey, Playa,  
Ciudad de la Habana 12100, CUBA

4

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO  
Radicación : 02030031 00000000 Folios: 70  
Fecha (AND): 2003-05-07 15:00:20  
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC  
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 30,996  
FECHA : MAYO 6 DE 2003

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE     | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|-----------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|--------------|
| TERESA ESPINOSA | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 030-00110-6 | 6514233  | 06/05/2003 | 4,372,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. CONTABILITICO       | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 400,000.00     |
|                           | TOTAL :                             | \$ 400,000.00  |

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

A

5  
ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.  
ABOGADOS  
Carrera 9 No. 93-09  
Apartado 8349  
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Signos Distintivos

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

Ref.: PODER conferido por la sociedad CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC)

Yo, XIMENA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, el poder que me confirió el CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC), con domicilio en La Habana, CUBA.----- debidamente legalizado por el Ministerio de Relaciones Exteriores bajo el No. 163355 el día Julio 21, 1998 , con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de patente PCT en Fase Nacional, para: "PROCESO PARA LA TIPIFICACION RAPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADO"

Del Señor Jefe,

Acepto

  
Ximena Castellanos Abondano  
C.C. No. 39.773.330 de Usaquén  
T.P.A. No. 58.236 del C.S.J.  
Carrera 9 No. 93-09 - Bogotá, D.C.  
Teléfonos: 8107420 - 8107480

  
Margarita Castellanos Abondano  
C.C. No. 39.779.654 de Usaquén  
T.P.A. No. 70.819 del C.S.J.  
Carrera 9 No. 93-09 - Bogotá, D.C.  
Teléfonos: 8107420 - 8107480

Bogotá, D.C.  
XCA/MCA

ef

**AUTENTICACIÓN DE FIRMA  
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**  
(Art. 84 C.R.C. mod. Dec. 2282 de 1989, art. 1 mod. 38)

Ante mi Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo de esta ciudad compareció personalmente:  
~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~  
 identificado con C.C. ~~XXXXXXXXXXXX~~  
 expedida en: ~~XXXXXXXXXX~~ y tarjeta profesional de abogado(a) No. ~~XXXXXX~~ del Consejo Superior de la Judicatura, con documento dirigido a: ~~XXXXXXXXXXXX~~ y dentro que la firma puesta en el documento es suya.

*[Firma manuscrita]*

En Bogotá D.C. a ~~13 de mayo de 2000~~  
 AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

don

industria y comercio

**AUTENTICACIÓN DE FIRMA  
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**  
(Art. 84 C.R.C. mod. Dec. 2282 de 1989, art. 1 mod. 38)

Ante mi Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo de esta ciudad compareció personalmente:  
~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~  
 identificado con C.C. ~~XXXXXXXXXXXX~~  
 expedida en: ~~XXXXXXXXXX~~ y tarjeta profesional de abogado(a) No. ~~XXXXXX~~ del Consejo Superior de la Judicatura, con documento dirigido a: ~~XXXXXXXXXXXX~~ y dentro que la firma puesta en el documento es suya.

*[Firma manuscrita]*

En Bogotá D.C. a ~~13 de mayo de 2000~~  
 AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

adon

industria y comercio



**PODER**

El (los) suscrito (s) Dr. Carlos Gutierrez Calzado,  
Director del CENTRO NACIONAL DE INVESTIGA  
CIONES CIENTIFICAS (CHIC).

domiciliado (s) en Ave. 25 No. 15819, Cubanacán,  
Playa, C. Habana 12100, Cuba.

nombra por el presente a Ximena Castellanos A. y/o  
Margarita Castellanos A. abogadas con oficinas en la Carrera 9ª  
No. 93-09, Bogotá - COLOMBIA para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y  
con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos  
representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órde-  
nes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo  
relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industria-  
les; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas  
y de denominaciones de origen; depósito de nombres y enseñas  
comerciales; su renovación prórroga, inscripción de traspaso y  
cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro  
de licencia de uso de esos derechos; b) acciones de oposición,  
cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios  
civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que  
promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y  
gestiones arriba determinados sustituir éste mandato, transgrr,  
desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nom-  
brar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy 05 de Mayo de 1998

en Ciudad de La Habana

Por Dr. Carlos Gutierrez Calzado  
Director

(Notary should execute on other side)  
(Consular legalization necessary)

LEGALIZA---

**POWER OF ATTORNEY**

I (we) the undersigned \_\_\_\_\_

of \_\_\_\_\_

hereby grant(s) Power of Attorney to Ximena Castellanos A. y/o  
Margarita Castellanos A. attorneys residing at Carrera 9ª  
No. 93-09 Bogotá - COLOMBIA to

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for wick  
purpose we authorize the said attorneys to represent us before any  
authorities or persons, specially those, administrative, administrative  
contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of  
trademarks, service, collective and defensive marks, and of  
designations of origin; the deposit of commercial names and ensigns;  
its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or  
domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of  
use of the above rights; b) Actions opposition, cancellation, nullity,  
infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal an  
administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted  
by us or against us; and that in all the above matters they may  
substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel,  
receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact  
in or out of Court.

Given and signed this \_\_\_\_\_

In \_\_\_\_\_

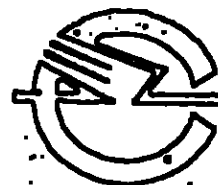
By \_\_\_\_\_

(Notary should execute on other side)  
(Consular legalization necessary)



CAMARA DE COMERCIO DE LA REPUBLICA DE CUBA

21 Ma. 441 Vedado, La Habana (4) Cuba-Cable: Comercio-Apertura 376- Teléfono: 36-3134-37-38  
Fax: 333642 Télex: 31 1732 CAMAR - CU



7

-----CION-----

LIC. SARA MARTA DIAZ RODRIGUEZ, Directora Jurídica de la Cámara de Comercio de la República de Cuba y funcionario autorizado para certificar autenticaciones de firmas. -----

CERTIFICO: Que la firma que antecede, al parecer es auténtica del funcionario autorizante de este documento por la semejanza que guarda con la que obra registrada en esta Institución como la que el mismo acostumbra a usar en sus actos oficiales. -----

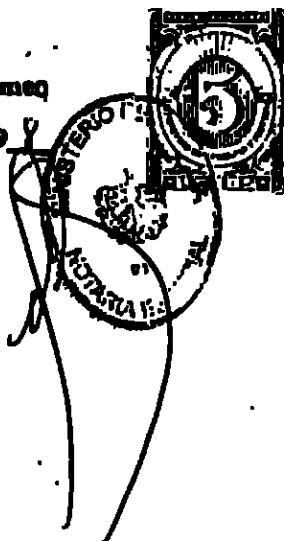
En fe de lo cual autorizo la presente con mi firma y el sello de esta Institución. -----

Ciudad de La Habana, Mayo 26, 1998.

LIC. Carmen Alicia Paredes  
Notario de la Notaría Especial a cargo  
de la Dirección de Registro y Notarías  
del Minist. de Justicia de la República  
de Cuba. . . . .

DY Y P. Que la(n) firma(s) que  
antecede(n) me(s) autoriza(n) por la  
semejanza que guarda con la misma  
que acostumbra(n) a usar en todos sus  
actos.

La Habana, a los 29 días del mes  
de mayo de 1998



REPÚBLICA DE CUBA  
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES  
DIRECCIÓN JURÍDICA

José D. Porras Clapera, Aníbal P. Álvarez Durr  
Armando P. Acosta Paz, Aníbal Silvia Fernández  
Villar, Aníbal de Pío Páez, Aníbal  
Capas Kula, Aníbal Fernández Ponce. Funciona-  
rios autorizados para certificar Autenticaciones  
de firma en Documentos expedidos para nortea-  
mericas en el extranjero.

CERTIFICO: QUE AL PARECER ES AUTÉNTICA DEL  
FUNCIONARIO AUTORIZANTE DE ESTE DOCUMENTO,  
LA FIRMA QUE ANTECEDE, POR LA SEMEJANZA QUE  
GUARDA CON LA QUE OBRA REGISTRADA EN ESTE  
CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A  
USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA PRESENTE CON LA  
FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

LA HABANA 02 JUN 1998



7



## Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

No. 37/98

La Habana, Julio 10 de 1998

La suscrita Cónsul General de Colombia, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

Que la Señora María Silvia Fernández Villar, quien como funcionario de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; que el CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS - CNIC- es una empresa constituida de acuerdo con las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; que el Señor Carlos Gutiérrez Calzado, quien en su carácter de Director de la citada empresa confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

La Cónsul General de Colombia no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.



*Martha N. de Stand*  
Martha Nifio de Stand  
Consul General

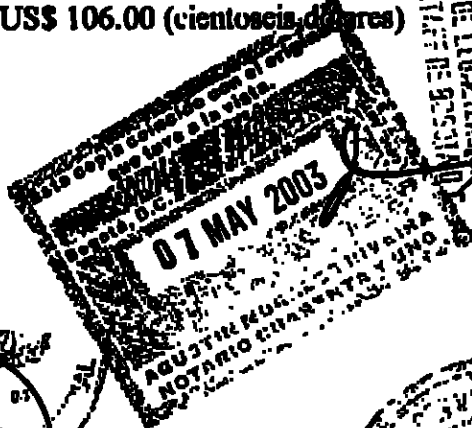
MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES  
153355  
CUMPLIDA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPLEA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

### PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL  
DERECHOS FONDO ROTATORIO  
TOTAL PAGADO

US\$ 6.00 (seis dólares)  
US\$ 100.00 (cien dólares)  
US\$ 106.00 (cientos seis dólares)

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO  
99 JUL 21 11 27  
Jefe de Legación  
Ministerio de Relaciones  
Exteriores



## DESCRIPCIÓN

**TÍTULO DE LA INVENCION: PROCESO PARA LA TIPIFICACIÓN RÁPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADO.**

5

**ÍNDICE DE LA CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE PATENTES: C12N 1/00**

**CAMPO O RAMA DE LA TÉCNICA CON LA QUE SE RELACIONA LA INVENCION:** La presente invención se relaciona con la Rama de la Biología Molecular y en particular provee un proceso, que incluye la utilización de métodos y procedimientos, y de un juego de reactivos para la tipificación rápida de microorganismos. Los microorganismos pueden ser levaduras, parásitos y bacterias gram positivas o negativas y para su tipificación se utilizan miniequipos de electroforesis de campos pulsantes de tipo CHEF y TAFE.

10

**15 NIVEL CONOCIDO DE LA TÉCNICA. CARACTERÍSTICAS DE LAS SOLUCIONES TÉCNICAS ANÁLOGAS.**

Durante los últimos años se han incrementado las enfermedades infecciosas y han aparecido numerosos microorganismos multiresistentes a drogas (Acar J. y Courvalet P. pp 50-53; Aubry-Damon H. y Andreuot A., pp 54-55; Trelu-Cout P. y Poyart C., pp 62-66, en 'La Recherche', vol 314, 1998).

20

La aparición de brotes infecciosos ha generado la necesidad de tipificar los microorganismos causantes de las infecciones. La tipificación es el proceso mediante el cual las diferentes especies de microorganismos de un género dado se clasifican en subgrupos o subtipos diferentes (Busch U., Nitschko H., J. Chromatogr. B, 1999, 722: 263-278). La tipificación es epidemiológicamente importante para conocer el brote infeccioso, determinar el flujo o traspaso de los patógenos nosocomiales dentro de los centros de salud y la fuente de la infección. También es útil para reconocer nuevas cepas virulentas y monitorear programas de vacunación.

25

Para que un proceso de tipificación sea considerado adecuado debe cumplir con los siguientes criterios (Maslow J.N., et al., Clin. Infect. Dis., 1993, 17:163-164):

1- Que brinde resultados no ambiguos para cada aislado que se analice.

2- Que brinde resultados reproducibles.

5 3- Que dentro de una misma especie diferencie las cepas no relacionadas.

Existen varias formas de tipificar microorganismos. Algunas de ellas se basan en métodos que analizan caracteres fenotípicos (métodos fenotípicos) y otras en el análisis de caracteres genotípicos (métodos genotípicos). Los métodos fenotípicos detectan las características que son expresadas por los microorganismos, mientras que los genotípicos se basan en evidenciar las diferencias entre las dotaciones genéticas de los microorganismos. Por eso, los métodos fenotípicos tienen la desventaja de que proveen una medida indirecta de los cambios en la dotación genética, lo que no ocurre con los métodos genotípicos.

Uno de los métodos genotípicos de tipificación que más se ha empleado es la Electroforesis de Campos Pulsantes (ECP). Este método se considera el *standard* de oro de los métodos de tipificación molecular del genoma de microorganismos. La tipificación mediante ECP se realiza separando en geles las moléculas de ADN que son sometidas a la acción de pulsos eléctricos en dos direcciones diferentes. Los patrones de bandas que se obtienen después de la electroforesis de muestras de ADN procedentes de aislados de un microorganismo cualquiera caracterizan inequívocamente su dotación genética y son altamente reproducibles y discriminatorios (Oliver DM, Bean P., J. Clin. Microbiol., 1999, 37:6, 1661-1669). Además, en un sólo gel pueden compararse los genomas completos de numerosos aislados. Se ha reportado que la ECP es el método óptimo de tipificación (Maslow J. N., Mulligan M.E., Arbeit R.D., Clin. Infect. Dis., 1993, 17: 163-164; Busch U, Nitschko H., J. Chromatogr. B., 1999, 722: 263-278). Los resultados que brinda la ECP dependen de las condiciones que se aplican en el equipo y del género y especie del microorganismo que se está estudiando.

Así,

a) Cuando el microorganismo posee varios cromosomas lineales inferiores a 10 Mb (1 megabase = 1000000 de pares de bases) se obtiene el patrón de bandas de sus cromosomas, el que se denomina cariotipo electroforético. Por ejemplo, los microorganismos pueden ser hongos levaduriformes, parásitos unicelulares, etc.

5 b) Cuando el microorganismo posee un cromosoma circular grande se obtienen los patrones de bandas de los macrofragmentos de restricción de dicho ADN circular. Estos patrones se denominan pulsotipos ya que son obtenidos en condiciones experimentales determinadas. Por ejemplo, los microorganismos pueden ser bacterias tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, etc.

10 La comparación de los cariotipos de las diferentes cepas permite su caracterización y diferenciación. De igual forma, ocurre con los fragmentos de restricción de ADN bacteriano. Así, tanto los cariotipos moleculares como los pulsotipos son utilizados en el estudio comparativo de hongos, bacterias y parásitos. El incremento de las aplicaciones prácticas de la electroforesis de campos pulsantes en la microbiología médica, entre otras, ha generado no solo la necesidad de

15 mejorar los métodos de preparación de muestras, sino de diseñar *a priori* las condiciones de corrida que separan adecuadamente las moléculas y de disponer de mejores métodos para analizar los patrones electroforéticos resultantes.

En general, el proceso de tipificación de microorganismos mediante ECP incluye los siguientes pasos y procedimientos:

- 20 1) Preparar las muestras: Crecer los microorganismos en medio nutriente, inmovilizar las células en algún gel y obtener ADN intactos, desproteinizados e inmovilizados.
- 2) Diseñar las corridas electroforéticas: Seleccionar las condiciones experimentales que deben aplicarse en los equipos de ECP para obtener una separación óptima entre las moléculas.
- 25 3) Depositar las muestras en los geles y efectuar la electroforesis de campos pulsantes para separar las moléculas de ADN.
- 4) Analizar los patrones de bandas que se obtienen y comparar los resultados que brindan diferentes aislados de microorganismos.

A continuación se analizan los equipos y procedimientos empleados actualmente en la tipificación de microorganismos mediante ECP.

*La electroforesis de campos pulsantes.*

- 5 La electroforesis de campos pulsantes (ECP) data de 1984, cuando Schwartz y Cantor (Schwartz D.C. y Cantor C.R., Cell, 1984, 37, pp 67-75; U.S Patente, No. 4,473,452 de Septiembre 25 de 1984) observaron que las grandes moléculas intactas de ADN se resolvían en los geles de agarosa en patrones de bandas mediante la aplicación de pulsos eléctricos que alternaban periódicamente su dirección de aplicación.
- 10 Los autores también determinaron que la separación de las moléculas dependía esencialmente de la duración de los pulsos eléctricos. Con posterioridad, se determinó que la geometría de las líneas de fuerza de los campos eléctricos alternantes, la intensidad de los mismos, la temperatura experimental, la fuerza iónica del tampón, la concentración del gel de agarosa y el grosor de los bloques de agarosa donde se inmovilizan las muestras eran factores importantes
- 15 que influyen en la resolución que podía ser alcanzada entre dichas moléculas (Birren B. y Lai E., Pulsed Field Gel Electrophoresis: a practical guide. P. 10. Academic Press, Inc., San Diego, California, 1993, pp 107, 111, 129, 131, 135; López-Cánovas et al., J. Chromatogr. A, 1998, 806, pp 123-139; López-Cánovas et al., J. Chromatogr. A, 1998, 806, pp 187-197).
- 20 Se han desarrollado varios sistemas para realizar ECP que poseen cámaras con diferentes ordenamientos de electrodos. Entre ellas se encuentran las cámaras con ordenamiento de electrodos OFAGE (del inglés, 'Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis', Carle C.F. y Olson M.V., Nucleic Acids Res., 1984, vol. 12, pp 5647-5664), CHEF ('Contour Clamped Homogeneous Electric Field', Chu G. Science, 1986, 234, p 1532), TAFE ('Transversal Alternating Field Electrophoresis', U.S Patent. No 4, 740, 283 de abril 26 de 1988) y FIGE
- 25 ('Field Inversion Gel Electrophoresis', U.S Patent No 4, 737,251, Abril 12 de 1988) y las minicámaras MiniTAFE y MiniCHEF (Riverón AM et al., Anal. Lett., 1995, vol. 28, pp1973-1991; European Patent Aplicación EP 0 745 844, Bula. 1996/49; US Patent Application 08/688,607, 1995; Patente cubana RPI Nro. 02/95, 1995).

*Los sistemas comúnmente empleados para tipificar microorganismos mediante ECP.*

Los sistemas mas utilizados para tipificar y estudiar el genoma de microorganismos son el CHEF y el TAFE, ya que en ellos se obtienen patrones rectos en cualquier carrilera del gel, lo que permite comparar los resultados de una corrida y entre corridas electroforéticas diferentes.

En el sistema CHEF los electrodos se disponen de forma hexagonal alrededor del gel y en cada uno de ellos se imponen voltajes que garantizan que el campo eléctrico sea homogéneo a todo lo largo y ancho del gel. Esto último es lo que permite la obtención de migraciones rectas y reproducibles en cualquier carrilera del gel. Las cubetas CHEF emplean geles submarinos de hasta 21 x 14 cm (ancho x largo) colocados horizontalmente y poseen una distancia entre los pares de electrodos opuestos de 33.5 cm (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673, BioRad, pp 11, 1995). Como se mencionó, el sistema CHEF ha sido ampliamente empleado para tipificar microorganismos. Por ejemplo: bacterias (Beverly, S., *Anal. Biochem.*, 1989, 177, pp 110-114; Dingwall A. y Shapiro L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, 86, pp 119-123; Ferdows M.S. y Barbour A.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, 86, pp 5960-5973; Kohara Y., Aklyma K., Isono K., *Cell* 50.1987, pp 495-508; Ohki M., Smith C.L., *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17, pp 3479-3490; Schoenline P.V., Gallman L.M., Ely B., *Gene*, 1989, 70 pp 321-329; Ventra L., Weiss A.S., *Gene*, 1989, 78 pp 29-36), *Pseudomonas* (Bautsch W., Grothues D. y Tummier B., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1988, 52, 255-258; Romling U. y Tummier B., *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38,1, pp 464-465), *S. cerevisiae* (Albig W. y Entian K-D. *Gene*, 1988, 73, pp 141-152; Zerva L, et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34:12, 3031-3034), *E. histolytica* (Petter R. et al., *Infect. Immun.*, 1993, 61:8: 3574-3577), *S. pneumoniae* (McEllistrem MC. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38:1, 351-353), *S. aureus* (Wichelhaus T.A. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37:3, 690-693), *M. tuberculosis* (Singh S.P. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37:6, 1927-1931), *P. haemolytica* (Kodjo A. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37:2, 380-385), etc.

Debido a sus grandes dimensiones, las cubetas CHEF requieren gran volumen de solución tampón para cubrir su plataforma de electrodos, por lo que la intensidad de la corriente eléctrica puede llegar a alcanzar valores elevados aún empleando campos eléctricos que sean poco intensos, por lo que es necesario emplear fuentes de poder de elevada potencia de salida.

