

CASTELLANOS & CO.
 A B O G A D O S
 Calle 94 A No. 7 A - 09
 Bogotá, D.C., COLOMBIA

Señora

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-038031- -00007-0000

Fecha: 2008-05-08 14:33:38 Dep: 2020 NUECREACION
 Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
 Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 15

Ref.: Expediente No. **03.038.031**

Solicitud de Patente de Invención para: **PROCESO PARA LA TIPIFICACION RAPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADOS**

Solicitante: **CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC)**

RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pié de mi firma, atentamente me permito presentar respuesta al oficio No. 1612 notificado por fijación en lista el 8 de febrero de 2008 correspondiente al examen de fondo, estando dentro del término legal en los siguientes términos:

Claridad de la Solicitud

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 14 reivindicaciones las cuales sustituyen a las antiguas reivindicaciones 1-14. En el nuevo capítulo reivindicatorio no se adicionó materia nueva, sino se cancelaron las reivindicaciones que reclamaban el proceso de tipificación rápida de bacterias ya que, tal y como afirma el señor examinador, los objetivos de las etapas del mismo no difieren de los conocidos en el estado del arte. Por esta razón, se limitó el alcance de la invención a la composición y método de uso del conjunto de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos que permiten preparar ADN intacto e inmovilizado de *E. coli*, *P. aeruginosa* o *S. aureus*, y el molde flexible y autoclavable para inmovilizar las células de esos microorganismos.

Adicionalmente, presento dos nuevas reivindicaciones independientes 1 y 9 y doce nuevas reivindicaciones enmendadas dependientes. Las reivindicaciones 2-8 son dependientes de la nueva reivindicación 1, mientras que las nuevas reivindicaciones 10 y 11 son dependientes de la 9. Las nuevas reivindicaciones 12-14 son dependientes de las nuevas reivindicaciones 1 y 9.

CASTELLANOS & CO.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

La nueva reivindicación 1 reclama la composición de un conjunto de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos, las cuales conforman un juego de reactivos, y que se utilizan secuencialmente de acuerdo con un método de uso para preparar moléculas de ADN intactas e inmovilizadas a partir de células de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*. La nueva reivindicación 1 no contiene materia nueva. El contenido reivindicado fue completamente revelado en la Esencia de la Invención.

Ahora bien, remito al señor examinador a revisar en la solicitud de patente las siguientes citas:

-Página 17, línea 3: *'La presente invención provee un proceso y un juego de reactivos...'*

-Página 17, líneas 7 a la 12: *'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,...'*

-Página 18, líneas 3 a la 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.'*

-Página 18, líneas 10 a la 14: *'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 mediante diálisis. En los minibloques donde se inmovilizaron las células se obtiene ADN intacto inmovilizado.'*

-Página 19, líneas 5 a la 19:

'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
Entamoeba histolytica	PBS pH 7.4
Pseudomonas aeruginosa	NaCl 0.15 M
Staphylococcus aureus, Escherichia coli	NaCl 0.15 M, EDTA 0.01 M pH 8.0

→ como se saca
el fujon (os) +
crea fujon?

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

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).'

Las nuevas reivindicaciones 2 a la 8 son dependientes de la 1 y reclaman la composición específica del conjunto de disoluciones que conforman el juego de reactivos. El contenido de estas reivindicaciones está sustentado en la Esencia de la Invención (ver citas anteriores) y en los Ejemplos 3, 4 y 8.

La nueva reivindicación 9 reclama los moldes flexibles para formar minibloques de agarosa que contienen células bacterianas, así como su método de uso. La materia reclamada en la reivindicación 9 está totalmente sustentada en la Esencia de la Invención:

Adicionalmente, remito al señor examinador a ver las siguientes citas:

'...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...' (página 17, líneas 10-14).

'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.' (página 20, línea 20 a la página 18, línea 5)

CASTELLANOS & CO.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Las reivindicaciones 10 y 11 dependen de la 9 y su contenido se encuentra sustentado en la Esencia de la Invención ver Ejemplo 1, las citas anteriores y la Figura 1.

Las reivindicaciones N° 12 a la 14 poseen dependencias múltiples de las reivindicaciones N° 1 y 9. Las mismas reivindican el método de uso del juego de reactivos y el molde flexible para preparar ADN intacto e inmovilizado de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*. Su contenido está sustentado en los Ejemplos 3, 4 y 8 de la Esencia de la Invención.

Las evidencias experimentales acerca de la solución positiva de la problemática, es decir sobre la calidad de las muestras de moléculas de ADN intacto e inmovilizado de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, que son preparadas con el juego de reactivos compuesto por las disoluciones reclamadas en esta solicitud y el molde flexible, son que estas moléculas se digieran totalmente con enzimas de restricción, que no se degraden o fraccionen durante el tratamiento y que cuando se sometan a Electroforesis de Campos Pulsantes (ECP) se obtengan patrones de bandas nítidos, en los cuales no aparezca barrido (señal de degradación o ruptura mecánica de las moléculas) con bandas con la misma forma del pozo de aplicación y semejante grosor en todas las carrileras. Estas evidencias se pueden apreciar en las Figuras 3, 4 y 10.