- 5 Además, por las razones anteriores se genera gran cantidad de calor en esas cubetas, lo que impide que se reduzca la duración de la electroforesis a expensas de incrementar el campo eléctrico. Se conoce que el CHEF necesita al menos 20 horas de electroforesis para separar los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* (moléculas menores de 1.6 Mb. 1 Mb =  $10^6$  pares de bases) en un patrón de 11 bandas y para tipificar diferentes cepas de esta levadura (Zerva L, et al., J. Clin. Microbiol., 1996, 34:12, 3031-3034). También es lento para separar los macrofragmentos de restricción de las moléculas de ADN bacteriano, pues necesita mas de 20 horas de electroforesis (van Belkum A et al., J. Clin. Microbiol. 1998, 36:6: 1653-1659; Marchadín H. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 2000, 44:1:213-216; Romling U y Tummier B., J. Clin. Microbiol., 2000, 38:1: 464-465). Lo mismo ocurre cuando se estudian
- 10 parásitos tales como *Entamoeba histolytica*, que se necesitan mas de 24 horas (Petter R. et al., Infect. Immun., 1993, 61:8: 3574-3577).

La ventaja de los equipos CHEF que se han empleado hasta el momento es que permiten analizar hasta 40 muestras a la vez, lo que facilita el análisis comparativo de los patrones electroforéticos que brindan las muestras de numerosos aislados.

- 20 El sistema TAFE fue propuesto por Gardiner K.J., Laas W y Patterson D. en su publicación en *Somatic Cell Mol. Genet.*, 1986, 12, pp 185. Denominaron inicialmente ese sistema como "Vertical Pulsed Field Electrophoresis" (VPFE) y desarrollaron un aparato que fue protegido por la patente U.S. Patent, No 4, 740, 283 de abril 26 de 1988.

- 25 En este sistema se ubican dos pares de electrodos paralelos a ambas caras de un gel submarino (10 cm de longitud x 7.6 cm de ancho x 0.64 cm de espesor) que es colocado verticalmente. Esa disposición de electrodos genera líneas de fuerza del campo eléctrico que atraviesan transversalmente el gel, y fuerzan a las moléculas a migrar durante cada pulso a través del grosor del gel. En esta configuración las moléculas de igual tamaño recorren

distancias similares durante la electroforesis y migran siguiendo trayectorias rectas hasta la misma altura en el gel, con independencia del pocillo en el cual fueron depositadas las muestras. Esta es una de las ventajas de este sistema para la tipificación, ya que permite comparar las migraciones de los ADN que están contenidos en diferentes muestras.

5           Basado en esos principios, la Beckman Instrument, Inc. (Beckman, *The Geneline System Instruction Manual*, ed. Spinco Division of Beckman Instruments, 1988) construyó el equipo denominado "Geneline I, o Transverse Alternating Field Electrophoresis System" conocido como TAFE. Este sistema emplea un gel de 11 cm de longitud, 7.2 cm de ancho y 0.6 cm de espesor, y el gel admite hasta 20 muestras. Sin embargo, el TAFE también requiere de  
10           mucha solución tampón (3.5 Litros), muestra biológica y más de 20 horas para resolver los cromosomas y ADN amibiano (Baez-Camargo M., et al., *Mol. Gen.*, 1996, *Genet.* 253: 289-296). Por tanto, posee las mismas desventajas de los equipos CHEF actuales.

Así, en los equipos comerciales de ECP que más se han empleado para caracterizar el genoma de los microorganismos y parásitos se requiere mucho tiempo, reactivos y muestras biológicas  
15           para resolver las grandes moléculas de ADN en un patrón de bandas.

También se ha empleado el FIGE para tipificar bacterias de manera rápida (Goering RV y Winters MA., *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30:3,577-580; Grothues D. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26:10, 1973-1977). Sin embargo, en el FIGE se ha descrito el fenómeno de inversión de la movilidad electroforética lo cual impide una estimación correcta de tallas y la comparación de  
20           los patrones de numerosas muestras. Una de las características de dicha inversión es la imposibilidad de predecir cuando ocurrirá (Birren B. y Lal E. *Pulsed Field Gel Electrophoresis: a practical guide*, P. 10, Academic Press, Inc. San Diego, California. 1993, pp10). Por eso, la principal desventaja de la inversión de la movilidad es la imposibilidad de identificar sin ambigüedades las moléculas de una banda dada. Siempre se introducen  
25           dudas en la identificación de las moléculas, salvo que se hibridara el gel con sondas específicas de cada molécula, lo que encarecería notablemente el proceso de tipificación y consumiría mucho tiempo.

Si en los equipos CHEF actuales GeneNavigator (Amersham-Pharmacia-LKB, Pharmacia Molecular and Cell Biology Catalogue, Pulsed Field Gel Electrophoresis, Nucleic Acids Electrophoresis. 1998, pp 77-79), CHEF DRII, CHEF Mapper, (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad, pp. 11, 1995) se intentara reducir el tiempo de electroforesis mediante el incremento de la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de polaridad opuesta se puede alcanzar el límite de potencia máxima de salida de la fuente de poder y del sistema de enfriamiento. Por eso, los fabricantes recomiendan que el campo eléctrico máximo que puede aplicarse en dichos equipos es 9 V/cm (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide . Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad, pp. 2, 1995), lo que impide que se reduzca la duración de las electroforesis mediante incrementos de la intensidad del campo eléctrico. Un hecho similar ocurre con los equipos TAFE actuales.

#### 15 *Los miniequipos de ECP*

En 1995 se reportaron los equipos de miniECP, de las versiones miniTAFE y miniCHEF (Riverón AM et al., Anal. Lett., 1995, vol. 28, pp1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49; US Patent Application 08/698,607, 1995; Patente cubana RPI Nro. 02/95, 1995) en los que se resolvieron la mayoría de las limitaciones de los equipos de ECP enumeradas. En ellos se realiza electroforesis de campos pulsantes en 4 a 8 horas, con 7 muestras depositadas en un minigel de 4 x 4 x 0.5 cm. (largo x ancho x grosor). En los equipos miniCHEF se pueden aplicar campos eléctricos de hasta 16 V/cm lo que brinda en los minigeles una resolución adecuada entre las bandas del patrón electroforético en 2.7 horas. La poca separación de sus electrodos de polaridad opuesta permite la construcción de cubetas pequeñas y el empleo de poco volumen de tampón para cubrir los electrodos. Cuando en los miniCHEF se aplica un voltaje dado, es decir, un cierto valor de intensidad de campo eléctrico 'E', se genera menos calor que el que se generaría si se aplicara el mismo valor de 'E' en los

equipos CHEF que actualmente se comercializan (Riverón AM et al., Anal. Lett., 1995 vol. 28, pp. 1973-1991).

5 En los equipos miniTAFE se pueden aplicar campos eléctricos de hasta 22 V/cm sin que se pierda la resolución entre las bandas del patrón (Riverón AM et al., Anal. Lett., 1995 vol. 28, pp. 1973-1991). Esto permite obtener el cariotipo electroforético de *S. cerevisiae* en 5 horas. En el miniTAFE, como la separación entre los electrodos opuestos es pequeña (7.8 cm) la cámara de electroforesis es también pequeña y usa poco volumen de solución tampón.

10 Sin embargo, cuando en los minigeles se depositan muestras de más de 0.1 cm de grosor se necesita mucho tiempo para lograr una adecuada resolución del patrón electroforético. Además, de acuerdo con reportes anteriores, donde se analizó la influencia del grosor de la muestra sobre el tiempo de electroforesis (López-Cánovas et al., J. Chromatogr. A, 1998, 806, pp. 187-197), debe necesitarse más longitud del gel para lograr obtener dicho patrón en un único gel. Por otro lado, los minigeles reportados solo admiten 7 muestras (miniCHEF) y 13 muestras (miniTAFE), lo que es poca capacidad de análisis para tipificar  
15 aislados de microorganismos en laboratorios clínicos.

A pesar de las ventajas de los miniequipos de ECP sobre los sistemas actualmente existentes, no existe ningún procedimiento o método de tipificación de microorganismos mediante minielectroforesis de campos pulsantes en miniCHEF o miniTAFE. Esto quizás  
20 responda al intento de emplear muestras gruesas, como las que se aplican en los geles convencionales, y a la ausencia de procedimientos, que de forma sencilla, brinden los parámetros de corrida que deben emplearse en dichos miniequipos.

#### *La preparación de ADN inmovilizado*

25 Para la tipificación de microorganismos mediante Electroforesis de Campos Pulsantes, en los equipos actuales o en los miniequipos, es imprescindible disponer de un método de preparación de moléculas intactas de ADN. Esto es necesario pues los métodos conocidos de aislamiento y purificación de ADN en medio líquido provocan rupturas de dichas moléculas (Schwartz DC y Cantor CR, Cell, 1984, 37, pp. 66-75). Schwartz y Cantor sólo excluyeron a las moléculas de

tallas inferiores a 1 Mb ( $10^6$  pares de bases) y propusieron una metodología para preparar muestras de ADN para ECP que consistía en coleccionar las células cultivadas, lavarlas e inmovilizarlas en bloques de agarosa. Después en los bloques se formaban los esferoplastos (cuando existe pared celular), estos se lisaban y los ADN inmovilizados eran posteriormente desproteinizados en presencia de proteinasa K. El método ha sido efectivo para preparar muestras de diferentes géneros, especies y varios orígenes, pero proponía la formación de esferoplastos cuando las células poseían pared. Sin embargo, las enzimas formadoras de protoplastos, al igual que las proteasas, son caras. El procedimiento descrito originalmente requería que las muestras fueran incubadas 2 veces toda la noche, lo que equivale a 32 horas de preparación (US Patente No. 4,473,452 de Septiembre 25 de 1984).

En trabajos mas recientes, Gardner (Gardner DCJ et al., *Yeast*, 1993, 9:1053-1055) demostró que los patrones de bandas de *S. cerevisiae* se obtienen sin necesidad de formar esferoplastos, mientras, Higginson y cols, (Higginson D. et al., *Anal. Lett.*, 1994, 27:7, 1255-1264) demostraron que los ADN de *S. cerevisiae* podían ser desproteinizados reemplazando en la solución de desproteinización a la proteinasa K por urea 8 M. Sin embargo, el método descrito por Gardner sigue siendo caro por la necesidad de emplear proteasas, mientras que el descrito por Higginson es barato, pero consume 72 horas de incubación, el cual es un tiempo muy largo. Con posterioridad, se demostró que las muestras de *S. cerevisiae* podían ser preparadas sin emplear ninguna enzima, pero incubando los bloques 4 h en LETK (10 mM Tris, 500 mM EDTA, 600 mM KCl, pH 7.5), 2 horas en NDS (10 mM Tris, 500 mM EDTA, 1% sarcosyl, pH 9.5) y 4 horas en NDS que contenía urea 4 M (NDSU), lo que rendía un tiempo de 10 h de preparación de muestras (López-Cánovas L, et al., *Anal. Lett.*, 1996, 29:12, 2079-2084). Se han descrito otros métodos rápidos de preparación de muestras de ADN inmovilizado, pero todos emplean enzimas (por ejemplo, en Guldert F y Langridge P, *Biotech.*, 1992, 12:2, 222-223).

En general, se ha considerado que la preparación de ADN inmovilizado para ECP, ya sea proveniente de bacterias, levaduras, etc. requiere la obtención de esferoplastos y la posterior digestión con proteasas (Maule J, *Mol. Biotech.* 1998, 9: 107-126; Ilve DM y Bean P, *JCM*,

1996, 37:6, 1661-1669). Por ejemplo, se propuso que la preparación de muestras de ADN inmovilizado de *Staphylococcus aureus* podía ser realizada en aproximadamente 2 horas, inmovilizando las células con lisostafina e incubando los bloques en soluciones que contenían detergentes, mientras que las muestras de *Streptococcus fecalis* se incubaron con lisozima y mutanolisina previamente a su inmovilización (Goering RV. y Winter MA., J. Clin. Microbiol., 1992, 30:3, 577-580). En este último trabajo, los autores no incubaron las muestras con proteinasa K. Por otro lado, Matushek y cols. (Matushek MG et al., J. Clin. Microbiol., 1996, 34:10, 2598-2600) reportaron que no fueron capaces de obtener patrones de bandas cuando no incubaban sus muestras con proteinasa K. De manera alternativa, propusieron un método rápido de preparación de muestras que empleaba proteinasa K. Recientemente McEllistrem et al. (McEllistrem MC et al., J. Clin. Microbiol., 2000, 38:1, 351-353) reportaron un método totalmente no enzimático para preparar ADN inmovilizado de *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, el mismo consume 6 horas y los autores atribuyeron el éxito del protocolo a que la solución empleada pudo activar una autolisina del *Streptococcus*. En la actualidad, solo en la preparación de ADN intactos de *S. cerevisiae* y del *Streptococcus pneumoniae* se ha logrado eliminar el uso de las enzimas formadoras de esferoplastos y las proteasas, pero esos procedimientos consumen 10 y 6 horas, respectivamente, los cuales son tiempos considerablemente largos. No existe consenso de la factibilidad de eliminar las enzimas formadoras de esferoplastos y de desproteinización del ADN en la preparación de muestras de otros microorganismos. Por tanto, los métodos actuales son caros y consumen largos tiempos. La mayoría de los métodos anteriores parten de la base que las células que poseen pared tienen que ser inmovilizadas previamente a su tratamiento enzimático. La excepción son los trabajos de Goering y Winter (Goering RV y Winter MA, J. Clin. Microbiol., 1992, 30:3, 577-580). Esos autores trataron en medio líquido las células con lisozima y mutanolisina (dos enzimas para formar esferoplastos) antes de su inmovilización. Sin embargo, no existe un método no enzimático para tratar las células que poseen pared con anterioridad a su inmovilización en agarosa. Si este método se lograra desarrollar se dispondría de un procedimiento sencillo y barato.

Existen métodos para extraer ácidos nucleicos en solución partiendo de células calentadas en presencia de agentes permeabilizantes de la pared celular de los microorganismos (European Patent 0,657,530, 1994, bulletin 95/24; US Patent 158940, 1993). El método libera grandes fragmentos de ácidos nucleicos no degradados sin romper físicamente la pared celular de microorganismos gram-positivos y negativos, así como de levaduras. Este método no requiere de enzimas líticas. Sin embargo, al extraerse el ADN en solución no se obtienen moléculas intactas de ADN, por lo que, los autores no consideraron que el método fuera aplicable a la obtención de los cariotipos moleculares de los microorganismos mencionados, ni a la obtención de pulsotipos. Por otro lado, los autores reportan que el ADN obtenido es apropiado para hibridar, pero no mencionan si puede ser empleado para digerirlo con enzimas de restricción. En fin, este método no garantiza la obtención de ADN intacto que sea digerible con enzimas de restricción.

Puede afirmarse que no existe un procedimiento general que permita preparar ADN intacto e inmovilizado de levaduras, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas y parásitos unicelulares mediante el empleo de soluciones que no contengan enzimas y liberen rápidamente del interior de las células a las moléculas intactas de ADN.

Por otro lado, cuando se desean preparar muestras de ADN inmovilizado es necesario disponer de moldes para la formación de las mismas. Esos moldes pueden ser reusables o desechables. Los moldes reusables deben permitir su esterilización por cualquier medio. Esto es importante cuando se trabaja con muestras de microorganismos patógenos.

El molde desechable es más simple, pero genera por parte del usuario una dependencia del fabricante y pudiera ser un paso limitante en los laboratorios de pocos recursos.

Los moldes existentes son los siguientes:

- a) los que forman bloques similares e independientes ( U. S Patent, No 4,473,452, Sep. 25 de 1984);
- b) los que forman tiras planas y largas que se cortan para formar bloques independientes;

c) los que forman barras o varillas largas de agarosa que se cortan para formar bloques independientes (Birren B y Lal E. **Pulsed Field Gel Electrophoresis: a practical guide**, Academic Press, Inc. San Diego, California, 1993, pp 29-30).

En ellos se generan muestras que, en general, son de dimensiones mayores que los pocillos del gel. Por eso, para que los bloques posean las dimensiones de los pocillos del gel es necesario cortarlos con un bisturí o cualquier otro implemento (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 40, Section 7. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad. 1995). Sin embargo, no todos los bloques cortados manualmente quedan con dimensiones similares. Esta desigualdad influye en la calidad del patrón electroforético, pues la resolución de las moléculas en los geles depende del grosor de la muestra que se deposita en el gel. De esa forma, se dificulta la comparación de los patrones en las diferentes carrileras del gel, lo cual es una desventaja cuando se desea tipificar microorganismos.

En la patente US Patent, No 5,457,050, Oct. 10 de 1995, se reportó un molde para inmovilizar las células y tratarlas en el interior del mismo. Se propuso que ese molde pudiera ser desechable o reusable según el material empleado en su construcción. No obstante, se reivindica como una facilidad del molde que las muestras son formadas y tratadas dentro de él, lo que en realidad es una desventaja. Cuando los bloques se mantienen dentro del molde durante las incubaciones, el tiempo necesario para que dichas muestras estén disponibles para la ECP se prolonga notablemente. Las moléculas efectoras de las soluciones de lisis y desproteinización tienen menos acceso a las moléculas diana dentro de las células, pues el área de contacto entre los bloques y las soluciones de incubación se reduce por lo menos a la mitad.

#### ***La selección de las condiciones experimentales de la ECP***

La selección de las condiciones experimentales es compleja. Existen métodos que permiten seleccionar las condiciones de corrida en equipos de ECP.

21

Por ejemplo, el CHEF Mapper de la Bio-Rad posee una opción de autoalgoritmo y otra de algoritmo interactivo (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. pp 31-40 Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad. 1995). Las dos opciones permiten calcular los tiempos de pulso, la duración de las rampas de pulso, el ángulo de reorientación, el campo eléctrico y el tiempo óptimo de corrida para separar las moléculas de ADN de una muestra dada. A diferencia del autoalgoritmo en el que se asumen condiciones fijas para las variables, el algoritmo interactivo permite variar el tipo, temperatura y concentración del tampón y el tipo y concentración de agarosa. Ambos algoritmos funcionan sobre la base de datos empíricos y teóricos colectados durante 5 años de experiencias (Bio-Rad Catalogue. Life Science Research Products . Bio-Rad Laboratories, pp185. 1998/99), pero los propios fabricantes recomiendan que al autoalgoritmo se le introduzcan tallas superiores e inferiores a las que se desean separar. También, que se considere que si el rango de tallas que se introduce, como datos en el autoalgoritmo y en el programa interactivo, es grande, los algoritmos pueden brindar resultados erróneos, tales como la inversión de la movilidad de las moléculas en el centro del gel.

Existen otras expresiones empíricas que brindan la duración de los pulsos eléctricos que separarían un grupo de moléculas cuyas tallas están comprendidas entre un valor dado y otro mayor llamado RSL (Resolution Size Limit) (Smith DR. Methods I, 1990, 195-203). Sin embargo, esa relación sólo es válida en algunas condiciones experimentales y no predice la resolución entre dos moléculas cualesquiera. También existe una función que brinda las condiciones aproximadas de campo eléctrico y tiempo de pulso que separarían un grupo dado de moléculas (Gunderson K y Chu G, Mol. Cell. Biol., 1991, 11: 3348-3354). Debe notarse que sólo permite estimar aproximadamente esos dos valores, pero no brinda la migración de las moléculas en cualquier condición experimental.

A pesar de que existen múltiples estudios teóricos acerca de la reorientación de las moléculas de ADN durante la ECP (Noolandi J, Adv. Electrophoresis, 1992, 5: 1-57; Maule J, Mol. Biotech. 1995, 9:107-126), ellos aún no han brindado un resultado práctico de utilidad en los laboratorios. Es decir, no han generado métodos que permitan que el usuario de la ECP

seleccione fácilmente las condiciones que debe emplear en la separación de las moléculas que desea estudiar.

Las ecuaciones propuestas por López Cánovas y cols (López-Cánovas L et al., J. Chromatogr. A, 1998, 806:123-139) para describir la migración de las moléculas de ADN en ECP tampoco han sido extendidas para predecir los patrones de bandas que se obtendrían en los geles cuando se aplican rampas de pulso y se varían el campo eléctrico, la temperatura y el tiempo de electroforesis, lo cual constituye las condiciones experimentales mas frecuentemente empleadas en la tipificación de microorganismos.



10 *El análisis de los patrones de bandas de ECP.*

Existen sistemas computarizados para adquirir las imágenes de los geles de ECP y analizar los patrones de bandas (Gerner-Smidt P et al., J. Clin. Microbiol., 1998, 37:3, 876-877; Tenover F et al., J. Clin. Microbiol., 1995, 33:9,2233-2239; van Belkum A et al., J. Clin. Microbiol., 1998, 36:6,1653-1659). Sin embargo, se considera que la comparación de los patrones de bandas de los fragmentos de restricción continúa siendo un proceso subjetivo que no puede ser totalmente reducido a rígidos algoritmos (Tenover F et al., J. Clin. Microbiol., 1995, 33:9,2233-2239), porque aunque se realice un análisis automático, este tiene que subordinarse a la inspección visual previa de los patrones.