En la Esencia de la Invención también se muestran otros ejemplos de preparación de ADN intacto e inmovilizado de otros microorganismos en los cuales se utiliza el molde flexible (Ejemplo 2; Figura 2 y pie de la misma). Estas también son evidencias experimentales de que durante la inmovilización de las células en los moldes se producen bloques de tamaños homogéneos ya que en los patrones de bandas después del análisis de las moléculas de ADN en ECP se obtienen bandas de semejante grosor en todas las carrileras y con formas semejante al pozo de aplicación. No se reclama la inmovilización de células diferentes a las bacterianas en bloques de agarosa formados en esos moldes en aras de mantener la unidad de la invención. No obstante, el Ejemplo 2 y la Figura 2 aportan evidencias experimentales adicionales de la utilidad y funcionalidad del molde flexible que se reclama en la solicitud.

Nivel Inventivo

La materia que se reclama en la presente solicitud no está comprendida dentro del estado de la técnica previo a la presentación de esta solicitud. No se conocían, al momento de la solicitud, que disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos fueran capaces de modificar la pared celular de *P. aeruginosa*, *E. coli* o *S. aureus* y liberar y desproteínizar sus moléculas de ADN para que pudieran ser analizadas mediante ECP. Lo usual es que se emplearan reactivos biológicos (enzimas líticas y proteasas) para lisar las células inmovilizadas y desproteínizar los ADN. Un ejemplo de ello, es el protocolo publicado por R. Gauton en J. of Clin. Microbiol., 35, 1997 (D1). La única similitud entre lo reclamado en esta solicitud y lo publicado en D1 es que el método de uso del conjunto de disoluciones y el molde flexible permiten la preparación de ADN intacto e inmovilizado de bacterias de calidad para ser analizado mediante ECP en menos de dos horas y el protocolo propuesto en D1 lo realiza en aproximadamente en 2 a 3 horas. Si embargo, en D1 se utilizan enzimas líticas y proteasas,

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

las cuales NO son utilizadas en esta solicitud. En las nuevas reivindicaciones donde se reclama el método de uso de las disoluciones y el molde (Nº 12-14) no se pretende reivindicar la duración, ni rapidez de dicho método de uso sino solamente la secuencia de etapas de dicho método de uso lo cual incluye cuales disoluciones del juego de reactivos se utilizarían para preparar el ADN intacto e inmovilizado de *E. coli*, *P. aeruginosa* o *S. aureus*. Se incluye el tiempo de duración de algunas de las etapas ya que este es una característica física inherente a algunas de las disoluciones utilizadas.

Hasta el momento, no había sido demostrado que las disoluciones que contienen agentes quelantes, detergentes y urea eran capaces de liberar los ADN de bacterias para que fueran digeridos con enzimas de restricción y posteriormente analizados mediante ECP (Nivel Conocido de la Técnica). Lo único conocido era que disoluciones conteniendo urea y detergentes permitían la desproteínización de ADN de *S. cerevisiae*. Por ejemplo, El tercer párrafo de la sección de Introducción del documento 'Non-enzymatic deproteinization...' (Analytical Letters (1994) vol 27, Nº 7, pp. 1255-1264) describió '... un método de desproteínización de las moléculas de ADN para la preparación de ADN de talla cromosómica. El método utiliza disoluciones que contienen urea, detergente o ambos combinados para disociar los complejos de ADN-proteínas'. Sin embargo, los resultados presentados en el cuerpo del documento demostraron solamente la obtención de ADN de *S. cerevisiae* de tamaño cromosómico de calidad para ser analizado mediante Electroforesis de Campos Pulsantes después de la incubación de los protoplastos de *S. cerevisiae* con urea y un detergente. Ese procedimiento reportado fue simplificado en el documento 'Rapid non enzymatic...' (Analytical Letters, (1996) vol 29, Nº 12, pp 2079-2084) eliminando el paso de formación de protoplastos de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la extensión de esta información para la preparación de ADN inmovilizado de *P. aeruginosa*, *E. coli* o *S. aureus* no es de ninguna forma una tarea obvia para una persona entrenada en el arte de preparar ADN debido a las siguientes evidencias técnicas y científicas:

- Los mecanismos por los cuales las disoluciones que contienen urea y detergentes rindieron ADN inmovilizado de *S. cerevisiae* de buena calidad para ser analizado mediante Electroforesis de Campos Pulsantes no fueron revelados en la información publicada previamente a la presentación de esta aplicación.
- *S. cerevisiae* es un organismo eucarionte. La pared celular de las especies de levaduras contienen como principales componentes β -glucanos y quitina. La composición de las mencionadas paredes celulares difiere de las de las bacterias. El principal componente de las paredes celulares de la bacterias son los peptidoglicanos; otros componentes son ácido teicoico, lipoproteínas y lipopolisacáridos. Por otra parte, la mayoría de los métodos conocidos para la extracción de ADN de levaduras requieren de enzimas, tales como zimolasa, que tiene especificidades diferentes de las que se utilizan para lisar las paredes celulares bacterianas. Por ejemplo, para formar esferoplastos de células de *E. coli* y *P. aeruginosa* se requiere lisozima, mientras que para formar los de *S. aureus* es necesario lisostafina. Por tanto, para la preparación de ADN de *S. cerevisiae* o bacterias se utilizan diferente enzimas en el paso de ruptura de las paredes celulares. En el aparte nivel conocido de la técnica/características de las soluciones técnicas análogas se presentan varios ejemplos.

CASTELLANOS & CO.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Por tanto, si hasta el momento el mecanismo de acción de las disoluciones publicadas previamente a la presentación de esta aplicación eran desconocidas; y *S. cerevisiae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* requieren diferentes enzimas para romper sus paredes celulares, la inclusión de urea y detergentes en las disoluciones utilizadas para romper las paredes celulares bacterianas no es una tarea obvia. De aquí, que los autores de la solicitud de patente no tenían disponible ninguna información publica que indicara que las disoluciones utilizadas para romper las paredes celulares de *S. cerevisiae* podrían actuar sobre los componentes de las paredes celulares bacterianas.

- Argumentos adicionales forman parte del 'know-how' de la invención y por eso no fueron revelados en la solicitud de patente. Por ejemplo, las paredes celulares de *P. aeruginosa* se rompen antes de la inmovilización y no se obtienen moléculas de ADN intactas, si las células de este microorganismo son lavadas e inmovilizadas en las disoluciones que se utilizan para lavar e inmovilizar las células de *S. cerevisiae*, o *E. coli*, o *S. aureus*. Esto demuestra que no se pueden deducir generalizaciones a partir de la información conocida del estado del arte.
- La utilización de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos para tratar las células inmovilizadas, permitió que la composición de la disolución de lavado de las moléculas de ADN sean solamente también reactivos químicos y que no fuera sea necesario utilizar inhibidores de proteasas o largos tiempos de lavados como está establecido en el estado del arte.

Resumen de las condiciones que hacen diferente a la presente invención en relación a D1

Solicitud	D1
-Se provee un conjunto de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos para preparar ADN intacto e inmovilizado de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> o <i>P. aeruginosa</i> , un molde para inmovilizar las células de estos microorganismos y un método de uso del conjunto de disoluciones y el molde	-Se provee un protocolo rápido para tipificar <i>E. coli</i> y otros organismos Gram-negativos en un DIA. Este incluye la preparación de ADN y la realización de electroforesis de los fragmentos de restricción de las moléculas de ADN preparadas previamente
-Las disoluciones propuestas solo contienen reactivos químicos: Tris, EDTA, NaCl, Sarcosyl, Nonidet P-40, o Urea (dependiendo de cual disolución sea). La utilización secuencial de un grupo de las 7 disoluciones reclamadas permite la preparación de ADN intacto e inmovilizado de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> o <i>P. aeruginosa</i> .	-Las disoluciones utilizadas contienen enzimas líticas (lizosima) y proteolíticas (proteínasa K)
-Se revela un molde flexible y autoclavable para la inmovilización de las células de las bacterias.	-Para la inmovilización de las células se utiliza un molde como el conocido en el estado del arte. (Nivel Conocido de la Técnica, pág. 11, línea 11 a pág.12, línea 12).
-Los métodos de uso del juego de reactivos y de los moldes flexibles implica la utilización secuencial de un grupo de las 7 disoluciones	-El método de preparar las muestras es común para todos los microorganismos gram-negativos ensayados. En todos los casos

CASTELLANOS & CO.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

que componen el juego de reactivos	implica la utilización de las mismas disoluciones
------------------------------------	---

A partir de lo publicado por Gautom (D1) no era posible deducir que disoluciones que contienen urea eran capaces de liberar y desproteínizar las moléculas de ADN bacteriana y que la utilización secuencial del conjunto de disoluciones que se reclama permitiría la preparación de ADN intacto e inmovilizado de *P. aeruginosa*, *E. coli* o *S. aureus*. Uno de los argumentos para realizar la afirmación anterior es que el mecanismo de acción de la Lisozima y la Proteinasa K es totalmente diferente al de las disoluciones que se reclaman en este trabajo.