20 El análisis de los patrones de bandas de forma manual o automática se limita a aportar como resultado el número de bandas y la determinación de la talla de las moléculas por comparación de su migración con la de marcadores de peso molecular. Sin embargo, la ECP es relativamente reciente y aún no se dispone de marcadores de talla para todos los tamaños de moléculas de ADN. Así, hasta el momento, los criterios de interpretación de los patrones de ECP utilizados para tipificar especies bacterianas se basan en determinar el número de fragmentos de restricción de tallas diferentes encontrados en los microorganismos que se comparan.

Se han propuesto ecuaciones que describen la migración de moléculas de ADN cuando se aplica una sola rampa de pulsos eléctricos y cualquier valor de campo eléctrico y temperatura (la electroforesis se realiza en agarosa Lachema al 1.5% y en tampón TBE 0.5X (TBE 1X: Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM) (López-Cánovas L et al., J. Chromatogr. A, 1998, 806:123-139). Sin embargo, no existe un método para extender y aplicar dichas ecuaciones al análisis de los patrones de bandas cuando se aplican rampas de pulso, lo que es común en los estudios comparativos de cualquier tipo de microorganismo.

*El proceso actual de tipificación de los microorganismos mediante ECP.*

El proceso total de tipificación de microorganismos consume mucho tiempo y recursos. La electroforesis requiere alrededor de 20 horas, los métodos de preparación de muestras recomendados por los fabricantes y reportados en la literatura requieren el uso de grandes cantidades de enzimas (Por ejemplo, 80 mg/ml de proteinasa K) (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. pp 40-43 Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad. 1995) y/o largos tiempos de incubación. Es aceptado que uno de los factores que ha limitado el uso de la ECP para la tipificación de microorganismos es que se necesitan entre 2 y 3 días para completar el análisis de los aislados. Esto ha reducido la capacidad de los laboratorios para analizar un gran número de muestras (Olive DM y Bean P, J. Clin. Microbiol., 1999, 37:6, 1661-1669).

**Esencia de la invención**

La presente invención provee un proceso y un juego de reactivos que permiten tipificar aislados de microorganismos en un día de trabajo (entre 7 y 13 horas) mediante la obtención de los patrones de bandas típicos de la separación de las moléculas de ADN al ser sometidas a electroforesis de campos pulsantes en miniequipos. En específico:

- 5
- i) Se provee un método que en 60 minutos, a lo sumo, brinda las muestras de ADN intacto e inmovilizado en minibloques de algún gel partiendo de células que son tratadas con soluciones que no contienen enzimas hidrolíticas, pudiendo ser el tratamiento previo o posterior a la inmovilización de dichas células. Las células pueden ser levaduras, parásitos y bacterias gram positivas y negativas y se inmovilizan en algún gel, mediante el empleo de un molde esterilizable de un material flexible que brinda minibloques cuyos grosores son homogéneos y pueden estar entre 0.03 y 0.1 cm según las dimensiones del molde que se emplee.
- 10
- 15
- ii) Se proveen métodos predictivos de las migraciones de los ADN lineales. Los métodos fueron concebidos sobre la base de ecuaciones teóricas que permiten calcular las migraciones de todas las moléculas de ADN en cualquier condición de campo eléctrico, temperatura, duraciones de los pulsos, de las rampas de pulsos y de la electroforesis en el sistema CHEF. Esos métodos permiten seleccionar las condiciones óptimas de electroforesis que deben aplicarse en los geles y analizar los resultados de los patrones de bandas que se obtienen después de realizar el proceso de electroforesis,
- 20
- 25
- iii) Se proveen procesos de separación y análisis de las moléculas de ADN de microorganismos mediante su separación en miniequipos de electroforesis de campos pulsantes, los que brindan los patrones de bandas en tiempos de entre 2.5 a 5 horas en el miniCHEF y entre 5 - 7 horas en el miniTAFE. El proceso permite estudiar hasta 27 muestras de ADN inmovilizado de microorganismos que son a) preparadas por el procedimiento no enzimático, b) separadas en los minigeles de los miniequipos después de seleccionar, mediante los métodos predictivos mencionados, las condiciones óptimas

que se aplicarán durante la electroforesis c) analizadas sus tallas mediante los métodos de análisis de las migraciones de las moléculas lineales de ADN que fueron depositadas en los pocillos del minigel, sometidas a la acción de dos campos eléctricos en dichos miniequipos y reveladas en el gel por cualquier procedimiento de tinción.

5 El método de preparación de muestras provisto en esta invención consume 60 minutos a lo sumo, es sencillo y barato, pues no requiere de enzimas líticas ni proteasas en las soluciones de incubación de los microorganismos y brinda ADN intacto e inmovilizado. Las moléculas intactas son digeribles con enzimas de restricción y cuando dichas muestras son sometidas a electroforesis de campos pulsantes, los ADN intactos o sus fragmentos de restricción migran en  
10 los minigeles brindando los patrones de bandas correspondientes a sus cariotipos moleculares o pulsotipos.

El método se fundamenta en la modificación química de la pared bacteriana que permite la lisis de los microorganismos, o el paso de moléculas efectoras pequeñas hasta las moléculas dianas dentro de la célula, así como la eliminación de componentes intracelulares indeseables  
15 mediante diálisis. En los minibloques donde se inmovilizaron las células se obtiene ADN Intacto inmovilizado.

El método contempla los siguientes pasos generales:

- 20 1) Las células de microorganismos son inicialmente aisladas de fluidos de personas hospitalizadas, de un cepario biotecnológico o de experimentos en un laboratorio común de biología molecular, genética u otro.
- 2) Las células se cultivan en medios líquidos o sólidos siempre que sean de la composición apropiada para cada microorganismo.
- 3) Las células son posteriormente colectadas mediante centrifugación y lavadas.
- 25 4) Las células son a) inmovilizadas e incubadas en las soluciones no enzimáticas, o b) incubadas en la(s) solución(es) y posteriormente inmovilizadas. En el caso 'a', los minibloques que contienen las células se incuban durante 30-60 minutos a 45 - 50°C en la solución no enzimática. En el caso 'b', las células se incuban primero en la solución no enzimática entre 5 - 30 minutos a 50°C y después se inmovilizan en minibloques de agarosa.

5) Las células se dializan contra el tampón de electroforesis si se va a realizar ésta, o contra el tampón de conservación si se desean guardar, o contra el tampón de restricción al se van a digerir.

Los organismos que pueden ser incubados en la solución no enzimática previo a su inmovilización son *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* y *Staphylococcus aureus*. La *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Entamoeba histolytica* deben ser inmovilizados primero y después incubados en las soluciones no enzimáticas. En la Tabla I se presentan las soluciones más efectivas para el lavado de las células colectadas:

10 Tabla I. Soluciones de lavado de células que resultaron más efectivas en la preparación de ADN inmovilizado:

| Microorganismos colectados                                | Composición de la solución de Lavado |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Levaduras                                                 | EDTA 0.05 M pH 7.5                   |
| <i>Entamoeba histolytica</i>                              | PBS pH 7.4                           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                             | NaCl 0.15 M                          |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ,<br><i>Escherichia coli</i> | NaCl 0.15 M, EDTA 0.01 M<br>pH 8.0   |

Las soluciones no enzimáticas para la incubación de las células o los minibloques se caracterizan por contener detergentes aniónicos, un agente quelante, un agente capaz de competir en la formación de puentes de hidrógeno y tampón Tris. La más eficiente contiene: sarcosyl 1%, EDTA 0.1 M, Tris-base 0.01 M, urea 4 M y su pH es 9.5 (NDSU). Para incubar células provenientes de bacterias gram-positivas y gram-negativas se le añade nonidet P-40 a la solución anterior (NDSUPlus).

Algunos microorganismos, como la *Escherichia coli*, deben ser incubados durante 10 minutos a 37°C en una solución de lisis no enzimática, que contiene sarcosyl 1%, nonidet P-40 1%, EDTA

0.1 M, Tris-base 0.01 M, y su pH es 8.0, antes del tratamiento de media hora con la solución NDSUPlus.

El tampón de conservación de los minibloques que contienen ADN inmovilizado es TE-100 (Tris-base 0.01 M, EDTA 0.1 M, pH 8.0).

- 5 El procedimiento para inmovilizar las células en minibloques de agarosa consiste en emplear un molde esterilizable de material flexible. Este es una lámina de silicona, goma u otro material flexible de hasta 0.5 cm de grosor (ver en ejemplos de realización el ejemplo 1). La lámina posee cualquier forma y tamaño en las otras dimensiones. En la lámina hay estampadas múltiples depresiones cuadradas que pueden tener hasta 0.3 cm de ancho y de 0.03 a 0.1 cm de profundidad. Para verter la suspensión de células-agarosa el molde se pre-ambienta a 42°C colocándolo sobre una superficie a dicha temperatura, después se vierte la suspensión en el molde y con una espátula se distribuye en las depresiones. El molde se cubre entonces con una tapa que puede ser de vidrio, plástico, acrílico o cualquier otro material y se coloca entre 4 - 15°C para que gelifiquen los minibloques. Los minibloques de tamaños homogéneos que se generan son extraídos del molde flexible sosteniéndolo por los bordes y torciéndolo en el interior de un recipiente que contiene la solución no enzimática para el tratamiento de dichos minibloques. La suspensión se prepara de tal forma que se inmovilizan entre  $0.12$  y  $3 \times 10^8$  bacterias,  $8 \times 10^7$  levaduras ó  $6 \times 10^4$  trofozoitos de *Entamoeba histolytica* por cada minibloque de gel de  $0.3 \times 0.07$  cm. Todos los microorganismos mencionados pueden ser preparados mediante el empleo de este tipo de molde. También con este tipo de molde pueden prepararse minibloques que contengan cualquier otro tipo de células.

En la presente invención, el método para seleccionar las condiciones óptimas de electroforesis que se aplicarán en los miniequipos se basa en calcular las migraciones de las moléculas lineales de ADN mediante el empleo de un grupo de ecuaciones teóricas que describen la migración, los tiempos de reorientación y las velocidades de migración de dichas moléculas de ADN en el minigel del miniCHEF. Las ecuaciones se alimentan con valores de campo eléctrico y temperatura comprendidos entre 1 - 20 V/cm y 4 - 30°C y se asume que en el proceso de electroforesis se emplea agarosa al 1.5% y como tampón de electroforesis Tris 44.5 mM, Acido

Bórco 44.5 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3 (TBE 0.5x). Las ecuaciones teóricas que describen la migración del ADN son las siguientes:

$$D = \sum_{r=1}^n \{ v_r t_p \Gamma(t_p - t_r) N_{p_r} + v_m (t_p - t_r) [1 - \Gamma(t_p - t_r)] N_{p_r} \}$$
 Ec. 1

5  $v_r = 0.0207 [Q E^{1.45} / (8 \pi \eta L^{1.35})]$  Ec 2

$v_m = 0.665 [Q E^{1.75} / (8 \pi \eta L^{1.65})]$  Ec 3

$t_r = 0.134 (L^{1.14} / v_r)^{0.928}$  Ec 4

⊙  $\Gamma(t_p - t_r) = 1$  si  $(t_p - t_r) \leq 0$  y  $\Gamma(t_p - t_r) = 0$  si  $(t_p - t_r) > 0$  Ec 5

10 donde:

$t_r$ : tiempo de reorientación (seg.),

$v_r$ : velocidad de migración durante la reorientación (cm/seg.),

$v_m$ : velocidad de migración después de la reorientación (cm/seg.),

$Q$ :  $1e^-$  x bp (carga neta del ADN, o carga del electrón en statcoulomb),

15  $L$ : 0.34 nm x bp (largo del contorno del ADN en cm),

$E$ : Intensidad del campo eléctrico en statvolts/cm,

⊙  $\eta$ : viscosidad del tampón en Poises y  $\eta$  se calculó interpolando en un polinomio que relaciona la viscosidad del agua con la temperatura (°C) experimental,

$D$ : migración total de una molécula de ADN en el minigel del CHEF (cm),

20  $d$ : migración por pulso (cm),

$N$ : número de rampas de pulsos.

$N_{p_r}$ : número de pulsos en la rampa 'r',

$t_{p_r}$ : duración del pulso en la rampa 'r' (seg.),

25 El método para seleccionar las condiciones óptimas del proceso de electroforesis incluye los siguientes pasos:

- I. Calcular la duración de los pulsos ( $t_{p_r}$ ) que se emplearán en las rampas. Para realizarlo:

- 1) Se suministran a las ecuaciones los valores escogidos de campo eléctrico y temperatura. También los de tallas de las moléculas de ADN lineal de menor y de mayor tamaño que serán separadas.
- 2) Mediante el empleo de la ecuación 4, se estiman los tiempos de reorientación de las moléculas lineales de ADN de mayor y menor tallas.
- 3) Se calcula el promedio de ambos tiempos de reorientación (único  $tp_r$  o  $tp_1$ ) cuando se desea que las moléculas de ADN de tamaños comprendidos entre la mayor y la menor estén incluidas en un solo patrón.
- 4) Se calcula una serie de tiempos de pulsos ( $tp_r$ ), que comienzan por 1.5 veces menos tiempo que el tiempo de reorientación de la molécula más pequeña y terminan con 1.5 veces más que el tiempo de reorientación de la molécula mayor. Se emplean incrementos de tiempos lineales en la serie de  $tp_r$  calculada.
- 5) Para llevar a cabo la electroforesis se toma el  $tp$  calculado en acápite 3), o la serie de  $tp_r$  calculados en el acápite 4).

II. Calcular la duración máxima de la electroforesis. El tiempo máximo de electroforesis se estima a partir del cálculo de la migración de la molécula de ADN lineal de menor talla. Este se realiza de la siguiente forma:

- 1) Se suministran a las ecuaciones 2 y 3 los valores de campo eléctrico y temperatura del tampón de electroforesis.
- 2) Se estiman el tiempo de reorientación y velocidades de migración de la molécula de menor talla.
- 3) Se suministran a la ecuación 1 la duración de los pulsos eléctricos ( $tpr$ ), estimados en el paso I y se fijan cantidades iniciales de número de pulsos eléctricos.
- 4) Se incrementan de uno en uno, el número de pulsos de cada rampa 'r' y cada vez se estima la migración de la molécula de menor talla mediante el uso de las ecuaciones 1 y 5, hasta que dicha molécula se encuentra entre 0.1 – 1 cm del borde inferior del minigel.

III. Mediante las ecuaciones 1 - 5, calcular, para todas las rampas 'n', las migraciones que tendrían las moléculas que se desean separar y predecir sus patrones de bandas en los minigeles de los miniequipos miniCHEF en las condiciones de campo eléctrico, temperatura, cantidad de rampas 'r', duración de los pulsos eléctricos ( $t_p$ ) y número de pulsos ( $N_p$ ). Este incluye los siguientes pasos:

5

- 1) Se asume que la electroforesis se realiza en agarosa 1.5% y en TBE 0.5X.
- 2) Se le definen a las ecuaciones 2 y 3, los valores de campo eléctrico y temperatura del tampón que se emplearán.
- 3) De acuerdo con los valores estimados en los pasos anteriores, se definen a la ecuación 1, el número total de rampas (n) o veces que se cambiará la duración del tiempo del pulso, la cantidad de pulsos que se aplicará en cada rampa ( $N_p$ ) y la duración de los pulsos en cada una de dichas rampas ( $t_p$ ).
- 4) Se especifican las tallas de las moléculas que se desean analizar.
- 5) Se calculan mediante el empleo de las ecuaciones 1 - 5 y para las condiciones especificadas de electroforesis, las distancias que migrarían todas las moléculas que se desean analizar.
- 6) Se presentan las migraciones de las moléculas lineales de ADN de forma numérica o gráfica.
- 7) Se repiten los pasos 2 - 6 hasta que se obtenga un patrón predicho que muestre una separación óptima entre las moléculas lineales de ADN.



10

15



20

IV. Seleccionar a partir de los resultados anteriores las condiciones experimentales que brinden en los patrones simulados una óptima separación entre las moléculas de ADN lineal. Alimentar con esos datos la fuente de poder, la unidad de control de la electroforesis y el control del sistema de enfriamiento.

25

El medio preferido para poner en práctica este método de la presente invención podría ser un programa de computación que facilitara el proceso de simulación de la separación de las

moléculas de ADN de diferentes tallas en el miniCHEF. Este programa permitiría el cálculo de las condiciones experimentales óptimas de separación.

El programa también proveería un medio rápido de realizar los cálculos requeridos para poner en práctica esta parte de la invención.

5 Con esa finalidad, se creó un programa que simula los patrones de bandas y permite al usuario cambiar las siguientes variables:

1- La talla de los fragmentos o moléculas intactas de ADN que se desean separar en el gel.

2- La temperatura del tampón.

3- El voltaje aplicado.

10 4- Los tiempos de pulso y la cantidad de pulsos eléctricos aplicados en cada una de las rampas.

5- La cantidad de rampas de pulso, comprendidas entre 1 y 1000 rampas.

Con los valores anteriores el programa provee los siguientes resultados:

1- La velocidad de cada molécula durante y después de la reorientación en cm/seg.

15 2- Los tiempos de reorientación de cada molécula en seg.

3- La migración de cada molécula en el gel (cm) después de un experimento de una determinada duración.

4- La migración de cada una de las moléculas y un esquema del patrón electroforético.

20 La representación gráfica de las distancias que migrarían las moléculas lineales de ADN, en las condiciones especificadas del proceso de electroforesis, se realiza:

i) dibujando un minigel de las dimensiones del minigel real y dibujando en dicho minigel los pocillos donde supuestamente se depositarían las muestras,

25 ii) ubicando líneas debajo de cada pocillo que representan las bandas de las moléculas de cada tamaño que se separarían. Cada línea es del ancho del pocillo y ellas están separadas del pocillo las distancias que las moléculas de cada talla migrarían en el minigel real.

- iii) asignando a cada línea o banda hipotética un color que depende de la talla de las moléculas que contiene. Es decir empleando un código de colores que se caracteriza porque cada color identifica moléculas de una talla dada.

5 Este programa constituye un método para elegir las condiciones experimentales apropiadas para separar moléculas intactas de ADN cromosomal o grandes fragmentos de ADN mediante Electroforesis de Campos Pulsantes en el miniCHEF. Cuando se usa el programa para diferentes valores de las variables experimentales, se obtienen diferentes patrones electroforéticos que permiten identificar las condiciones que separarían las moléculas de interés en el CHEF y miniCHEF. Este procedimiento no gasta reactivos ni muestras biológicas. Se basa en las ecuaciones teóricas que describen la migración de los ADN lineales en miniCHEF. Esas ecuaciones fueron obtenidas a partir de datos reales de migración de ADN lineal en el miniCHEF. Por tanto, describen correctamente la migración de dichas moléculas al ser sometidas a este tipo de electroforesis y no brindan resultados anómalos de inversión de la

10

15 movilidad en el centro del gel.

En la presente invención se propone la tipificación rápida de microorganismos mediante la electroforesis en los miniequipos miniCHEF y miniTAFE. En los geles se depositan muestras provenientes de células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Entamoeba histolytica* que son preparadas empleando el procedimiento no enzimático. También pueden depositarse muestras de estas o cualquier otro microorganismo preparado por los procedimientos enzimáticos convencionales.

20

Para la obtención de los carlotipos, o de los pulsotipos, se emplean minicubetas del tipo miniCHEF y miniTAFE en las cuales la distancia entre los pares de electrodos opuestos no sobrepasa los 11.6 cm y 7.8 cm respectivamente y en las que es posible aplicar hasta 20 V/cm en el miniCHEF y 22 V/cm en el miniTAFE.

25

Los equipos de electroforesis que se seleccionaron para poner en práctica esta parte de la invención incluyen las minicubetas miniCHEF y miniTAFE descritas previamente por Riverón et

al. 1995 (Riverón AM et al., Anal. Lett., 1995, vol. 28, pp1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49; US Patent Application 08/688,607, 1995; Patente cubana RPI Nro. 02/95, 1995) y cuyo contenido es incorporado totalmente aquí como referencia. El piso de la cubeta del miniCHEF se modificó ligeramente. Se usó un minigel de agarosa que puede poseer desde 4 hasta 7 cm de ancho y en el que se pueden colocar desde 12 hasta 27 muestras. La cubeta del miniTAFE se ensanchó ligeramente para que pueda usar un minigel que posee 7 cm de ancho y en el que se pueden colocar hasta 27 muestras.

La concentración de agarosa en el minigel puede variar desde 0.8 a 1.5%, con una concentración preferida de 1.5%. El tampón TBE 1X comprende una solución de 0.089 M Tris base, 0.089 M Ácido Bórico y 0.002 M EDTA (sal sódica del ácido etilén-diamino-tetra-acético) y puede emplearse a concentraciones entre 0.25 y 1X, pero preferentemente a 0.5X. La temperatura del tampón puede oscilar entre 4 y 30°C. También se puede emplear tampón TAE 1X (Tris-Acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M). Para imponer los voltajes en los electrodos del miniCHEF y alternar los campos eléctricos en las cubetas miniCHEF y miniTAFE se puede emplear cualquier equipo construido para ese propósito que incluye también los equipos descritos por Riverón AM et al., Anal. Lett., 1995, 28: 5; 845-860; y Riverón AM et al., Anal. Lett., 1995, 28:11, 1973-1991.