En la actualidad continúan utilizándose reactivos enzimáticos costosos para preparar ADN intacto e inmovilizado de bacterias, a pesar de las informaciones conocidas del estado del arte y que en este momento las enfermedades infecciosas permanecen siendo un serio problema emergente de salud. Este hecho provee evidencias adicionales de que no es obvio deducir generalizaciones a partir de la información conocida del estado del arte.

De aquí que el conjunto de disoluciones que se reclaman en la solicitud posea actividad inventiva. La simplicidad de la composición de las disoluciones que se reclaman en esta invención: sales, agentes quelantes, detergentes, disoluciones tamponadas y un agente químico que rompe los puentes hidrógenos (urea) facilita su aplicación industrial ya que pueden ser preparadas fácilmente, así como producidas en forma de un juego de reactivos en instalaciones con pocos requerimientos tecnológicos.

En la solicitud de patente se revela un molde que puede estar compuesto de diferentes materiales flexibles y forma minibloques individuales de tamaños idénticos conteniendo células inmovilizadas.

El molde flexible permite ser doblado para despegarle fácilmente los minibloques de él, y de esta forma los minibloques puedan caer directamente dentro de la disolución de tratamiento y así no es necesario cortarlos, lo cual garantiza que se formen bloques de tamaños homogéneos y que no sea necesario manipularlos con aditamentos adicionales. Esta propiedad de ser flexible lo diferencia de las soluciones conocidas en el estado del arte que describen moldes rígidos que no pueden ser doblados. La propiedad de generar bloques del tamaño de los que serán utilizados también lo diferencia de las soluciones conocidas en el estado del arte en las que los bloques se forman de dimensiones diferentes a las que se colocan en los geles y al momento de utilizarlos hay que cortarlos con otros aditamentos.

Los materiales flexibles empleados para construir el molde descrito en la solicitud de patente pueden ser esterilizados en autoclave. Los moldes que pueden ser esterilizados en autoclave son útiles para tipificar bacterias patógenas porque ellos incrementan la bioseguridad del proceso. Los moldes conocidos con anterioridad están compuestos por materiales que no pueden ser esterilizados en autoclave.

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

El molde reivindicado en la presente solicitud permite formar minibloques individuales e idénticos, mientras que los moldes conocidos en el estado del arte forman tiras de agarosa que tienen que ser cortadas para obtener los minibloques lo cual constituye una manipulación adicional. Cuando las tiras de agarosa son cortadas pueden obtenerse minibloques de diferentes tamaños. El uso de minibloques de diferentes tamaños afecta la reproducibilidad de los patrones de bandas.

La novedad de esta parte de la invención es la estructura (forma) del molde y las características físicas que le confieren los materiales flexibles utilizados para su construcción, por ej. silicona. Los materiales flexibles poseen la propiedad de poder ser esterilizados por autoclave y doblados, así como también mayor durabilidad, por ej. el molde de acrílico es mas frágil. El molde descrito en esta solicitud permite obtener directamente minibloques individuales sin realizar manipulaciones adicionales. Por otra parte, la construcción de estos moldes es mas simple, ya que los materiales flexibles pueden ser fundidos y los moldes contruidos en un 'pre-molde' diseñado previamente para que le confiera la forma requerida al molde de formar minibloques independientes. Esta tecnología facilita la producción industrial del molde. Por último, los moldes de acrílico tienen que ser contruidos uno a uno mediante carpintería de plástico.

Los argumentos anteriores respaldan que la materia reclamada en las reivindicaciones 1-14 requiere actividad inventiva.

En conclusión, solicito a su Despacho conceder el privilegio de patente de invención a la presente solicitud toda vez que se ha demostrado que la misma es inventiva en vista del documento D1.

Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio
- Formulario de Modificaciones
- Recibo de Pago

De la Señora Jefe,


Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. 39.779.654 de Usaquén

T.P.A. No. 70819 del C. Sup. de la Judicatura

Calle 94 A No. 7 A - 09

Teléfonos: 610 74 20

Bogotá, D.C., - 8 MAYO 2008

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①	SOLICITUD DE:	
	☐ Corrección de Error Material	☒ Modificación a una solicitud

② SOLICITANTE	Nombre: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC)	IDENTIFICACIÓN	
	Dirección: Ave. 25 No. 15202 esq a 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100, CUBA	C.C. ☐	NIT ☐
	Nacionalidad o Domicilio: CUBA	C.E. ☐	Otro ☐
		Cual _____	
	Teléfono: _____ Fax: _____	Número _____	
	E-mail: _____		
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.	IDENTIFICACIÓN	
	Dirección: CALLE 94A No. 7A-09	C.C. ☒	NIT ☐
	Teléfono: 610 74 20 Fax: 610 07 06	C.E. ☐	Otro ☐
	E-mail: info@castellanosyco.com	Cual _____	
		Número 39'779.654	TPA 70.819

④	Número de Expediente:	03.038.031
---	-----------------------	------------

⑤	Descripción de la corrección o modificación solicitada:
	Presento nuevo pliego reivindicatorio sobre el cual solicito se otorgue el privilegio de patente.