Para energizar los electrodos se puede emplear cualquier fuente de poder que posea como salida máxima 300 watts de potencia.

Los minibloques de agarosa son colocados en los pozos que forman los dientes del peine que se utiliza para formar el minigel. Pueden emplearse peines diferentes y colocar muestras más anchas o menos anchas, según el tamaño de los bloques que se hayan preparado.

Se utiliza bromuro de etidio para tefir las moléculas presentes en cada banda del minigel. El minigel se ilumina con luz ultravioleta (transiluminador de UV) y las imágenes son recogidas por una cámara sensible a luz ultravioleta usando un filtro de 550 nm. También puede emplearse cualquier otro procedimiento de tinción.

La fuerza del campo eléctrico, la temperatura del tampón, las rampas de pulso, los tiempos de electroforesis y el número de pulsos eléctricos aplicados en cada rampa provienen de los

resultados del simulador (o método de selección de las condiciones óptimas de separación de moléculas), o de los resultados de cualquier otro método que emplee el experimentador, incluyendo su experiencia empírica. Cuando se emplea el simulador la concentración del tampón debe ser 0.5X TBE, el gel de agarosa (Lachema) debe ser al 1.5%, el campo eléctrico debe ser hasta 20 V/cm, la temperatura debe ser entre 4 y 30°C y la cámara debe ser el miniCHEF. Cuando se emplea el simulador, pero se desea usar el miniTAFE pueden aplicarse las mismas condiciones de campo eléctrico y temperatura que brinde el simulador, pero deben aumentarse la cantidad de pulsos de cada rampa en 1.5 veces y la duración de los pulsos en 1.2 veces.

Bajo otras condiciones de fuerzas del campo eléctrico y temperatura también se pueden obtener en los miniequipos los patrones de bandas típicos de las moléculas contenidas en la mezcla que se separa.

En la presente invención el método preferido para analizar los patrones de bandas que se obtienen después del proceso de electroforesis se basa en medir las migraciones de las moléculas lineales de ADN en el minigel, y emplear las ecuaciones 1 - 5 para calcular el tamaño de las moléculas. El método parte de la base que los patrones de bandas hayan sido obtenidos en los minigeles después del proceso de electroforesis en el equipo miniCHEF a campo eléctrico comprendido entre 1 y 20 V/cm, temperatura entre 4 y 30°C, agarosa (Lachema) al 1.5%, tampón TBE 0.5X y cualquier cantidad 'n' de rampas (comprendidas entre 1-1000) de duración del tiempo de pulso y de la electroforesis. El método consiste en:

- i) Medir las distancias migradas por las moléculas lineales de ADN en los minigeles después del proceso de electroforesis y de tinción de las bandas en dichos minigeles.
- ii) Alimentar las ecuaciones 1 - 5 con los valores de campo eléctrico, temperatura del tampón, número de rampas (n) de pulso empleados, número de pulsos aplicados en cada rampa ( $N_{pr}$ ) y duración del pulso en cada rampa ( $tp_r$ )
- iii) Alimentar al programa con la distancia real (D en cm) a que se encuentra una banda cualquiera después de la electroforesis,

iv) A partir de esas distancias migradas, calcular la talla de las moléculas de cada banda presente en el minigel para lo cual:

- 1) Se define una molécula hipotética de ADN que posee inicialmente una talla de 1000 pares de bases.
- 5 2) Se emplean las ecuaciones 2, 3 y 4 para estimar  $v_r$ ,  $v_m$  y  $t_r$  respectivamente, de la molécula hipotética de ADN.
- 3) Mediante el empleo de las ecuaciones 1 y 5 y en las condiciones en que se realizó el proceso de electroforesis, se estima la migración teórica ( $D_t$  en cm) que tendría la molécula hipotética de ADN.
- 10 4) Se comparan  $D$  y  $D_t$ . Si  $D_t$  es mayor que  $D$  se incrementa en 1000 bp la talla de la molécula hipotética de ADN.
- 5) Se repiten los acápites de 2) a 4) hasta que la migración estimada para la molécula hipotética de ADN sea menor o igual que la distancia ( $D$ ) migrada por la molécula real en el minigel.
- 15 6) Se asume que las moléculas de ADN contenidas en dicha banda poseen un tamaño equivalente a la talla de la molécula hipotética de ADN que cumple la condición propuesta en 4). También se asume que los valores estimados de  $t_r$ ,  $v_r$  y  $v_m$  de la molécula hipotética son los de la molécula real.
- 20 7) El proceso 1) – 6) se repite para las distancias medidas en todas las bandas, o sea para todas las moléculas separadas en el minigel.

La descripción final del proceso de electroforesis puede estar dada no sólo por el patrón electroforético, sino por una matriz que contiene en las filas el número de orden de cada fragmento o molécula separada, desde la parte inferior hasta la superior, y en las columnas las tallas, tiempos de reorientación y velocidades de migración de todas las moléculas separadas en las bandas del patrón electroforético revelado.

El método preferido para poner en práctica esta parte de la presente invención podría ser un programa de computación que proveería de un medio rápido de realizar los cálculos requeridos. Es decir, de un medio de calcular la talla y los parámetros cinéticos de los grupos de fragmentos

o moléculas intactas de ADN separados al final de la electroforesis. Se creó un programa que permite al usuario cambiar las siguientes variables:

1- Las distancias migradas en el minigel por cada grupo de moléculas, o posición en el gel de cada una de las bandas del patrón.

5 2- La temperatura del tampón.

3- El voltaje aplicado en la cámara de electroforesis.

4- El tiempo de pulso y el número de pulsos eléctricos aplicados en cada una de las rampas.

5- La cantidad de rampas de pulso (limitadas entre 1-1000).

10

Con los valores anteriores el programa provee los siguientes resultados:

1- La velocidad (cm/seg.) de cada molécula durante y después de la reorientación.

2- Los tiempos de reorientación (seg.) de cada molécula.

3- La talla de las moléculas en kb (kilobases).

15

Dada las condiciones experimentales y los resultados de una electroforesis en el miniCHEF se puede usar el programa para calcular la talla y los parámetros cinéticos de las moléculas presentes en cada banda del minigel. En la mayoría de los casos no es necesario el uso de marcadores de peso molecular para identificar las moléculas de las bandas. Este análisis permitiría clasificar los fragmentos o moléculas de ADN de acuerdo con sus propiedades cinéticas. También pueden describirse los resultados finales de electroforesis mediante cualquier otro método empleado usualmente.

20

#### EJEMPLOS DE REALIZACIÓN:

25

##### Ejemplo 1. Molde esterilizable para preparar las muestras.

Un ejemplo de realización de molde esterilizable de material flexible (silicona, goma u otro material) para preparar las muestras de ADN inmovilizado se muestra en el esquema de la

figura 1. La lámina (1) posee 49 depresiones (2). En el molde o lámina se vierte la suspensión de células en agarosa y esta se distribuye en todo el molde con la espátula especial (4). Después la lámina (1) se cubre con la tapa (3) y se obtienen los minibloques (5) conteniendo células inmovilizadas. En el ejemplo real, la lámina fue confeccionada con silicona fundida, la que se vertió en un molde hasta que se formó la lámina (1). Las dimensiones de cada minibloque son de 3 x 3 x 0.7 mm (largo x ancho x grosor). Para extraer los minibloques (5) de la lámina (1), ésta se coloca en un recipiente que contiene una solución y es torcida sosteniéndola por los extremos, con lo que todos los minibloques (5) se desprenden de ella y caen en la solución.

En otras variantes de moldes, el ancho de los mismos puede variar desde 1.5 mm hasta el ancho del minigel, mientras que su grosor puede variar desde 0.5 hasta 1.5 mm. También puede variar la cantidad de depresiones que se estampan en el fondo de la lámina.

**Ejemplo 2. Preparación no enzimática de moléculas intactas e inmovilizadas de ADN de levaduras procedentes de cultivos en medio líquido.**

Diferentes levaduras (*S. cerevisiae*, *H. polymorfa* y *P. pastoris*) se crecieron en medio líquido YPG (YPG: 10 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa y 10 g de peptona en un litro de agua destilada) a 30°C y con agitación hasta la fase exponencial tardía. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con EDTA 0.05 M, pH 7.5 (Solución de lavado de la Tabla I). Se obtiene ADN intacto e inmovilizado efectuando cualquiera de las dos variantes siguientes:

Variante 1: Se incuban las células en suspensión y después se inmovilizan en minibloques.

Variante 2: Se inmovilizan las células y se incuban los minibloques que contienen las células.

En ambas variantes la inmovilización se realiza preparando una suspensión de células en agarosa a razón de  $1.3 \times 10^{10}$  células por mililitro de agarosa de bajo punto de fusión preparada al 1.5% en solución de EDTA 0.125 M. La suspensión celular se vierte en la lámina (1) del

molde mostrado en la figura 1, se cubre con la tapa (3) y se espera hasta que solidifique la agarosa y se forman los minibloques (5).

En la variante 1, se resuspende el botón celular (proveniente de 100 ml de cultivo) en 5 ml de NDSU y se incuba durante 5 minutos a 50°C. La suspensión se diluye cinco veces con TE-100 y las células se colectan por centrifugación y se inmovilizan en minibloques de agarosa como se describió anteriormente.

En la variante 2, después que las células se cosechan y lavan (ver Tabla I) se inmovilizan en minibloques de agarosa. Los minibloques que contienen las células se incuban durante media hora en NDSU a 45°C.

Después de los tratamientos por cualquiera de las dos variantes, los minibloques se lavan dos veces 5 minutos con TE-100 (Tris-base 0.01 M, EDTA 0.1 M, pH 8.0) a 50°C y se conservan en tampón TE-100 fresco a 4°C. Antes de realizar la electrophoresis los minibloques se incuban 10 minutos en 0.5X TBE a temperatura ambiente.

La figura 2 muestra la fotografía del minigel (10) donde se efectuó la separación en patrones de bandas de los cromosomas (12) y del ADN mitocondrial (13) de *S. cerevisiae*. Las muestras fueron preparadas inmovilizando las células y posteriormente incubándolas en NDSU (variante 2). Se empleó el minigel de 7 cm de ancho del miniCHEF, el que admite hasta 27 muestras en sus pocillos (11). Las condiciones de electroforesis fueron 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5%, TBE 0.5X, tiempo de pulso de 50 segundos y 4 horas de electroforesis.

La figura 2 también muestra la fotografía de una carrilera (16) del minigel del miniCHEF donde se efectuó la separación de los cromosomas de *H. polymorfa*. En él se separaron en un patrón de bandas los cromosomas (17) y el ADN mitocondrial (18). Los cromosomas de *H. polymorfa* fueron preparados según la variante 2. Ellos fueron separados en el miniCHEF a 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5%, TBE 0.5X, tiempo de pulso de 120 segundos y 4 horas de electroforesis.

Los cromosomas de *S. cerevisiae* también fueron separados en el minigel (20) del miniTAFE que muestra la figura 2. Se muestran los patrones de bandas de los cromosomas (21) y del ADN mitocondrial (22). Las muestras se prepararon por la variante 1, es decir, incubándolas en NDSU y después inmovilizándolas. Ellas se depositaron en los 13 pocillos (23) que forma el

peine que se empleó. El minigel es de 7 cm de ancho y en el miniTAFE se aplicó 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5%, TBE 0.5X, tiempo de pulso de 60 segundos y 6 horas de electroforesis.

**Ejemplo 3. Preparación no enzimática de ADN intacto e Inmovilizado de *Pseudomonas aeruginosa* procedente de cultivos en medio sólido y en medio líquido.**

Para obtener los cultivos de *P. aeruginosa* en medio líquido y sólido se aislaron de medio agar-sangre dos colonias de este microorganismo. Una de ellas se inoculó en 5 mililitros de medio LB (10 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio, 10 g de triptona bacteriológica por litro de agua destilada) y la otra se estió en una placa de este mismo medio al que se le añadió agar bacteriológico al 1.2%.

Ambos cultivos se incubaron durante toda la noche a 37°C. El cultivo líquido se incubó con agitación y el sólido se mantuvo estático. Las células se cosecharon centrifugando el medio líquido y lavando la superficie de la placa con la correspondiente solución de lavado mostrada en la Tabla I.

Después de lavar las células provenientes de ambos cultivos con la solución de lavado mostrada en la Tabla I y colectarlas por centrifugación, en ambos casos se preparó una suspensión celular a razón de  $2 \times 10^8$  células por ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en NaCl 0.15 M. La mezcla células-agarosa se vertió en la lámina (1) del molde de la figura 1, se cubrió con la tapa (3) y se dejó solidificar hasta que se formaron los minibloques (5). Los minibloques se incubaron en NDSUPlus durante media hora a 50°C. Posteriormente, los minibloques se lavaron dos veces durante 10 minutos con TE-100 a 50°C y se conservaron en tampón TE-100 fresco a 4°C hasta que se digirieron con enzimas de restricción. Los minibloques se lavaron e incubaron por 10 minutos en tampón de digestión de la enzima de restricción Xba I y cada uno de ellos se digirió con 20 U de dicha enzima a 37°C durante 2 horas. Los fragmentos de restricción obtenidos a partir de muestras que contienen células cultivadas en medio líquido o sólido se separaron en el miniCHEF a 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5% y TBE 0.5X aplicando rampas de pulsos de 20, 15, 10, 5 y 3 segundos y 5, 15, 320, 1020 y 100 pulsos, respectivamente.

En la Figura 3 se muestran los patrones de bandas (26) separados en el minigel (25) del miniCHEF. Los minibloques de *P. aeruginosa* (27) provienen de cultivo en medio LB líquido, mientras que los minibloques (28) provienen de cultivos en medio LB sólido. En la figura también se muestran las tallas de los fragmentos de ADN separados.

5

**Ejemplo 4. Preparación no enzimática de ADN Intacto e Inmovilizado de *Staphylococcus aureus* procedente de cultivos en medio sólido.**

10

Se tomó una colonia de *S. aureus* crecida en agar-sangre y se estrió en una placa de medio sólido Mueller-Hinton (Oxoid), incubándose a 37°C durante toda la noche. La placa se lavó con la solución de lavado (NaCl 0.15 M, EDTA 0.01 M, pH 8.0) de la Tabla I y las células se colectaron por centrifugación.

Se puede obtener ADN Intacto e inmovilizado efectuando cualquiera de las dos variantes siguientes:

15

Variante 1-Se tratan las células en suspensión y después se inmovilizan.

Variante 2-Se inmovilizan las células y se tratan los minibloques que contienen las células.

20

En ambas variantes la inmovilización se realiza preparando una suspensión de células en agarosa a razón de  $4 \times 10^{10}$  células por mililitro de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en solución de lavado (Tabla I). La suspensión celular se vierte en la lámina (1) del molde de la figura 1, se cubre con la tapa (3) y se deja solidificar hasta que se formen los minibloques (5).

25

Para tratar las células en suspensión (variante 1) se resuspende el botón celular en 3 ml de NDSUPlus y se incuban a 50°C durante 30 minutos. La suspensión se diluye cinco veces con TE-100 y las células se colectan por centrifugación y se inmovilizan en minibloques de agarosa.

En la variante 2 después que las células se cosechan y lavan se inmovilizan en minibloques de agarosa. Los minibloques que contienen las células se incuban durante una hora con NDSUPlus a 50°C.

Después de los tratamientos por cualquiera de las dos variantes anteriores los minibloques se lavan dos veces durante 10 minutos con TE-100 a 50°C y después durante 10 minutos en

41

tampón de digestión de la enzima de restricción Sma I en hielo y se digiere con 20 U de dicha enzima a 37°C durante 2 horas.

La figura 4 muestra el minigel (30) donde se separaron en un patrón de bandas (31) los macrofragmentos de restricción del ADN de *S. aureus*. Las muestras (32) fueron preparadas por la variante 2, mientras que las (33) fueron preparadas por la variante 1. Las condiciones de electroforesis fueron 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5%, TBE 0.5X, tiempos de pulso 1, 5, 9, 13, 17 y 21. Todas las rampas recibieron 130 pulsos. En la figura se muestran los valores de las tallas de los fragmentos separados.

#### 10 Ejemplo 5. Preparación no enzimática de ADN Intacto e Inmovilizado de *Entamoeba histolytica*.

Se cultivaron trofozoitos de *E. histolytica* clona A en medio TY1-S-33 hasta la fase exponencial de crecimiento. Los trofozoitos se cosecharon enfriando los frascos de cultivo y se colectaron por centrifugación. Posteriormente, se lavaron con PBS frío y después de colectadas las células se incubaron durante 15 minutos en una solución hipertónica (NaCl 0.5 M, EDTA 0.05 M, Tris 0.01 M, pH 7.0) fría a razón de  $2.5 \times 10^8$  trofozoitos por mililitro de solución. Finalmente, se resuspendieron  $10^8$  trofozoitos en un mililitro de agarosa de bajo punto de fusión al 2% disuelta en solución hipertónica. La suspensión se vertió en el molde flexible de silicona de la figura 1 y los minibloques se dejaron solidificar a 4°C. Los minibloques se incubaron con NDSU (Tris-base 0.01 M, EDTA 0.1 M, sarcosyl 1 % (p/v), urea 4 M, pH 9.5) a 45°C durante una hora. Posteriormente, se incubaron 10 minutos en TBE 0.5X a temperatura ambiente y se realizó la electroforesis. Si las muestras se van a conservar se lavan dos veces durante 5 minutos con TE-100 (Tris-base 0.01 M, EDTA 0.1 M, pH 8.0) a 45°C y se guardan a 4°C en TE-100 fresco. En la figura 5 se muestra la foto de un minigel (35) del miniTAFE donde se separaron en patrones de bandas (36) los ADN de *E. histolytica* (38) y de *S. cerevisiae* (37) y concatámeros de ADN de fago  $\lambda$  (39). La electroforesis se realizó a campo eléctrico 9.03 V/cm, 120 segundos

de tiempo de pulso, 20°C, agarosa 1% Seakem, tampón TBE 0.5X y 6 horas de electroforesis. Se depositaron muestras de 0.1 cm de grosor.

**Ejemplo 6. Diseño de corridas electroforéticas en el miniCHEF. La selección de las condiciones experimentales mediante el uso del simulador (método de selección de las condiciones óptimas de separación).**

Se simularon las rampas de tiempo de pulso necesarias para separar los cromosomas de *S. cerevisiae* en una cubeta miniCHEF que posee 11.6 cm de distancia entre los electrodos opuestos. Se deseaba obtener un patrón de 11 bandas en el que estén presentes todos los cromosomas de *S. cerevisiae*. Se asumió que la separación se realizaría en un minigel de agarosa al 1.5% y que el tampón de corrida a utilizar sería TBE 0.5X. Se tomaron como tallas de los cromosomas de *S. cerevisiae* los valores reportados por Goffeau (Goffeau A et al., Science, 1996, 274: 548): 230 kb (crom. I), 270 kb (crom. VI), 315 kb (crom. III), 440 kb (crom. IX), 589 kb (crom. VIII), 577 kb (crom. V), 667 kb (crom. XI), 745 kb (crom. X), 784 kb (crom. XIV), 813 kb (crom. II), 924 kb (crom. XIII), 948 kb (crom. XVI), 1091 kb (crom. VII y crom. XV), 1554 kb (crom. IV) y 2352 kb (crom. XII).