⑥	Comprobante de pago No.	08-34,121	Fecha	28 de abril de 2008
---	-------------------------	-----------	-------	---------------------

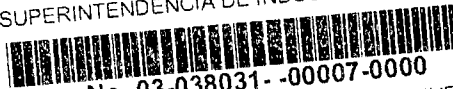
⑦	Anexos:
	☒ Comprobante de pago de la tasa.
	☐ Poderes si fuere el caso, junto con la sustitución de los mismos a mi favor.
	☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas
	☒ Nuevo capítulo reivindicatorio
	☐ Nuevo resumen

⑧	NOMBRE	MARGARITA CASTELLANOS A.	FIRMA	<i>Margarita Castellanos A.</i>
				CC 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 CSJ
				- 8 MAYO 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-038031- -00007-0000

Fecha: 2008-05-08 14:33:36 Dep. 2020 NUECREACION
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 15

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 34,121
FECHA : ABRIL 28 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JAIRO SANCHEZ	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	1657902	28/04/2008	206,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	103,000.00
		TOTAL :	\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

REIVINDICACIONES

1. Conjunto de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos las cuales conforman un juego de reactivos, por medio del cual se preparan moléculas de ADN intactas e inmovilizadas a partir de células de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, disoluciones caracterizadas porque poseen las siguientes composiciones:

-una sal (NaCl 0.15 M) o un agente quelante de metales (EDTA 0.01M) y una sal (NaCl 0.15M), disoluciones de dicho juego de reactivos por medio de las cuales las células bacterianas se lavan e incluyen en minibloques de agarosa,

-un agente quelante de metales (EDTA 0.1M), dos detergentes aniónicos (Sarcosil 1% y Nonidet P-40 1%) y Tris base 0.01M, disoluciones que podrían contener adicionalmente Urea 4M, disoluciones de dicho juego de reactivos mediante las cuales las células bacterianas se tratan,

-un agente quelante de metales (EDTA 0.1M) y Tris base 0.01M, disolución de dicho juego de reactivos mediante la cual los minibloques se lavan y se conservan;

siendo dicho conjunto de disoluciones utilizadas secuencialmente de acuerdo con un método de uso.

2. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución para el lavado de células de dicho juego de reactivos es NaCl 0.15M y EDTA 0.01M, pH 8.0 (disolución N° 1).

3. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución para el lavado de células de dicho juego de reactivos es NaCl 0.15M (disolución N° 2).

4. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución para la inmovilización de células de dicho juego de reactivos es agarosa de bajo punto de gelificación fundida en NaCl 0.15M a una concentración de 1.5 % (disolución N° 3).
5. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución para la inmovilización de células de dicho juego de reactivos es agarosa de bajo punto de gelificación fundida en NaCl 0.15M y EDTA 0.01M, pH 8.0 a una concentración de 1.5 % (disolución N° 4).
6. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de tratamiento de células de dicho juego de reactivos es EDTA 0.1 M, Sarcosil 1 %, Nonidet P-40 1 % y Tris base 0.01 M, pH 8.0 (disolución N° 5).
7. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de tratamiento de células de dicho juego de reactivos es EDTA 0.1 M, Sarcosyl 1 %, Nonidet P-40 1 %, Tris base 0.01M y Urea 4M, pH 8.0 (disolución N° 6).
8. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de la disolución de lavado y conservación de los minibloques de dicho juego de reactivos es EDTA 0.1 M y Tris base 0.01M, pH 8.0 (disolución N° 7).
9. Moldes flexibles para formar minibloques de agarosa que contienen células bacterianas; moldes caracterizados porque son láminas de materiales tales como la silicona, y se cubren con tapas de vidrio; láminas que poseen hasta 0.5 cm de grosor y tienen estampadas en una de sus superficies múltiples depresiones cuadradas con lados de 0.3 cm de tamaño y desde 0.03 hasta

X

aproximadamente 0.1 cm de profundidad, depresiones en las cuales la mezcla de agarosa y células bacterianas solidifica formando minibloques con dichas dimensiones, moldes que son lo suficientemente flexibles para doblarse y permitir que los minibloques se despeguen de los mismos, moldes que son reutilizables después de esterilizarlos mediante autoclave, siendo dichos moldes y tapas ensamblados completamente y utilizados para inmovilizar células de bacterias según un método de uso.

10. Moldes flexibles de la reivindicación N° 9 caracterizados porque las láminas flexibles que los forman son de silicona, goma o cualquier otro material flexible, láminas que pueden tener cualquier forma, tamaño y cantidad de depresiones cuadradas idénticas (preferentemente hasta 50) estampadas en una superficie.