El simulador determinó que para una intensidad de campo eléctrico de 10 V/cm y una temperatura del tampón de 20°C las condiciones óptimas de separación de todos los cromosomas de *S. cerevisiae* en un único patrón de bandas, se lograban, aplicando cuatro rampas de 5, 40, 75 y 110 s de tiempo de pulso y 42 pulsos en cada una de ellas. Los resultados de migración, tiempos de reorientación, velocidades de migración y el código de colores empleado para identificar las tallas de los cromosomas se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Resultados cuantitativos del simulador. Tallas (kb) y colores asignados a los cromosomas de *S. cerevisiae* en el código de colores del simulador.

| Talla de los cromosomas de <i>S. cerevisiae</i> (kb) | Código de colores | tr (s) | vr x 10 <sup>3</sup> (cm/s) | vm x 10 <sup>3</sup> (cm/s) | D predicha por el simulador (cm) | D experimental (cm) |
|------------------------------------------------------|-------------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------|
| 250                                                  | azul              | 4.9    | 8.8843                      | 2.7462                      | 2.45                             | 2.67                |
| 270                                                  | verde             | 5.5    | 8.6482                      | 2.7293                      | 2.40                             | 2.67                |
| 315                                                  | rojo              | 6.8    | 8.1940                      | 2.6959                      | 2.28                             | 2.46                |
| 440                                                  | cyan              | 10.8   | 7.2894                      | 2.6247                      | 1.95                             | 2.22                |
| 577                                                  | morado            | 15.6   | 6.6297                      | 2.5684                      | 1.59                             | 1.85                |
| 589                                                  | gris oscuro       | 16.1   | 6.5821                      | 2.5642                      | 1.57                             | 1.85                |
| 667                                                  | carmelita         | 19.1   | 6.3017                      | 2.5388                      | 1.42                             | 1.66                |
| 745                                                  | azul claro        | 22.2   | 6.0625                      | 2.5165                      | 1.27                             | 1.49                |
| 784                                                  | verde claro       | 23.9   | 5.9551                      | 2.5062                      | 1.19                             | 1.35                |
| 813                                                  | rojo claro        | 25.1   | 5.8799                      | 2.4969                      | 1.13                             | 1.18                |
| 924                                                  | cyan claro        | 29.9   | 5.6223                      | 2.4735                      | 0.92                             | 0.92                |
| 948                                                  | morado claro      | 31.0   | 5.5721                      | 2.4684                      | 0.89                             | 0.92                |
| 1091                                                 | blanco            | 37.6   | 5.3047                      | 2.4408                      | 0.73                             | 0.6                 |
| 1554                                                 | negro             | 61.3   | 4.6870                      | 2.3727                      | 0.52                             | 0.4                 |
| 2352                                                 | azul              | 108.6  | 4.0542                      | 2.2953                      | 0.46                             | 0.17                |

5 D experimental: Distancia migrada por la molécula en el minigel (40) de la figura 6.

**D predicha:** Distancia que debió migrar la molécula según el simulador en las condiciones del experimento de la figura 6.

**vr:** velocidad de migración de la molécula durante la reorientación.

**vm:** velocidad de migración de la molécula después de la reorientación.

**5** **tr:** tiempo de reorientación de la molécula.

En la figura 6 se muestra la fotografía del minigel real (40) donde aparece el patrón de bandas de los cromosomas (41) de *S. cerevisiae* 198-2 separados en el miniCHEF en las condiciones que predice el simulador. También se muestra el patrón de bandas (43) simulado en el minigel hipotético (42) que dibuja el simulador. Ambos patrones son similares. Las moléculas Intactas de ADN Inmovilizado de *S. Cerevisiae* 198-2 empleadas en esta electroforesis se prepararon según el procedimiento no enzimático descrito en esta invención.

En la figura 7 se muestra el diagrama de flujo del simulador provisto en esta invención. En él se muestra inicialmente el cálculo de la rampa de pulsos a partir de datos de migración o datos de talla.

**15** Cuando el usuario brinda los datos de migración, el simulador inicialmente estima las tallas, a partir de dichos datos y con posterioridad estima un conjunto de rampas lineales de pulsos. Cuando el usuario brinda datos de talla, el simulador estima las rampas directamente. El criterio de detener el incremento del número de pulsos en este ejemplo es que la molécula más pequeña migre 2.5 cm.

**20** Con posterioridad, el simulador brinda el resultado final que se vería en el minigel (ver patrón de bandas en minigel 43 simulado en el minigel hipotético 42 de la figura 6) si se aplicaran esas rampas de pulsos y números de pulsos al conjunto de moléculas especificadas por el usuario. También brinda los datos cuantitativos. Esta parte del diagrama no se muestra porque la solución es trivial.

**25**

**Ejemplo 7: Análisis de los patrones de bandas de los cariotipos o pulsotipos.**

En la figura 8 se muestra el cariotipo electroforético (61) de *S. cerevisiae* obtenido en el miniCHEF al separar dichos cromosomas en agarosa al 1.5%, TBE 0.5X, a 10 V/cm, 20°C, 2.95s y 453 pulsos y 21.56s y 453 pulsos.

5 En este cariotipo, se midió la migración de cada una de las bandas (62-66) que aparecieron en el cariotipo electroforético de *S. cerevisiae* mostrado en la figura 8.

El método de análisis de las migraciones se alimentó con esos datos de migración, el campo eléctrico, la duración y cantidad de pulsos empleados, así como la temperatura del tampón de electroforesis.

10 El método descrito en esta invención permitió el cálculo de la talla, tiempos de reorientación y velocidades de migración de las moléculas contenidas en cada una de las bandas. Estos resultados se muestran en la Tabla III. Este es el tipo de resultados que brinda el método de análisis de migraciones que fue implementado en esta parte de la invención.

15 Tabla III. Tallas, tiempos de reorientación y velocidades de migración de las moléculas contenidas en cada banda.

Las estimaciones se realizan a partir de la posición de cada una de las bandas en el minigel, después de la aplicación de rampas de pulso.

| 10 V/cm, 20°C |                   |        |            | Estimaciones         |                      |        |     |
|---------------|-------------------|--------|------------|----------------------|----------------------|--------|-----|
| Bandas        | 2.95s/453 pulsos; |        | Talla real |                      |                      |        |     |
|               | 21.56s/453 pulsos |        | (kb)       |                      |                      |        |     |
|               | D exp             | D teor | Talla (kb) | vr x 10 <sup>3</sup> | vm x 10 <sup>3</sup> | tr (s) |     |
|               |                   |        |            | cm                   | cm                   |        |     |
| 62            | 2.38              | 2.23   | 230        | 210                  | 0.09443              | 0.2785 | 3.9 |
| 63            | 2.29              | 2.14   | 270        | 226                  | 0.09204              | 0.2768 | 4.3 |
| 64            | 1.97              | 1.96   | 315        | 302                  | 0.08310              | 0.2705 | 6.4 |

|    |      |      |     |     |         |        |      |
|----|------|------|-----|-----|---------|--------|------|
| 85 | 1.55 | 1.42 | 440 | 401 | 0.07530 | 0.2644 | 9.5  |
| 86 | 0.84 | 0.82 | 577 | 564 | 0.06683 | 0.2573 | 15.2 |

D exp: Distancia migrada por la molécula en el minigel de la figura 8.

D teor: Distancia que debió migrar la molécula de talla real en las condiciones del experimento de la figura 8.

vr: velocidad de migración de la molécula durante la reorientación.

5 vm: velocidad de migración de la molécula después de la reorientación.

tr: tiempo de reorientación.



La figura 9 muestra el diagrama de flujo del método de análisis de las migraciones de las moléculas de ADN. El diagrama fue dibujado para el procesamiento de una sola molécula, pero esos pasos se repiten para todas las moléculas que se analizaron.

10 Cuando el método descrito en el ejemplo 7 se alimenta con datos de migración, el mismo estima las tallas de manera similar a como lo hace el método descrito en este ejemplo.



**Ejemplo 8. Tipificación de aislados de *Escherichia coli* mediante el empleo del miniCHEF.**

A partir de cultivos en medio agar-sangre de dos aislados (INN3 y INN7) caracterizados fenotípicamente como *Escherichia coli* se tomó una colonia de cada uno y se subcultivaron en 5 ml de medio LB (10 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio, 10 g de triptona bacteriológica por litro de agua destilada). Cada cultivo se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación.

Después de lavar las células provenientes de ambos cultivos con la solución de lavado mostrada en la Tabla I y colectarlas por centrifugación, en ambos casos fueron preparadas sendas suspensiones celulares a razón de  $2 \times 10^8$  células por ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en NaCl 0.15 M. Cada mezcla de células-agarosa se vertió en la lámina (1) del molde de la figura 1, se cubrió con la tapa (3) y se dejó solidificar hasta que se formaron los minibloques (5). Los minibloques se incubaron con NDSUPlus durante media hora a 50°C. Con posterioridad, los minibloques se lavaron dos veces durante 10 minutos con TE-100 a 50°C. Después, los minibloques se lavaron e incubaron por 10 minutos en tampón de digestión de la enzima de restricción Xba I y cada uno de ellos se digirió con 20 U de dicha enzima a 37°C durante 2 horas.

En la figura 10 se muestran los patrones de bandas (87) separados en el minigel (86) del miniCHEF. La separación lograda en el miniCHEF de los fragmentos de restricción con Xba I del ADN total de los aislados de *E. coli* INN3 (88) y INN7 (89) permitió identificar seis fragmentos comunes entre ellos (90) y por tanto, de acuerdo a Tenover (Tenover F et al., J. Clin. Microbiol., 1995, 33:9, 2233-2239) clasificarlos como dos subtipos diferentes de *E. coli*. Los fragmentos de restricción se separaron en el miniCHEF a 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5% y TBE 0.5X. aplicando rampas de pulsos de 25, 20, 15, y 5 segundos y 35, 40, 50, 140 y 800 pulsos, respectivamente.

**Breve descripción de las figuras:**

**Figura 1.** Esquema de un molde para fundir las muestras. En la parte inferior se muestra la lámina donde se encuentran estampadas las depresiones donde se vierte la suspensión de

células en agarosa, en la parte superior se muestra la tapa del molde y un minibloque. A la derecha se muestra la espátula que permite distribuir la suspensión células-agarosa.

**Figura 2.** Fotografía de los patrones de bandas de los cromosomas de *S. cerevisiae* y *H. polimorfa* al ser separados en minigeles del miniCHEF y del miniTAFE. La parte superior muestra el minigel del miniCHEF de 7 cm de ancho, sus 27 pocillos y los patrones de bandas de los cromosomas de *S. cerevisiae*. En el centro de la figura se muestra el minigel de 4 cm de ancho y el patrón de bandas de los cromosomas de *H. polimorfa*. Las muestras fueron preparadas por el método no enzimático inmovilizando las células y después incubándolas en NDSU. Las condiciones de electroforesis fueron 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5%, TBE 0.5X, tiempo de pulso de 50 segundos y 4 horas de electroforesis. En la parte inferior se muestra un minigel del miniTAFE con los patrones de bandas de *S. cerevisiae*. En el miniTAFE se empleó 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5%, TBE 0.5X tiempo de pulso de 60 segundos y 6 horas de electroforesis. Las muestras fueron preparadas incubando las células en NDSU con anterioridad a su inmovilización.

**Figura 3.** Patrones de bandas en el miniCHEF de los macrofragmentos de restricción del ADN de *P. aeruginosa* digerido con Xba I. A la izquierda, los minibloques de *P. aeruginosa* que provienen de cultivo en medio LB líquido, mientras que los de la derecha provienen de cultivos en medio LB sólido. Se empleó el miniCHEF a 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5% y TBE 0.5X, y se aplicaron rampas de pulsos de 20, 15, 10, 5 y 3 segundos y 5, 15, 320, 1020 y 100 pulsos, respectivamente.

**Figura 4.** Patrones de bandas en el miniCHEF de los macrofragmentos de restricción del ADN de *S. aureus* digerido con Sma I. A la izquierda se muestran los patrones de bandas de las muestras inmovilizadas primero, e incubadas en NDSUPlus posteriormente. A la derecha están las muestras que se incuban primero en NDSUPlus y después se inmovilizan. En ambos casos las células fueron cultivadas en medio sólido. Las condiciones de electroforesis fueron 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5%, TBE 0.5X, tiempos de pulso 1, 5, 9, 13, 17 y 21. Todas las rampas recibieron 130 pulsos.

**Figura 5.** Fotografía de los patrones de bandas de ADN de *E. histolytica*, *S. cerevisiae* y concatámeros de ADN de fago  $\lambda$ . La electroforesis se realizó en el minigel del miniTAFE a campo eléctrico 9.03 V/cm, 120 segundos de tiempo de pulso, 20°C, agarosa 1% Seakem, tampón TBE 0.5X y 6 horas de electroforesis. Se depositaron muestras de 0.1 cm de grosor. De izquierda a derecha en las carrileras son, Carrilera 1: Miniplugs con *S. cerevisiae* 198-2; Carrileras 2, 3, 4 y 5: Miniplugs con *E. histolytica* incubadas 0.5, 1, 2 y 16 horas, respectivamente en NDSUPlus a 45 °C, Carrilera 6: concatámeros de ADN de fago  $\lambda$ .

**Figura 6.** Fotografía del minigel (40) del miniCHEF donde se obtuvo el patrón de bandas de los cromosomas de *S. cerevisiae* 198-2 (izquierda) y gráfico del minigel hipotético (42) que predice el simulador (derecha). La electroforesis real se realizó en las condiciones que predice el simulador. Las moléculas intactas de ADN inmovilizado de *S. cerevisiae* 198-2 empleadas en esta electroforesis se prepararon según el procedimiento no enzimático descrito en esta invención. Para un campo eléctrico de 10 V/cm y una temperatura del tampón de 20°C las condiciones de separación predichas por el simulador fueron cuatro rampas de pulso de 5, 40, 75 y 110 segundos y 42 pulsos en cada una de ellas. Los resultados de migración y el código de colores empleado para identificar las tallas se muestran en la Tabla II.

**Figura 7.** Diagrama de flujo del método que simula los patrones de bandas de los ADN que migran en los minigeles del MiniCHEF. En el diagrama están los siguiente parámetros y variables: la talla (kb), tiempos de reorientación (tr), velocidad de migración durante la reorientación (vr) y velocidad de migración después de la reorientación (vm) de las moléculas en el miniCHEF.

Tpr: tiempo de pulso en cada rampa, Np: número de pulsos en cada rampa, g0, g1, g2, g3, g4 coeficientes obtenidos para describir la viscosidad ( $\eta$ ) en función de la temperatura (T) experimental, Dt: distancia teórica calculada por el programa, nr: número de rampas, E: campo eléctrico, L: largo del contorno de la molécula de ADN, bp: pares de bases, Q: carga neta del ADN.

**Figura 8. Cariotipo electroforético (81) de *S. cerevisiae* obtenido en el miniCHEF al separar dichos cromosomas en agarosa al 1.5%, TBE 0.5X, a 10 V/cm, 20°C, 2.95s y 453 pulsos y 21.56s y 453 pulsos.**

**Figura 9. Diagrama de flujo del método que emplea las distancias migradas para estimar la talla (kb), tiempos de reorientación ( $t_r$ ), velocidad de migración durante la reorientación ( $v_r$ ) y velocidad de migración después de la reorientación ( $v_m$ ) de las moléculas separada en el miniCHEF.**

**$t_{pr}$ : tiempo de pulso en cada rampa,  $N_p$ : número de pulsos en cada rampa,  $g_0, g_1, g_2, g_3, g_4$  coeficientes obtenidos para describir la viscosidad ( $\eta$ ) en función de la temperatura ( $T$ ) experimental,  $D$ : distancia migrada en el gel,  $D_t$ : distancia teórica calculada por el simulador,  $n$ : número de rampas,  $E$ : campo eléctrico,  $L$ : largo del contorno de la molécula de ADN,  $bp$ : pares de bases,  $Q$ : carga neta del ADN.**

**Figura 10. Tipificación en el miniCHEF de los aislados INN3 y INN7 de *Escherichia coli* mediante la obtención de los patrones de bandas de los fragmentos de restricción con *Xba* I de sus ADN. Se empleó el método no enzimático de preparación de muestras. Las condiciones de electroforesis fueron: 10 V/cm, 20°C, agarosa 1.5% y TBE 0.5X aplicando rampas de pulsos de 25, 20, 15, 10 y 5 segundos y 35, 40, 50, 140 y 800 pulsos, respectivamente. Los puntos (90) representan los fragmentos de restricción comunes en ambos aislados.**

## **20 VENTAJAS DE LA SOLUCIÓN PROPUESTA.**

- 1- La preparación de moléculas intactas de ADN de microorganismos, inmovilizadas en minibloques delgados de algún gel, se realiza entre 5 minutos y una hora y no requiere del uso de enzimas por lo que se hace rápidamente y a bajo costo.**
- 25 2- La preparación no enzimática de muestras de ADN para ECP funciona igualmente eficiente para células provenientes de cultivos en medio sólido o líquido. Algunas células pueden ser**

Incubadas en las soluciones no enzimáticas previamente a su inmovilización, lo que reduce el tiempo necesario para preparar muestras.

3- Los ADN inmovilizados por los procedimientos descritos están libres de inhibidores de enzimas de restricción y son digeribles en 2 horas por endonucleasas de restricción, brindando los patrones de bandas típicos en electroforesis de campos pulsantes en miniequipos.

4- Los minibloques de gel que contienen los ADN inmovilizados de los microorganismos tienen todas dimensiones homogéneas y no tienen que ser cortados antes del proceso de electroforesis, lo que garantiza reproducibilidad en los resultados.

5- Los cariotipos moleculares o pulsotipos de hasta 27 muestras se obtienen entre 2.5 y 7 horas con poco gasto de solución tampón y de matriz de separación. El tiempo depende del microorganismo que se estudie y del miniequipo que se emplee, así como el campo eléctrico, temperatura y rampas de pulsos seleccionados.

6- Los equipos requeridos para analizar los genomas de los microorganismos mediante el procedimiento de electroforesis de campos pulsantes en los minigeles de los miniequipos requieren de poco espacio útil del laboratorio.

7- Los patrones electroforéticos pueden ser simulados en una computadora antes del experimento tantas veces como se desee, lo que permite seleccionar las condiciones de campo eléctrico, temperatura y rampas de pulso que brinden la mejor separación entre las moléculas sin gastar reactivos ni muestra biológica.

8- Las rampas de pulso que deben ser aplicadas se seleccionan mediante un método basado en ecuaciones que describen la migración de las moléculas de ADN en los minigeles del miniCHEF, por lo que brinda cual sería el patrón electroforético óptimo de separación entre las moléculas.

9- Para estimar los tamaños de las moléculas de ADN y los tiempos de reorientación y velocidades de migración no se necesitan marcadores de talla, pues se provee un método que estima esos parámetros a partir de las distancias migradas en el gel, bajo cualquier

condición de campo eléctrico entre 1 - 20 V/cm, temperatura 4 – 30°C y rampas de pulso.

Su limitante es que requiere agarosa al 1.5% y tampón TBE 0.5X.

10- Las bandas separadas en el patrón electroforético pueden ser caracterizadas además de por la talla de sus moléculas, por los tiempos de reorientación y velocidades de migración de las moléculas.

5

11- El proceso descrito ahorra considerablemente reactivos químicos, muestras biológicas y tiempo.

12- Todo el proceso de preparación de muestra y análisis del genoma de 27 microorganismos no excede de un día usual de trabajo.



10 13- Se provee un juego de reactivos que simplifica la preparación de los ADN Intactos de los microorganismos.



**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos mediante electroforesis de campos pulsantes caracterizado por los siguientes pasos:

- 5
- i) la preparación de moléculas intactas de ADN de microorganismos inmovilizados en minibloques de algún gel, preparación que se realiza mediante un método no enzimático con un juego de reactivos asociado,
- 10
- ii) el uso de una minicámara de electroforesis de campos pulsantes para la separación de las moléculas de ADN contenidas en los minibloques, siendo la minicámara mencionada CHEF o TAFE,
- 15
- iii) el uso de un método para seleccionar los valores apropiados de rampas de pulso y de duración de la electroforesis según sean el campo eléctrico y la temperatura aplicados en la minicámara, valores apropiados de rampas de pulso y duración de la electroforesis que deben rendir la mejor resolución de los fragmentos de ADN o de las moléculas intactas de ADN,
- 20
- iv) la aplicación en la minicámara de la temperatura, la intensidad del campo eléctrico y la duración de la rampa de pulso que fueron calculadas en el paso (iii) para resolver la mezcla de moléculas de ADN,
- v) el uso de un método para analizar las distancias que migraron las moléculas lineales de ADN en el minigel, una vez que la electroforesis en dicho minigel fue realizada.

2. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos mediante electroforesis de campos pulsantes de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizado porque la preparación de las moléculas intactas de ADN incluidas en minibloques de algún gel se realiza según el siguiente esquema lógico:

- 25
- i) se colectan células de microorganismos crecidos en medio líquido o sólido,

- ii) dichas células se incuban en soluciones que contienen tampón, detergente, un agente quelante y un agente que rompe los puentes de hidrógeno,
- iii) las incubaciones se realizan antes o después de la inmovilización de las células según sea el microorganismo de que se trate.

5      3.      Proceso para la tipificación rápida de microorganismos mediante electroforesis de campos pulsantes de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y No. 2 caracterizado porque las células son inmovilizadas en minibloques de gel mediante el empleo de un molde que es una lámina flexible con múltiples depresiones estampadas en su superficie, las cuales determinan las dimensiones de los minibloques que serán preparados, siendo la mencionada lámina de 10      silicona, goma o cualquier otro material flexible y pudiendo o no ser esterilizada.

15      4.      Proceso para la tipificación rápida de microorganismos mediante electroforesis de campos pulsantes de acuerdo con la reivindicación No. 3 caracterizado porque las depresiones de los mencionados moldes poseen cualquier ancho, 0.3 cm de longitud y desde 0.03 hasta 0.1 cm de profundidad, por lo que entre  $10^6$  y  $10^8$  células pueden quedar inmovilizadas en los minibloques, según sea el microorganismo.

20      5.      Proceso para la tipificación rápida de microorganismos mediante electroforesis de campos pulsantes de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y 2 caracterizado porque el tiempo requerido para incubar las células en la solución tampón que contiene detergente, un agente quelante y un agente que rompe los enlaces de hidrógeno, está comprendido entre 5 y 60 minutos, mientras que el volumen de incubación, en mililitros, es ' $c \cdot v \cdot 20$ '; siendo ' $v$ ' el volumen de un minibloque, en mililitros, y ' $c$ ' la cantidad de minibloques que se incubarán.

25      6. Proceso de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizado porque cuando el microorganismo a tipificar es una levadura, el método no enzimático de preparación de las

muestras consiste en emplear una solución compuesta por sarcosyl al 1%, EDTA 100 mM, urea 4 M, Tris 10 mM, pH 9.5 para incubar los minibloques conteniendo dichas células a 45°C, entre 30 minutos y una hora, dando como resultado el ADN intacto e inmovilizado de dicha levadura, el cual puede opcionalmente ser tratado con endonucleasas de restricción después de incubar los minibloques por 10 minutos en el tampón requerido para dicha endonucleasa.

7. Proceso de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizado porque cuando el microorganismo a tipificar es una bacteria, el método no enzimático de preparación de las muestras consiste en emplear una solución compuesta por sarcosyl 1%, nonidet P-40 1%, EDTA 100 mM, urea 4 M, Tris 10 mM, pH 9.5, para incubar los minibloques conteniendo dichas células a 50°C durante 30 minutos a una hora, dando como resultado el ADN intacto e inmovilizado de dicha bacteria, el cual puede opcionalmente ser tratado con endonucleasas de restricción después de incubar los minibloques por 10 minutos en el tampón requerido para dicha endonucleasa.

8. Proceso de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizado porque cuando el microorganismo a tipificar es *Escherichia coli*, el método no enzimático de preparación de las muestras de ADN inmovilizado consiste en emplear dos soluciones en las cuales se incuban secuencialmente las células inmovilizadas; primero los minibloques se incuban en una solución que contiene sarcosyl al 1%, nonidet P-40 1%, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 8.0 durante 10 minutos a 37°C y después dichas células se incuban en sarcosyl 1%, nonidet P-40 1%, EDTA 100 mM, urea 4 M, Tris 10 mM, pH 9.5 durante 30 minutos a 50°C, dando como resultado el ADN intacto e inmovilizado de dicha bacteria, el cual puede opcionalmente ser tratado con endonucleasas de restricción después de incubar los minibloques por 10 minutos en el tampón requerido para dicha endonucleasa.

9. Proceso de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizado porque cuando el microorganismo a tipificar es *Entamoeba histolytica* el método no enzimático de preparación de

las muestras consiste en tratar los trofozoitos no inmovilizados con una solución hipertónica que contiene NaCl 0.5 M, EDTA 0.05 M, Tris 0.01 M, pH 7.0 durante 15 minutos y después de inmovilizarlos en los minibloques de agarosa, entonces incubarlos en una solución que contiene sarcosyl al 1%, EDTA 100 mM, urea 4 M, Tris 10 mM, pH 9.5 durante una hora a 45°C, dando como resultado el ADN intacto e inmovilizado de dicho parásito, el cual puede opcionalmente ser tratado con endonucleasas de restricción después de incubar los minibloques por 10 minutos en el tampón requerido para dicha endonucleasa.

10. Proceso de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizado porque si el microorganismo a tipificar son las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, o *Hansenula polymorpha*, un método no enzimático de preparación de ADN inmovilizado consiste en que células no inmovilizadas se incuban en una solución que contiene sarcosyl al 1%, EDTA 100 mM, urea 4 M, Tris 10 mM, pH 9.5 a 50°C entre 5 y 30 minutos, y con posterioridad dichas células son inmovilizadas en minibloques de gel, lo que da por resultado ADN intacto e inmovilizado de dichas levaduras, el que puede ser opcionalmente tratado con endonucleasas de restricción después de incubar los minibloques por 10 minutos en el tampón requerido para dicha endonucleasa.

11. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos mediante electroforesis de campos pulsantes de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizado porque las diferenciaciones entre las cepas, o la tipificación de los microorganismos, son realizadas a partir de la información contenida en los patrones de bandas que brindan sus ADN intactos o sus fragmentos de restricción cuando se separan mediante electroforesis de campos pulsantes en los minigeles de los miniequipos, donde dichos miniequipos pueden ser:

- i) el miniCHEF, el cual posee 11.6 cm como la máxima distancia entre los pares de electrodos de polaridad opuesta y admiten minigeles que pueden llegar a ser de hasta 7 cm de ancho,

- ii) el miniTAFE (Transversal Alternating Field Electrophoresis), el cual posee 7.8 cm como distancia máxima entre los pares de electrodos de polaridad opuesta y admiten minigeles que pueden llegar a ser de hasta 7 cm de ancho.

5 12. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos de acuerdo con la reivindicación No. 11 caracterizado porque las separaciones de las moléculas de ADN para diferenciar o tipificar los aislados o cepas de microorganismos se efectúan en los miniequipos de electroforesis de campos pulsantes del sistema CHEF o TAFE, en los que se emplean minigeles de agarosa entre 0.5 - 1.5 % y tampón de electroforesis Tris 89 mM, Acido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.4 (TBE 1X), o ese mismo con la mitad, o la cuarta parte de las concentraciones referidas y en dichos equipos se aplican una temperatura del tampón, intensidad del campo eléctrico y valores de las rampas de pulsos que son apropiadamente seleccionados por el experimentador mediante un método de cálculo, o métodos empíricos o cualquier otro, estando dichos valores experimentales comprendidos entre 4 - 30°C, 1-20 V/cm en el miniCHEF y 1-25 V/cm en el miniTAFE, así como cualquier duración de los pulsos eléctricos.

13. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos de acuerdo con la reivindicación No. 1 y dado que existen las siguientes ecuaciones que describen la migración por pulso 'd' (cm) de las moléculas lineales de ADN en los minigeles de los miniequipos miniCHEF,

$$d = v_r t_p \Gamma (t_p - t_r) + v_m (t_p - t_r) [1 - \Gamma (t_p - t_r)]$$

$$v_r = 0.0207 [Q E^{1.45} / (8 \pi \eta L^{1.35})]$$

$$v_m = 0.865 [Q E^{1.76} / (8 \pi \eta L^{1.06})]$$

$$t_r = 0.134 (L^{1.14} / v_r)^{0.828}$$

$$\Gamma(t_p - t_r) = 1 \text{ si } (t_p - t_r) \leq 0 \text{ y } \Gamma(t_p - t_r) = 0 \text{ si } (t_p - t_r) > 0$$

donde 'tr' es el tiempo de reorientación (seg) de la molécula de ADN lineal, 'vr' y 'vm' son las velocidades de migración (cm/seg) durante y después de la reorientación de la molécula

58

de ADN, respectivamente, 'Q' la carga neta de dicha molécula (statcoulomb) la cual está dada por  $1e^- \times bp$ , donde 'e' es la carga del electrón y 'bp' los pares de bases, 'L' es el largo del contorno (cm) de la molécula lineal de ADN, dado por  $0.34 \text{ nm} \times bp$ , 'E' la intensidad del campo eléctrico (statvolts/cm), ' $\eta$ ' la viscosidad del tampón (Paises), la que se calcula interpolando el valor de la temperatura experimental en un polinomio que relaciona la viscosidad del agua con la temperatura experimental ( $^{\circ}\text{C}$ ),

está caracterizado por aportar y emplear métodos de cálculo que se basan en dichas ecuaciones para predecir los patrones de bandas que brindarían las moléculas lineales de ADN al ser separadas en un minigel del miniCHEF cuando se aplican 'n' rampas de pulso, así como aportar métodos para analizar los patrones de bandas resultantes al finalizar una corrida de electroforesis en la que se aplicaron 'n' rampas de pulso, métodos que son aplicables siempre y cuando el valor 'n' de la cantidad de rampas de pulso esté comprendido entre 1 y 1000 y las ecuaciones se alimenten con valores de campo eléctrico y temperatura comprendidos entre 1 - 20 V/cm y 4 - 30 $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, asumiendo que en la corrida de electroforesis se emplea agarosa al 1.5% y tampón de electroforesis Tris 44.5 mM, Acido Bórico 44.5 mM, EDTA 1 mM, pH 8.4.

14. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos que de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y 13 aporta métodos de cálculo que permiten determinar la mejor rampa de pulso, así como analizar los patrones de bandas que se obtienen después de 'n' rampas de pulso, métodos que están caracterizados por realizar sus cálculos a partir de las predicciones de las migraciones 'D' de las moléculas de ADN lineal en los minigeles después de 'n' rampas de pulsos, cálculo de la migración 'D' de cada molécula que es sometida a una rampa de 'n' pulsos que se obtiene a partir de:

$$D = \sum_{r=1}^n d_r \cdot Np_r$$

donde,  $N_{p_r}$  es el número de pulsos aplicados en la rampa 'r',  $t_{p_r}$  es la duración del pulso (segundos) en la rampa 'r' y ' $d_r$ ' es la migración por pulso de cada molécula en cada rampa 'r' y está dada por:

$$d_r = v_r t_{p_r} \Gamma_r(t_{p_r} - t_r) + v_m (t_{p_r} - t_r) [1 - \Gamma_r(t_{p_r} - t_r)]$$

$$\Gamma_r(t_{p_r} - t_r) = 1 \text{ si } (t_{p_r} - t_r) \leq 0 \text{ y } \Gamma_r(t_{p_r} - t_r) = 0 \text{ si } (t_{p_r} - t_r) > 0$$

15. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos de acuerdo con la reivindicación No.

14 caracterizado porque el método para determinar la mejor rampa de pulso incluye los siguientes pasos:

- i) alimentar a las ecuaciones con los datos de campo eléctrico y temperatura que se desean aplicar, así como con las tallas de las moléculas de ADN lineal que se estudiarán,
- ii) calcular la duración de los pulsos que se emplearán en las rampas,
- iii) calcular el tiempo máximo de electroforesis sobre la base del cálculo de la migración que tendría la molécula de menor talla en el minigel,
- iv) calcular las migraciones de todas las moléculas y predecir los patrones de bandas que brindarían dichas moléculas en los minigeles de los miniequipos miniCHEF, empleando en dicho cálculo las condiciones de campo eléctrico y temperatura suministrados al método, el tiempo de electroforesis calculado en el paso (iii) y los valores ya calculados de duración de los pulsos eléctricos y cantidades de pulsos en las rampas,
- v) seleccionar como las condiciones experimentales que se aplicarán en el miniCHEF, aquellas que brindan una óptima separación entre las moléculas de ADN lineal en los patrones simulados.

16. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos de acuerdo con la reivindicación No. 15 caracterizado porque el cálculo del tiempo máximo de electroforesis se realiza a partir de calcular la migración que experimentaría en el minigel del miniCHEF la molécula de ADN lineal de menor talla; calculo de dicha migración que se lleva a cabo de la siguiente manera: las ecuaciones que describen la migración 'D' de las moléculas lineales de ADN en el miniCHEF se alimentan con los valores de campo eléctrico, temperatura y duración de los pulsos eléctricos (tp<sub>r</sub>) que se aplicarán en las 'n' rampas; se fija una cantidad inicial de pulsos eléctricos en cada rampa Np<sub>r</sub>, siendo 1 el valor inicial recomendado para todos los Np<sub>r</sub> y para todo 'r' todos los Np<sub>r</sub> se van incrementando de unidad en unidad y cada vez que se realizan esos incrementos, la migración 'D' de la molécula más pequeña se estima mediante  $D = \sum_{r=1}^n d_r \cdot Np_r$ ; se detienen dichos incrementos de Np<sub>r</sub> cuando la D calculada es tal que dicha molécula debería haber alcanzado una posición que dista entre 0.1 y 1 cm del borde inferior del minigel; aceptando entonces como duración máxima de la electroforesis al tiempo que se calcula según  $2 \cdot \sum_{r=1}^n tp_r \cdot Np_r$ .

17. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos de acuerdo con la reivindicación No. 15 caracterizado porque el cálculo de las duraciones de los pulsos eléctricos que se emplearán en las rampas de pulsos para separar a las moléculas lineales de ADN en los minigeles del miniCHEF se realiza:

- i) suministrándole a las ecuaciones que describen la migración por pulso 'd' de las moléculas lineales de ADN en el minigel del miniCHEF los valores escogidos de campo eléctrico, temperatura y talla de las moléculas de menor (A) y de mayor (B) tamaño que serán analizadas,
- ii) calculando, mediante el empleo de dichas ecuaciones, los tiempos de reorientación (tr<sub>A</sub> y tr<sub>B</sub>, respectivamente) de ambas moléculas lineales de ADN,

III) calculando la rampa del único tiempo de pulso que se empleará como el promedio entre los tiempos de reorientación de la molécula menor y mayor ( $0.5 \cdot [tr_A + tr_B]$ ), cuando se desea que las moléculas de ADN de tamaños comprendidos entre la mayor y la menor estén incluidas en un solo patrón,

5 IV) calculando la rampa de pulsos que se empleará como una serie de duraciones de los pulsos eléctricos, que comienzan 1.5 veces por debajo del tiempo de reorientación de la molécula más pequeña y terminan 1.5 veces por encima del tiempo de reorientación de la mayor, con incrementos lineales entre ellos, o sea:  $tp_1 = tr_A / 1.5$ ,  $tp_2 = tp_1 + \Delta$ ,  $tp_3 = tp_1 + 2 \cdot \Delta$ , .. ,  $tp_n = 1.5 \cdot tr_B$ , donde  $\Delta = |(tp_1 - tp_n)/(n-1)|$  y  $n = te/(tp_1 + tp_n)$ ; siendo 'te' el tiempo de electroforesis,

10 V) seleccionando como duraciones de los pulsos eléctricos a emplear en los experimentos aquellos calculados en los pasos III) o IV).

18- Proceso para la tipificación rápida de microorganismos de acuerdo con la reivindicación No. 15 caracterizado porque el cálculo de las migraciones que tendrían las moléculas lineales de ADN en los minigeles de los miniequipos miniCHEF, así como la predicción de los patrones de bandas que brindarían dichas moléculas en dichos minigeles se realiza según los siguientes pasos:

- 20 i) se asume que la electroforesis se realiza en agarosa 1.5% y en TBE 0.5X,
- ii) definir los valores de campo eléctrico y temperatura del tampón que se emplearán en la electroforesis, así como los valores de tallas de las moléculas que se separarán en la electroforesis hipotética,
- 25 iii) se definen la cantidad de rampas (n) o veces que se cambiará la duración del tiempo del pulso, la cantidad de pulsos que se aplicará en cada rampa ( $Np_r$ ) y la duración de los pulsos en cada una de dichas rampas ( $tp_r$ ), se especifican las tallas de las moléculas que se desean analizar,

- iv) se calculan las distancias que migrarían todas las moléculas mencionadas en las condiciones ya especificadas de la corrida de electroforesis, el cálculo se realiza

$$\text{según } D = \sum_{r=1}^n d_r \cdot Np_r$$

- v) se presentan los resultados de los cálculos de migración de forma numérica o gráfica,

- vi) se repiten los pasos i) – v) hasta que se obtenga un patrón predicho que muestre una separación óptima entre las moléculas de ADN.

19. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y 13 caracterizado por disponer de un método para analizar las distancias migradas por las moléculas lineales de ADN en los minigeles del miniCHEF, método que consiste en

reemplazar en la ecuación  $D = \sum_{r=1}^n d_r \cdot Np_r$  los valores de las distancias 'D' que separan cada

banda del origen de migración y a partir de este reemplazo calcular, por interpolación inversa, la talla de las moléculas contenidas en las bandas, sus velocidades de migración y tiempos de

reorientación, siempre que la electroforesis se haya realizado a una intensidad de campo eléctrico comprendida entre 1 y 20 V/cm, a una temperatura entre 4 y 30°C, en agarosa al 1.5%,

en tampón TBE 0.5X y se hayan aplicado 'n' rampas de pulso, donde 'n' está entre 1 y 1000, método de cálculo que consta de los siguientes pasos:

- i) medir las distancias (D) que separan las bandas del origen de migración de los minigeles después de concluida la corrida de electroforesis,

- ii) definirle a la ecuación  $D = \sum_{r=1}^n d_r \cdot Np_r$  los valores empleados de campo eléctrico

(E), temperatura del tampón, número de rampas (n) de pulso, número de pulsos aplicados en cada rampa ( $np_r$ ), duración del pulso en cada rampa ( $tp_r$ ) y las distancias (D) que separan cada banda del origen de migración,

- iii) a partir de dichos datos, calcular las tallas de las moléculas presentes en las bandas

medidas mediante el empleo de la ecuación  $D = \sum_{r=1}^n d_r \cdot N_{pr}$  y de las ecuaciones

que describen 'd<sub>r</sub>' para los minigeles del miniCHEF, cálculo de talla que se realiza como sigue: (a) se estima la migración hipotética (Dt) que debería experimentar una molécula de ADN de 1000 pares de bases en las condiciones especificadas de electroforesis; (b) si esa migración hipotética (Dt) es mayor que la distancia real (D) medida para la banda que se está analizando, es decir (Dt > D), entonces el valor de talla de la molécula de ADN se incrementa en 1000 bp, (c) se repiten los pasos (a) y (b) hasta que la migración hipotética de la molécula de ADN es menor o igual que la distancia medida para dicha banda (Dt ≤ D), (d) se asume que las moléculas de ADN contenidas en dicha banda poseen un tamaño similar a la talla de la molécula de ADN que cumple la condición propuesta en (c), (e) el proceso se repite para todas las bandas medidas en el minigel,

- iv) una vez calculadas las tallas se acepta que los tiempos de reorientación y las velocidades de migración de las moléculas de cada banda analizada son aquellos

que en el paso (iii) brindaron valores de 'd<sub>r</sub>' tales que  $\sum_{r=1}^n d_r \cdot N_{pr} \leq D$ ,

- v) se presentan los resultados de forma numérica.

20. Proceso para la tipificación rápida de microorganismos de acuerdo con la reivindicación No.

18 caracterizado por brindar la representación gráfica de las migraciones de las moléculas lineales de ADN en condiciones especificadas de electroforesis, representación gráfica que se realiza:

- i) dibujando un rectángulo cuyas dimensiones son proporcionales a las del minigel real y dibujando dentro de dicho rectángulo otros rectángulos menores que representan a los pocillos donde hipotéticamente se depositarían las muestras de ADN,

- ii) dibujando, debajo de cada rectángulo pequeño o pocillo, líneas que representan las bandas de las moléculas de cada tamaño que se separarían en un minigel, líneas estas que se separarían del pocillo distancias proporcionales a las distancias que las moléculas de las diferentes tallas migrarían en el minigel real,
- 5      iii) asignando un color diferente a cada línea que se dibuja debajo de cada pocillo, color que es único para cada talla de moléculas de ADN, es decir empleando un código de colores que identificaría las tallas de las moléculas que hipotéticamente estarían contenidas en las bandas dibujadas como líneas.



10      21. Juego de reactivos para implementar el método no enzimático de preparación de muestras dentro del proceso para la tipificación rápida de microorganismos mediante electroforesis de campos pulsantes de acuerdo a la reivindicación No. 1, caracterizado porque está compuesto por:

- 15      (a) un molde para verter las suspensiones de células y obtener minibloques que contienen las células inmovilizadas en algún gel;
- (b) soluciones para el lavado de células;
- (c) soluciones para la Inmovilización de las células;
- (d) soluciones para la desproteínización de los ADN;
- 20      (e) soluciones de conservación de las muestras; y
- (f) soluciones para el lavado de los minibloques.



22. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 21 caracterizado porque la solución para el lavado de células está compuesta por EDTA 0.05 M, pH 7.5, si los microorganismos son levaduras.

25      23. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 21 caracterizado porque la solución para el lavado de células está compuesta por NaCl 0.15 M y EDTA 0.01 M, pH 8.0, si los microorganismos son las bacterias *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*.

24. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 21 caracterizado porque la solución para el lavado de células es NaCl 0.15 M, si el microorganismo es la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

5

25. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 21 caracterizado porque si el microorganismo es *Entamoeba histolytica*, las soluciones para el lavado de células son dos, una de ellas es PBS, pH 7.4 y la otra es una solución hipertónica que contiene NaCl 0.5 M, EDTA 0.05 M, Tris 0.01 M, pH 7.0.



10

26. Juego de reactivos de acuerdo con las reivindicaciones No. 21 a la No. 25 caracterizado porque las soluciones para la inmovilización de las células de los microorganismos mencionados están compuestas por agarosa de bajo punto de gelificación que se prepara a una concentración entre 1.5 y 2.0 % y es disuelta en las soluciones para el lavado de dichas células.

15

27. Juego de reactivos de acuerdo con las reivindicaciones No. 21 a la No. 25, caracterizado porque las soluciones para la desproteinización de las moléculas de ADN están compuestas por un tampón, un agente quelante, un detergente y un agente que rompe los puentes de hidrógeno.