11. Método de uso de la reivindicación N° 9 caracterizado porque el método de ensamblaje y uso de uno de dichos moldes flexibles para preparar ADN intacto inmovilizado en minibloques de agarosa comprende los pasos siguientes:

- i) verter la suspensión de células bacterianas y agarosa sobre la superficie del molde que posee estampadas las depresiones;
- ii) distribuir uniformemente dicha suspensión con una espátula hasta rellenar dichas depresiones;
- iii) cubrir el molde con su tapa y esperar hasta que se formen los minibloques;
- iv) doblar el molde sobre un frasco cualquiera para despegar los minibloques.

12. Método de uso de dicho juego de reactivos y de uno de los mencionados moldes flexibles de las reivindicaciones N° 1 y 9, caracterizado porque la

preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *P. aeruginosa* comprende los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 2 de dicho juego de reactivos,
- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 3 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde e incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 30 minutos a 50°C,
- iv) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

13. Método de uso de dicho juego de reactivos y de uno de los mencionados moldes flexibles de las reivindicaciones N° 1 y 9, caracterizado porque la preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *S. aureus* comprende los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 1 de dicho juego de reactivos,
- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 4 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde e incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 60 minutos a 50°C,
- iv) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

14. Método de uso de dicho juego de reactivos y de uno de los mencionados moldes flexibles de las reivindicaciones N° 1 y 9, caracterizado porque la

preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *E. coli* comprende los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 1 de dicho juego de reactivos,
- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 3 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde, e incubar los minibloques en la disolución N° 5 de dicho juego de reactivos durante 10 minutos a 37°C,
- iv) incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 30 minutos a 50°C.
- v) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Typing of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Gram-Negative Organisms in 1 Day

ROMESH K. GAUTOM*

Washington State Department of Health, Public Health Laboratories, Seattle, Washington 98155

Received 23 April 1997/Returned for modification 30 June 1997/Accepted 28 July 1997

Genomic DNA patterns generated by pulsed-field gel electrophoresis are highly specific for different strains of an organism and have significant value in epidemiologic investigations of infectious-disease outbreaks. Unfortunately, time-consuming and tedious specimen processing is an inherent problem which limits the use of this powerful technology as a real-time epidemic investigational tool. Here, I describe a rapid method to improve the response time and provide specific bacterial strain identification for the typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in a single day.

The ability to characterize and determine relatedness among bacterial isolates involved in an infectious-disease outbreak is a prerequisite for epidemiologic investigations. Several markers have been used to distinguish isolates of a given bacterial genus or species involved in such outbreaks (1, 21). Historically, clinical and public health laboratories have used conventional epidemiologic typing systems, usually ones based on specific phenotypic characterizations (1, 21). Unfortunately, as a result of inconsistently expressed phenotypic traits, these classical typing approaches are often not able to discriminate between related outbreak strains. The rapidity with which people and goods move within and between countries has increased the threat of epidemic spread of infectious diseases. As such, there is a need for rapid and accurate typing techniques to assist public health authorities in the detection and tracking of these diseases.

Since the advent of molecular fingerprinting, there has been a great deal of effort directed toward developing molecular methods suitable for use in clinical and public health laboratories. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is one such approach that identifies organisms by their molecular genotypes (4, 18, 25, 26). It involves the use of rare-cutter restriction enzymes to generate a limited number (10 to 20) of high-molecular-weight restriction fragments. These fragments are then separated by agarose gel electrophoresis with programmed variations in both the direction and the duration of the electric field (the pulsed field). The resulting electrophoretic patterns are highly specific for strains from a variety of organisms and also provide an opportunity to examine multiple variations throughout the genome of the organism so as to identify specific strains and accurately link them with disease outbreaks.

PFGE has great value in epidemiological analysis, in the differentiation of pathogenic strains, and in the monitoring of their spread among communities. The technique has been successfully employed in tracking diseases caused by a number of different bacterial pathogens, including *Escherichia coli* O157:H7 (3, 5), *Neisseria meningitidis* (27, 28), *Pseudomonas aeruginosa* (16), *Listeria monocytogenes* (6), *Bordetella pertussis* (11), *Legionella pneumophila* (15), *Vibrio cholerae* (7), *Staphylococcus aureus* (23), and enterococcal isolates (20). PFGE has

also permitted the characterization of isolates indistinguishable by restriction enzyme analysis, phage typing, ribotyping, plasmid analysis, and randomly amplified polymorphic DNA analysis (2, 3, 16, 22, 24, 25).