20

28. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 27, caracterizado porque las soluciones para la desproteinización de las moléculas de ADN están compuestas por tris 0.01 M, EDTA 0.1 M, Sarkosyl 1 % y urea 4 M si dichas moléculas de ADN provienen de *S. cerevisiae*, *H. polymorfa* y *E. histolytica*.

25

29. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 27, caracterizado porque las soluciones para la desproteinización de las moléculas de ADN están compuestas por tris 0.01

M, EDTA 0.1 M, Sarcosyl 1 %, Nonidet 1 % y urea 4 M si dichas moléculas de ADN provienen de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

5 30. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 21, caracterizado porque la solución para lavar los minibloques que ya fueron tratados con la solución de desproteinización está compuesta por EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 8.0.

 10 31. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 21, caracterizado porque la solución para el lavado de los minibloques, que ya contienen moléculas de ADN que van a ser digeridas con enzimas de restricción, está compuesta por EDTA 0.5 mM, Tris 10 mM, pH 8.0.

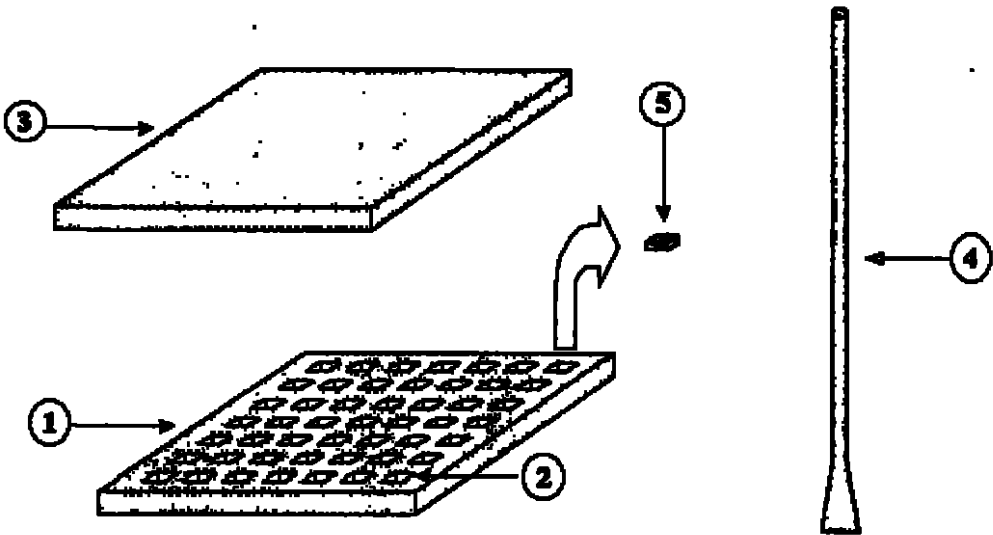
15 32. Juego de reactivos de acuerdo con la reivindicación No. 21, caracterizado porque la solución para la conservación de las moléculas de ADN Inmovilizadas en los minibloques, está compuesta por tampón EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 8.0.

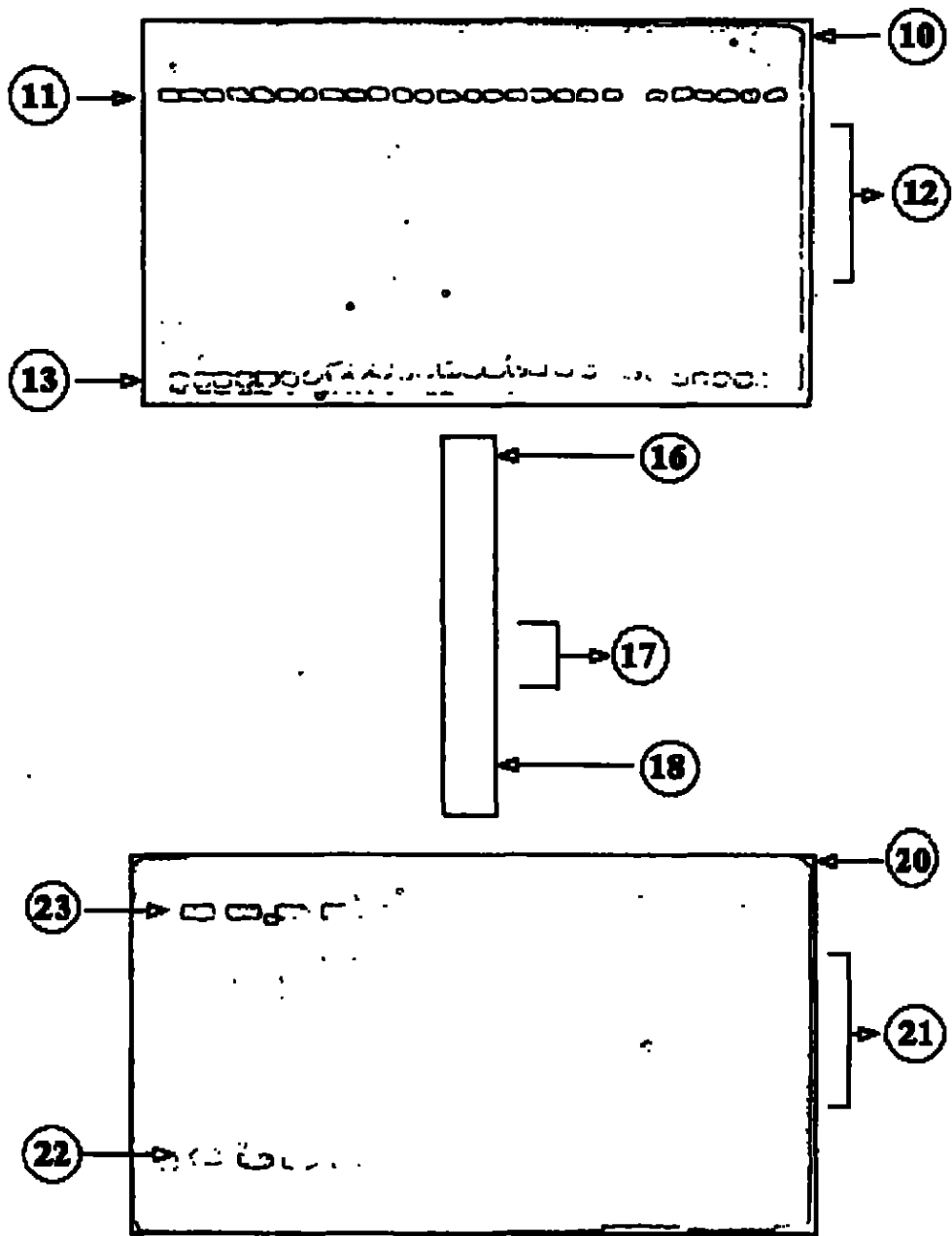


## PROCESO PARA LA TIPIFICACIÓN RÁPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADO

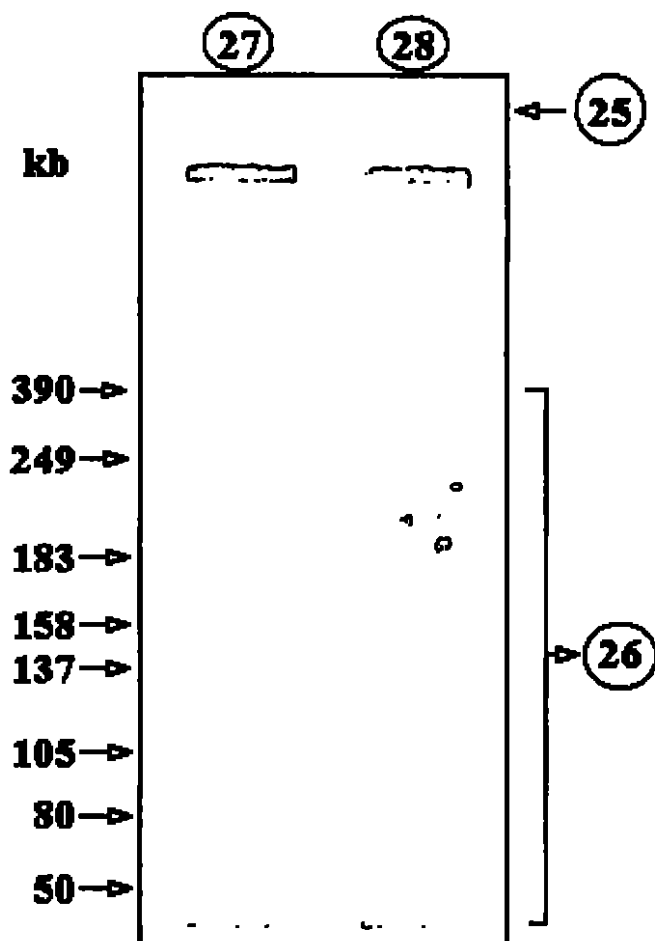
### RESUMEN

- 5 Se provee un proceso para tipificar rápidamente levaduras, parásitos y bacterias. Comprende los siguientes pasos: a) Preparar, en 5 a 60 minutos, ADN Intacto e Inmovilizado mediante un método que emplea un juego de reactivos que solo contiene solución tampón, un detergente, un agente quelante y un agente que rompe los puentes de hidrógeno. b) Separar moléculas de ADN Intactas o sus fragmentos de restricción usando miniequipos de electroforesis de campos pulsantes de los sistemas CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) y TAFE (Transversal Alternating Field Electrophoresis) en tiempos comprendidos entre 2.5 y 7 horas. c) 10 Seleccionar las condiciones óptimas que se aplicarán en el miniCHEF empleando un método que simula *a priori* los patrones electroforéticos que se obtendrían en dichos geles. d) Brindar los tiempos de reorientación, velocidades de migración y tallas de las moléculas sin emplear 15 marcadores de tallas pero valiéndose de un método que analiza distancias migradas.

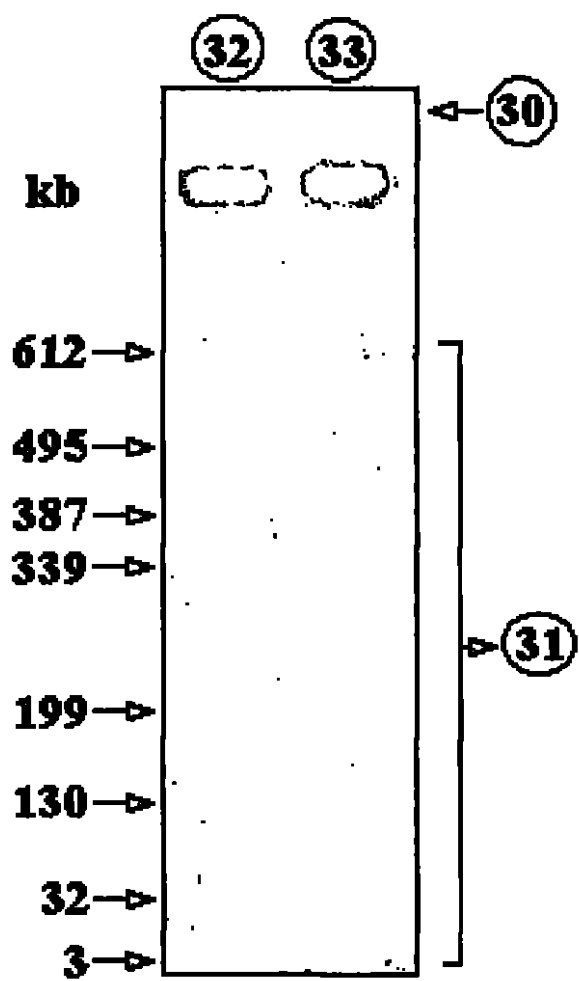


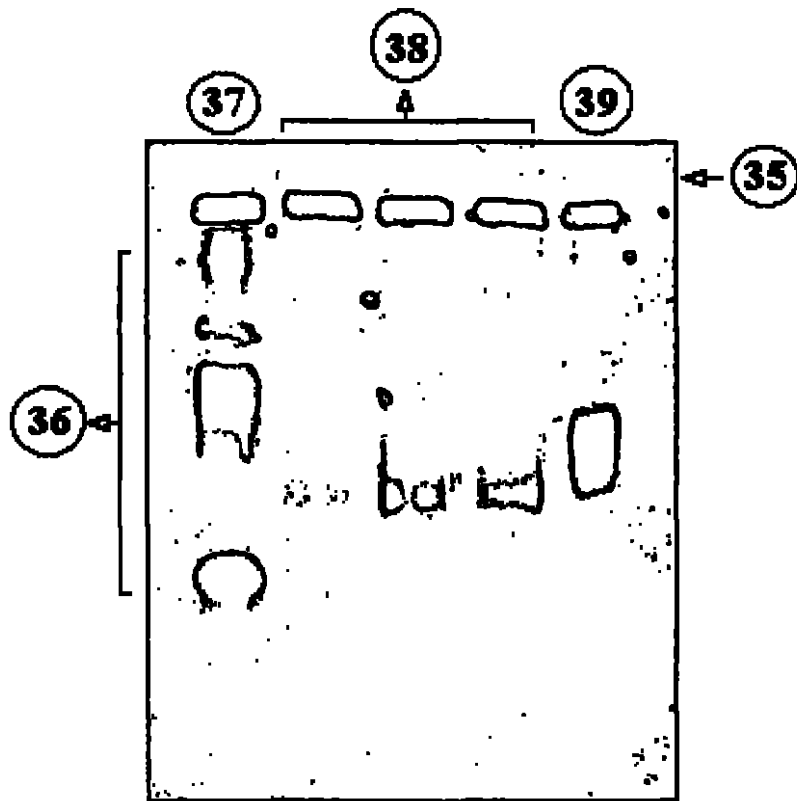


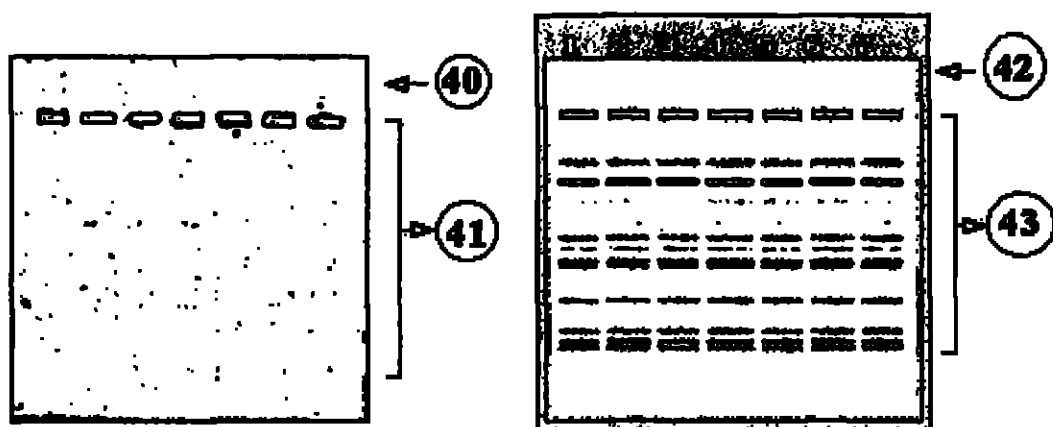
3/10

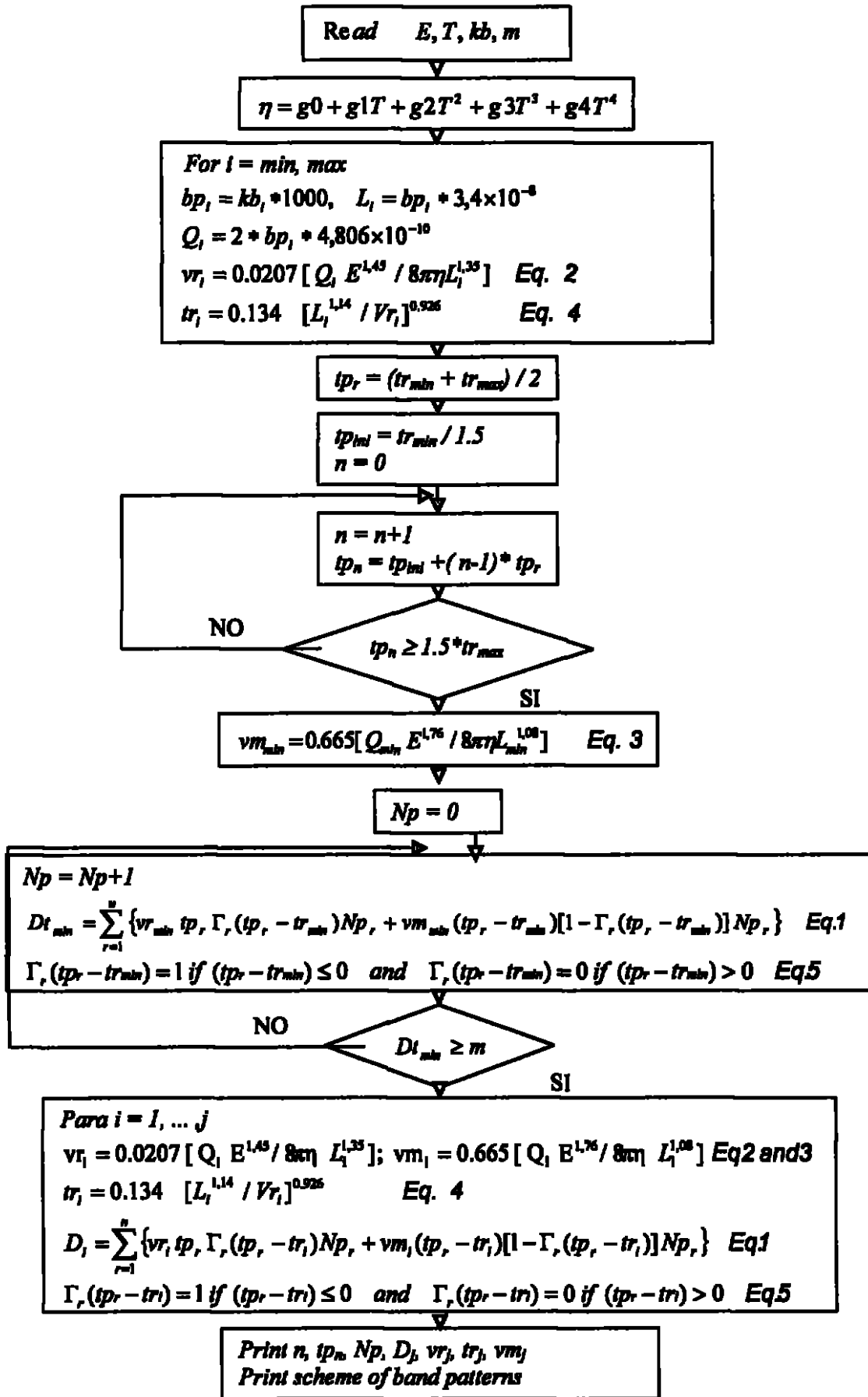


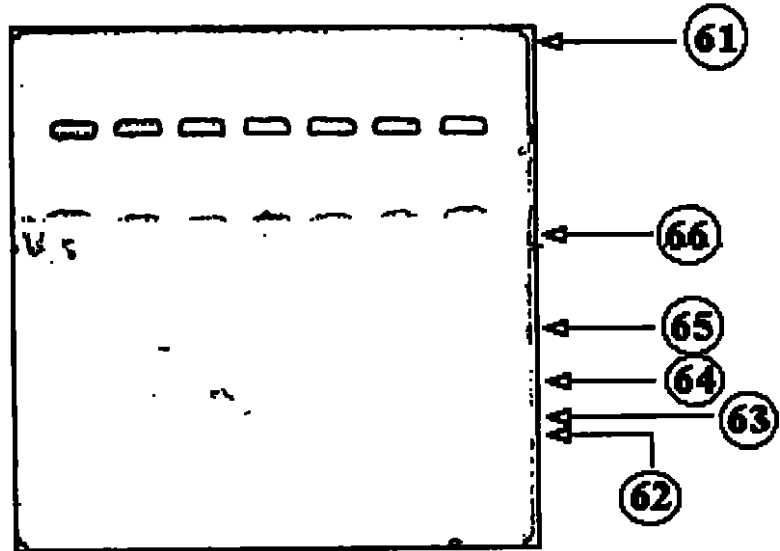
*[Handwritten mark]*

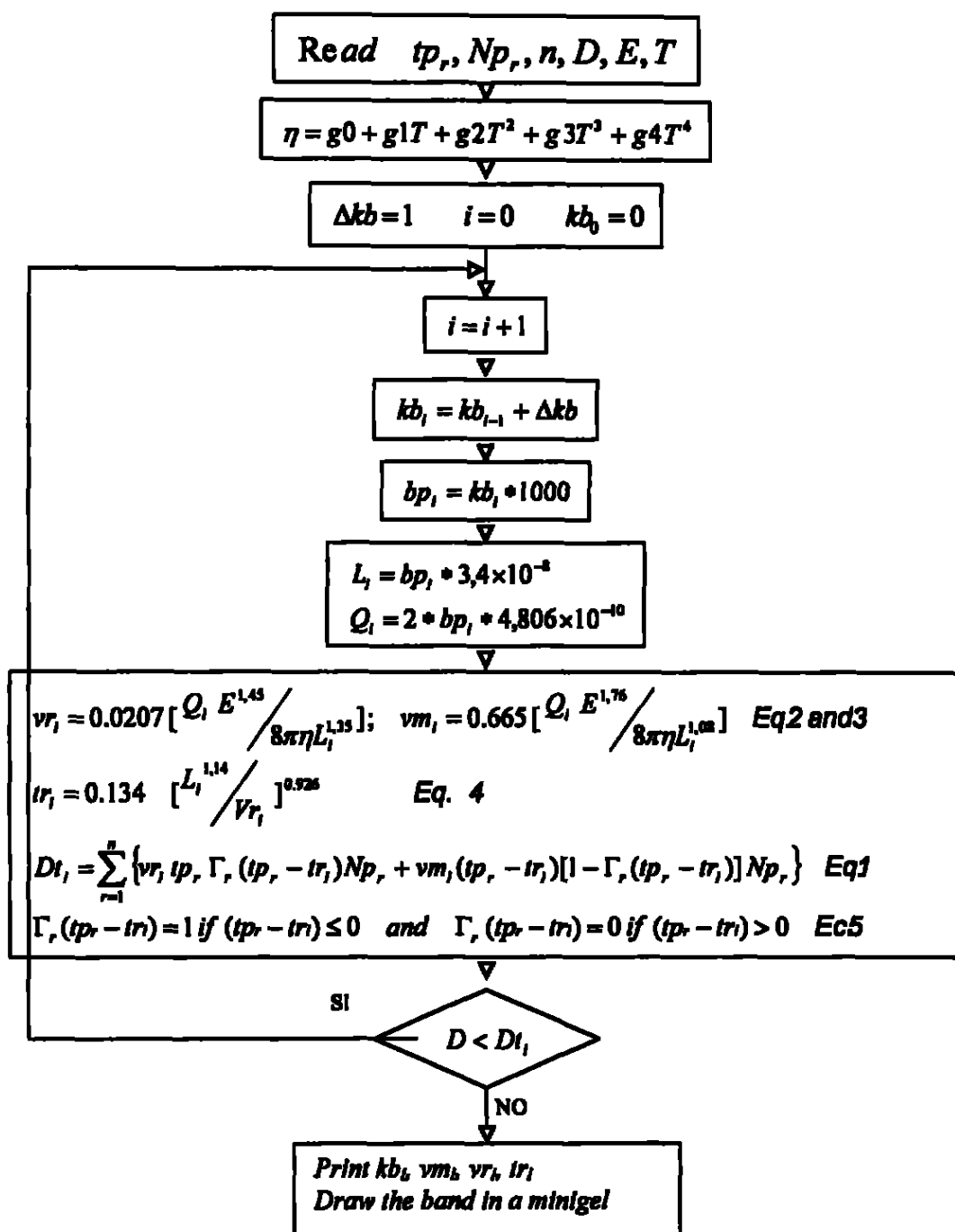


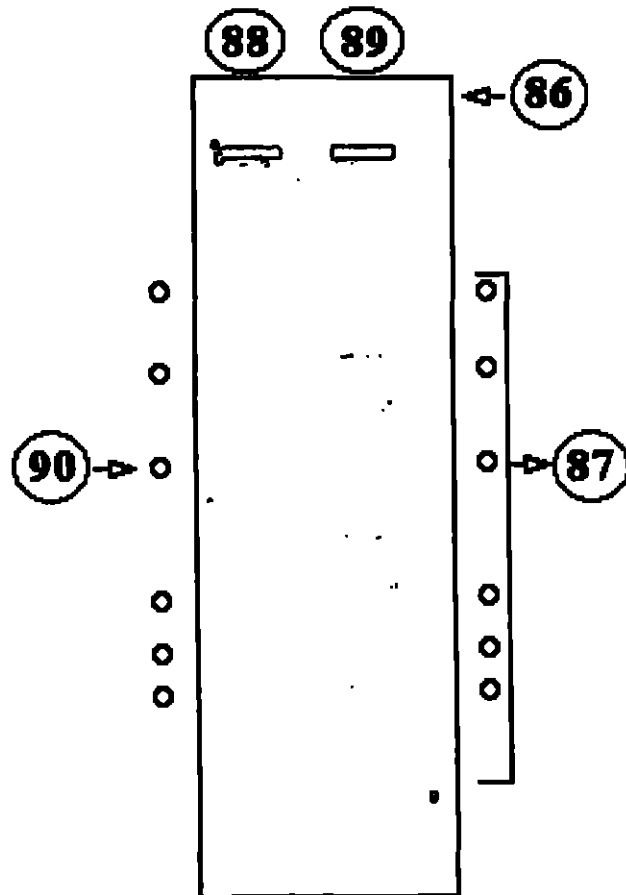












(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina Internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
16 de Mayo de 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 02/38802 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: C12Q 1/68, C12N 1/06, G01N 27/447

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CNIC) [CU/CU]; Ave. 25 No. 15202 Bq. a 152, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12 100 (CU).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU01/00008 ✓

(22) Fecha de presentación internacional:  
2 de Noviembre de 2001 (02.11.2001)

(72) Inventores; o

(73) Inventores/Solicitantes (para US solamente): LÓPEZ CÁNOVAS, Lilia [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle. 21A No. 20614 entre 206a y 214, Atabey, Playa, Ciudad de la Habana 12 100 (CU). RIVERÓN ROJAS, Ana María [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle. 21A No. 20614 entre 206a y 214, Atabey, Playa, Ciudad de la Habana 12 100 (CU). HIGGISON CLARKE,

(25) Idioma de presentación: español

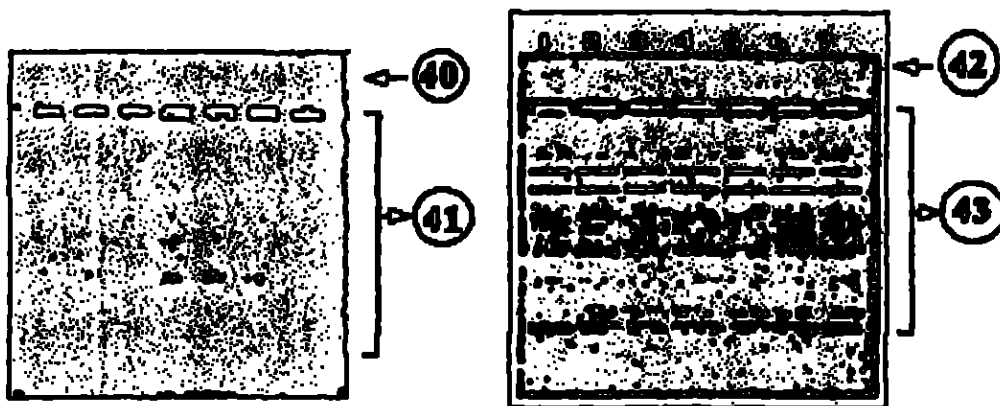
(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
2000/0247 7 de Noviembre de 2000 (07.11.2000) CU

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR RAPID TYPIFICATION OF MICROORGANISMS AND SET OF REAGENTS USED

(54) Título: PROCESO PARA LA TIPIFICACIÓN RÁPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADO



(57) Abstract: Disclosed is a method for rapidly typifying yeasts, parasites and bacteria. The method involves the following steps: a) Preparing intact and immobilized DNA within 5 to 60 minutes by means of a method which uses a set of reagents that only contains a buffer solution, a detergent, a chelating agent and an agent that breaks up the hydrogen bridges. b) Separating intact DNA molecules or their restriction fragments using pulsed field electrophoresis mini-equipment of systems CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) and TAFE (Transversal Alternating Field Electrophoresis) for time periods ranging between 2.5 and 7 hours. c) Selecting the optimal conditions that will be applied in the miniCHEF by using a method simulating a priori the electrophoretic patterns that would be obtained in said gels. d) Providing the reorientation times, migration speeds and molecule sizes without using size markers but using a method that analyzes migrated distances.

(57) Resumen: Se provee un proceso para tipificar rápidamente levaduras, parásitos y bacterias. Comprende los siguientes pasos: a) Preparar, en 5 a 60 minutos, ADN intacto e inmovilizado mediante un método que emplea un juego de reactivos que solo contiene solución tampón, un detergente, un agente quelante y un agente que

[Continúa en la página siguiente]

WO 02/38802 A1



David [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle. 176 Edif. BBB-3 entre 1ra y 5ta, Rpto. Flores, Ciudad de la Habana 12 100 (CU). SÁNCHEZ ALONSO, Axel [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle. 23a entre 230 y 234 Apto. 52, La Lisa, Ciudad de la Habana 13 600 (CU). OROZCO OROZCO, Esther [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Vía Carl No. 20, Fracc. Luis Enrique, Playatón Lindavista, México D.F. 07000 (CU). ARENCIBIA DÍAZ, Oscar [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle. 174 Edif. BBB-1 Apto. 6, Rpto. Flores, Playa, Ciudad de la Habana 12 100 (CU). ARIOSA ACUÑA, María Concepción [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle. B No. 658 Apto. 204 entre 27 y 29, Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana 10 400 (CU). CLARK DONDÉREZ, Hilda Teresa [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle. 25 No. 868 Apto. 1 entre A y B, Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana 10 400 (CU). GIGATO PÉREZ, Rogemar [CU/CU]; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle. 206 No. 1922 entre 19 y 21, Ansay, Playa, Ciudad de la Habana 12 100 (CU).

- (74) Mandatarios: HERRERA CABRERA, Violeta María; Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Ave. 25 No. 15202 Bq. a 158, Cibanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12 100 (CU).

(81) Estados designados (nacionales): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente suramericana (AM, AZ, BY, EG, EZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Publicadas

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

rompe los puentes de hidrógeno. b) Separar moléculas de ADN intactas o sus fragmentos de restricción usando miniequipos de electroforesis de campos pulsantes de los sistemas CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) y TAFE (Transversal Alternating Field Electrophoresis) en tiempos comprendidos entre 2.5 y 7 horas. c) Seleccionar las condiciones óptimas que se aplicarán en el miniCHEF empleando un método que simula a priori los patrones electroforéticos que se obtendrán en dichos gels. d) Brindar los tiempos de reorientación, velocidades de migración y tallas de las moléculas sin emplear marcadores de tallas pero valiéndose de un método que analiza distancias migradas.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/CU 81/00008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12Q1/68 C12N1/06 G01N27/447

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)

IPC 7 C12Q C12N G01N

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

Electronic data bases consulted during the international search (names of data bases used, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages              | Relevant to claim No. |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A        | US 4 473 452 A (CANTOR CHARLES R ET AL)<br>25 September 1984 (1984-09-25)<br>the whole document | 1-32                  |
| A        | US 4 861 448 A (CANTOR CHARLES R ET AL)<br>29 August 1989 (1989-08-29)<br>the whole document    | 1-32                  |
| A        | US 5 795 453 A (PANNETIER CHRISTOPHE)<br>18 August 1998 (1998-08-18)<br>the whole document      | 1-32                  |
| A        | GB 2 249 395 A (BIO RAD LABORATORIES)<br>6 May 1992 (1992-05-06)<br>the whole document          | 1-32                  |
|          | ---<br>-/--                                                                                     |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*X 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 (your double or priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- \*O document relating to an oral disclosure, test, exhibition or other means
- \*P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*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
- \*K 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
- \*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 cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*U document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 2002

Date of mailing of the international search report

11 04 2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 1201  
D-53000 Bonn, Germany  
Tel. (+49-228) 64-6464, Telex 61 651 epo d,  
Fax (+49-228) 64-6416

Authorized officer

VIZAN, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/CU 81/00088

| G.(continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
| A                                                 | NO 95 14768 A (GEN PROBE INC)<br>1 June 1995 (1995-06-01)<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1-32                  |
| X                                                 | ---<br>RIVERON, A. M. (1) ET AL: "Fast pulsed<br>field minigel electrophoresis of large DNA<br>molecules."<br>ANALYTICAL LETTERS, (1995) VOL. 28, NO.<br>11, PP. 1973-1991. , XP082192669<br>the whole document                                                                                                                                                                     | 1-32                  |
| X                                                 | ---<br>RIVERON, A. M. (1) ET AL: "Hardware and a<br>memory resident program for simultaneous<br>control and switching of pulsed field gel<br>electrophoresis."<br>ANALYTICAL LETTERS, (1995) VOL. 28, NO. 5,<br>PP. 845-860. , XP082192670<br>the whole document                                                                                                                    | 1                     |
| Y                                                 | ---<br>LOPEZ-CANOVAS, L. ET AL: "Rapid<br>non-enzymatic DNA deproteinization in<br>agarose miniplugs."<br>ANALYTICAL LETTERS, (1996) VOL. 29, NO.<br>12, PP. 2879-2884. , XP082192671<br>the whole document                                                                                                                                                                         | 1                     |
| X                                                 | ---<br>LOPEZ-CANOVAS, L. ET AL: "Kinetic<br>properties of DNA migration under clamped<br>homogeneous electric field conditions DNA<br>size, migration velocities and<br>reorientation time determined in a single<br>clamped homogeneous electric field run."<br>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, (MAY 8, 1998)<br>VOL. 806, NO. 1, PP. 123-139. ,<br>XP082192672<br>the whole document | 2-9,<br>21-32         |
| Y                                                 | ---<br>LOPEZ-CANOVAS, L. ET AL: "Kinetic<br>properties of DNA migration under clamped<br>homogeneous electric field conditions DNA<br>size, migration velocities and<br>reorientation time determined in a single<br>clamped homogeneous electric field run."<br>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, (MAY 8, 1998)<br>VOL. 806, NO. 1, PP. 123-139. ,<br>XP082192672<br>the whole document | 1                     |
| X                                                 | ---<br>HIGGINSON, D. (1) ET AL: "Non-enzymatic<br>deproteinization of immobilized DNA<br>suitable for pulsed field gel<br>electrophoresis."<br>ANALYTICAL LETTERS, (1994) VOL. 27, NO. 7,<br>PP. 1255-1264. , XP082192673<br>the whole document                                                                                                                                     | 10-20                 |
| X                                                 | ---<br>HIGGINSON, D. (1) ET AL: "Non-enzymatic<br>deproteinization of immobilized DNA<br>suitable for pulsed field gel<br>electrophoresis."<br>ANALYTICAL LETTERS, (1994) VOL. 27, NO. 7,<br>PP. 1255-1264. , XP082192673<br>the whole document                                                                                                                                     | 2-9,<br>21-32         |
| X                                                 | ---<br>RIVERON, A. M. ET AL: "Circular and<br>linear DNA molecules in the Entamoeba<br>histolytica complex molecular karyotype."<br>EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL, (2000) VOL.<br>29, NO. 1, PP. 48-56. , XP082192674<br>the whole document                                                                                                                                           | 10-20                 |
|                                                   | ---<br>-/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                       |

Form PCT/ISA/210 (publication of second sheet) (July 1998)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/CJ 81/00008

## D. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category: | Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | <p>SCHMARTZ, D.C. ET AL: "Separation of yeast chromosome sized dnas by pulsed field gradient gel electrophoresis" CELL, vol. 37, no. 1, 1984, pages 67-75, XP002192679<br/>the whole document</p> | 1-32                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CU 01/00008

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|----------------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| US 4473452 A                           | 25-09-1984       | AT 40752 T              | 15-02-1989       |
|                                        |                  | AU 565758 B             | 24-09-1987       |
|                                        |                  | AU 2333484 A            | 04-06-1984       |
|                                        |                  | CA 1207275 A            | 08-07-1986       |
|                                        |                  | DE 3379177 D            | 16-03-1989       |
|                                        |                  | DK 349984 A             | 17-07-1984       |
|                                        |                  | EP 0125310 A            | 21-11-1984       |
|                                        |                  | FI 842872 A,B.          | 17-07-1984       |
|                                        |                  | NO 842744 A             | 05-07-1984       |
|                                        |                  | NO 172156 B             | 01-03-1993       |
|                                        |                  | NO 8402001 A            | 24-05-1984       |
|                                        |                  | US 4861448 A            | 29-08-1989       |
|                                        |                  | US 4695548 A            | 22-09-1987       |
| US 4861448 A                           | 29-08-1989       | US 4473452 A            | 25-09-1984       |
|                                        |                  | US 4695548 A            | 22-09-1987       |
|                                        |                  | AT 40752 T              | 15-02-1989       |
|                                        |                  | AU 565758 B             | 24-09-1987       |
|                                        |                  | AU 2333484 A            | 04-06-1984       |
|                                        |                  | CA 1207275 A            | 08-07-1986       |
|                                        |                  | DE 3379177 D            | 16-03-1989       |
|                                        |                  | DK 349984 A             | 17-07-1984       |
|                                        |                  | EP 0125310 A            | 21-11-1984       |
|                                        |                  | FI 842872 A,B.          | 17-07-1984       |
|                                        |                  | NO 842744 A             | 05-07-1984       |
|                                        |                  | NO 172156 B             | 01-03-1993       |
|                                        |                  | NO 8402001 A            | 24-05-1984       |
| US 5795455 A                           | 18-08-1998       | FR 2693209 A            | 07-01-1994       |
|                                        |                  | AT 161500 T             | 16-01-1998       |
|                                        |                  | CA 2139306 A            | 20-01-1994       |
|                                        |                  | DE 69316028 D           | 05-02-1998       |
|                                        |                  | DE 69316028 T           | 13-08-1998       |
|                                        |                  | EP 0672104 A            | 20-09-1995       |
|                                        |                  | NO 9401581 A            | 20-01-1994       |
|                                        |                  | JP 8507365 T            | 06-08-1996       |
| GB 2249395 A                           | 06-05-1992       | CA 2052037 A            | 03-04-1992       |
|                                        |                  | DE 4132694 A            | 16-04-1992       |
|                                        |                  | FR 2670683 A            | 26-06-1992       |
|                                        |                  | IT 1250936 B            | 22-04-1995       |
|                                        |                  | JP 4264254 A            | 21-09-1992       |
| NO 9514768 A                           | 01-06-1995       | AU 693836 B             | 09-07-1998       |
|                                        |                  | AU 1183795 A            | 13-06-1995       |
|                                        |                  | CA 2176496 A            | 01-06-1995       |
|                                        |                  | EP 0657530 A            | 14-06-1995       |
|                                        |                  | JP 9505479 T            | 03-06-1997       |
|                                        |                  | KR 230909 B             | 01-12-1999       |
|                                        |                  | US 5786200 A            | 28-07-1998       |
|                                        |                  | US 5837452 A            | 17-11-1998       |

## REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

|                                                                                      | USUARIO | RADICADOR |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|
| <b>PATENTE DE INVENCION</b> ✓                                                        | ( )     | ( )       |
| Indicación de que se solicita la concesión de una patente.                           | ✓       | ( )       |
| Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud | ✓       | ( )       |
| Descripción de la invención.                                                         | ✓       | ( )       |
| Dibujos de ser estos pertinentes                                                     | ✓       | ( )       |
| Comprobante de Pago de las tasas establecidas                                        |         |           |

COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )

### DISEÑO INDUSTRIAL ( )

|                                                                                                           |     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial                                            | ( ) | ( ) |
| Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         | ( ) | ( ) |
| Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño | ( ) | ( ) |
| Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             | ( ) | ( ) |

COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )

### ESQUEMA DE TRAZADO ( )

|                                                                                    |     |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado                    | ( ) | ( ) |
| Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | ( ) | ( ) |
| Representación gráfica del esquema de trazado                                      | ( ) | ( ) |
| Comprobante de pago de las tasas establecidas                                      | ( ) | ( ) |

COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )

Firma Responsable

ANDREA POSSE

Fecha



2020  
Bogotá, D.C.,

**Doctora:**  
**Margarita Castellanos Abondano.**  
**Apoderada**  
**Centro Nacional de Investigaciones Científicas.**

**Oficio N° 67276**

|                |                                   |                       |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------|
| <b>ASUNTO:</b> | <b>Radicación N°</b>              | <b>03-38031</b>       |
|                | <b>Solicitud Internacional</b>    | <b>PCT/CU01/00008</b> |
|                | <b>Fecha inicio fase nacional</b> | <b>07/06/2003</b>     |
|                | <b>Trámite</b>                    | <b>011</b>            |
|                | <b>Evento</b>                     | <b>379</b>            |
|                | <b>Actuación</b>                  | <b>430</b>            |
|                | <b>Folios</b>                     | <b>001</b>            |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 28-k) Decisión 486).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

**ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL**  
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 05 SET 2003