PFGE has become a standard technique among public health agencies due to its accuracy and reproducibility between different laboratories. However, current PFGE protocols involve time-consuming, tedious procedures for the purification of intact genomic DNA trapped in agarose, lengthy restriction enzyme digests, and extended electrophoresis times (12, 18). These time-consuming steps preclude the use of current PFGE protocols in monitoring the often rapid evolution of events during ongoing outbreaks (12, 18). However, recent events such as disease epidemics associated with the ingestion of food contaminated with either *E. coli* O157:H7 or *Salmonella* spp. in several western states, along with outbreaks of meningococcal disease (8-10, 14), underscore the pressing need to develop an alternative protocol for PFGE that would improve the response time and allow this powerful molecular typing system to become a more versatile epidemiologic tool. In this paper, I describe such a rapid method for PFGE analysis and demonstrate that it provides specific identification of bacterial strains in 1 day with an accuracy and a reproducibility equivalent to those of conventional multiday procedures.

Bacterial strains and culture conditions. Isolates of *E. coli* O157:H7 were submitted to the Washington State Department of Health Public Health Laboratories for confirmation of strain identification or for subtyping by standard PFGE. Other bacterial isolates were obtained from clinical specimens submitted to the Public Health Laboratories for other purposes. The isolates included in this study are listed in Table 1. The isolates were subcultured on appropriate growth media and incubated at 37°C overnight or longer (in the cases of *Bordetella* and *Legionella*).

Standard PFGE procedure. This procedure was designed by the Centers for Disease Control and Prevention for use in the tracing of *E. coli* O157:H7 outbreaks (12). Briefly, a single colony of the isolate to be tested was inoculated in 3 ml of standard Trypticase soy broth (Becton Dickinson and Co., Cockeysville, Md.) and incubated at 37°C on a roller drum for 16 to 18 h for further growth. (The cells were washed in SE (75 mM NaCl, pH 8.0; 25 mM EDTA, pH 8.0) by centrifugation, and the optical density of the cells at a wavelength of 610 nm was adjusted to 1.40. Chromosomal-grade agarose (Bio-Rad

* Phone: (206) 361-2885. Fax: (206) 361-2814.

TABLE 1. Bacterial isolates analyzed by rapid PFGE

Organism	No. of isolates analyzed
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 patient isolates	40
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 food isolates	2
<i>Escherichia coli</i> non-O157:H7 isolates	1
<i>Escherichia coli</i> animal isolates	3
<i>Salmonella poona</i>	2
<i>Salmonella montevideo</i>	2
<i>Salmonella saint-paul</i>	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	2
<i>Salmonella newport</i>	2
<i>Shigella flexneri</i> 1	1
<i>Shigella flexneri</i> 3	2
<i>Shigella flexneri</i> 2	2
<i>Shigella sonnei</i>	2
<i>Shigella flexneri</i> 4	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Klebsiella</i> sp.	1
<i>Bordetella pertussis</i>	3
<i>Bordetella parapertussis</i>	2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1
<i>Vibrio cholerae</i>	2
<i>Legionella pneumophila</i>	3
<i>Legionella</i> sp.	3

Laboratories, Hercules, Calif.) was prepared in 10 mM Tris and 0.1 mM EDTA to a final concentration of 1.2% and maintained at 55°C. Plugs were formed by mixing 0.5 ml of cell suspension with 0.5 ml of agarose, and this mixture was then pipetted into plug molds (Bio-Rad Laboratories). After the plugs solidified they were transferred to lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% sarcosine; 1 mg of proteinase K per ml) for 16 to 20 h of incubation in a 55°C water bath. The lysis buffer was removed, and the plugs were washed with 5 ml of sterile distilled water for 5 min and then with 3 ml of TE (10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) for 5 min at room temperature. A final set of four washes, 30 min each, was done with 3 ml of TE per wash. Two 1-mm-thick slices of plugs were preincubated with 200 µl of 1× *Xba*I buffer (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, Ind.) for 30 min. The buffer was then removed and replaced with a fresh mixture containing 50 U of *Xba*I restriction enzyme (Boehringer Mannheim Corporation) in 1× restriction buffer and incubated at 37°C for 16 to 20 h. The plugs were then briefly soaked in standard 0.5× Tris-borate-EDTA (TBE) prior to electrophoresis or, if necessary, stored at 4°C in 0.5 ml of TE for several hours. Electrophoresis of the prepared samples was performed on the CHEF-mapper (Bio-Rad Laboratories) system by using pulsed-field-certified agarose (Bio-Rad Laboratories) with 2 liters of standard 0.5× TBE running buffer. The electrophoretic conditions used were as follows: initial switch time, 2.16 s; final switch time, 54.17 s; run time, 22 h; angle, 120°; gradient, 6.0 V/cm; temperature, 14°C; ramping factor,

linear. After electrophoresis the gels were stained for 30 min in 1 liter of sterile distilled water containing 100 µl of ethidium bromide (10 mg/ml) and destained in three washes of 30 min each by using 1 liter of distilled water.

Rapid PFGE procedure. In working out the details of this protocol, a variety of specific reaction conditions and reagents were tested. The elements that make up the final procedure were chosen to maximize efficiency while maintaining a high level of accuracy of bacterial typing.

Individual bacterial colonies grown overnight on plates were suspended directly with cotton swabs in about 2 to 3 ml of TE buffer (100 mM Tris and 100 mM EDTA). The cell suspensions were adjusted with TE buffer to 20% transmittance by using a bioMérieux Vitek (Hazelwood, Mo.) colorimeter. Aliquots of 100 µl of the cell suspensions were transferred to 1.5-ml microcentrifuge tubes. Lysozyme (10-mg/ml stock solution) and proteinase K (20-mg/ml stock solution) were added to a final concentration of 1 mg/ml each and mixed several times by being pipetted up and down. The bacterial suspensions were incubated at 37°C for 10 to 15 min. InCert agarose (FMC BioProducts, Rockland, Maine) was prepared in water to a final concentration of 1.2% and maintained at 55°C in a water bath. Following the lysozyme-proteinase K incubation, 7 µl of 20% sodium dodecyl sulfate and 140 µl of 1.2% InCert agarose were mixed with each bacterial suspension with the help of a pipette. This bacterium-agarose mixture was immediately added to plug molds (Bio-Rad Laboratories). The plugs were allowed to solidify for 5 to 10 min at 4°C and then transferred to 2-ml round-bottom tubes containing 1.5 ml of ESP buffer (0.5 M EDTA, pH 9.0; 1% sodium lauryl sarcosine; 1 mg of proteinase K per ml). They were incubated in a water bath at 55°C for 2 h. After the completion of proteolysis, the plugs were transferred to 50-ml tubes containing 8 to 10 ml of sterile, preheated (50°C) distilled water and incubated for 10 min at 50°C with gentle mixing in a shaker water bath. Subsequently, four 50°C washes were done in a shaker water bath for 15 min each with 8 to 10 ml of preheated (50°C) TE buffer (10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0). The plugs were then cooled to room temperature in TE buffer. At this point, they could be used immediately or stored for 3 to 4 weeks at 4°C in 1 ml of TE. For restriction endonuclease digestion, two 1-mm-thick slices of each plug were incubated at 37°C for 3 h with 50 or 30 U of *Xba*I or *Spe*I enzyme, respectively, in 100 µl of the appropriate (1×) restriction enzyme buffer.

Several different kinds and concentrations of agaroses were utilized to optimize the resolution of the fingerprint profiles. SeaKem Gold agarose (FMC BioProducts) at a concentration of 1% provided the desired resolution of DNA fingerprints. The plug slices of the samples were loaded and electrophoresed in 1% SeaKem Gold agarose with 2 liters of standard 0.5× TBE running buffer. The electrophoresis was performed with the GenePath or CHEF-mapper system (Bio-Rad Laboratories) with all conditions except the run time being identical to those used in the standard procedure described above. These conditions were designed for a run time of 22 h; however, for this rapid procedure, the system was manually shut down after 14 h of electrophoresis (which corresponded to a final switch time of 35.07). Since the initial development of this procedure, several electrophoretic runs programmed to stop after 14 h were also performed. In these runs, the initial and final switch times were 2.16 and 35.07 s, respectively; all other parameters remained identical with those of the standard procedure. The results obtained from these runs were always identical to the ones obtained when the system was manually shut down after 14 h. Following electrophoresis, the gels were stained for 20 min in 500 ml of sterile distilled water containing

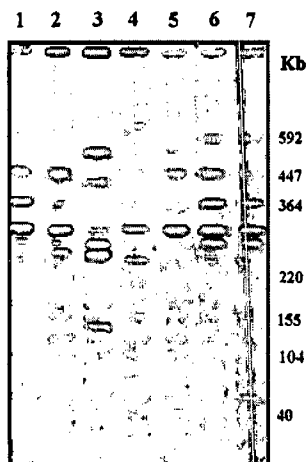


FIG. 1. Representative agarose gel showing PFGE patterns of *Xba*I-digested genomic DNA of *E. coli* O157:H7 isolates prepared by the rapid method. Lanes 1 to 6, individual patient isolates; lane 7, control *E. coli* O157:H7.

50 μ l of ethidium bromide (10 mg/ml) and destained in three washes of 30 min each in 1 liter of distilled water. For comparison, plugs from the same isolate, prepared in accordance with both the Centers for Disease Control and Prevention standard protocol and this rapid 1-day procedure, were electrophoresed in adjacent lanes on 1% SeaKem Gold gels. The gels were photographed under UV illumination with Polaroid film. A well-characterized strain of *E. coli* O157:H7 (12) was included in all runs as a control.

The focus of the present study was to develop a rapid PFGE subtyping method for *E. coli* O157:H7. A total of 42 isolates of this pathogen, 40 from patients and 2 from a suspected food source, were analyzed by this new rapid procedure. Clinical isolates (Table 1) belonging to 10 other genera were also included to assess the general applicability of this rapid PFGE protocol to other gram-negative bacteria.

The consistency of the control DNA patterns confirmed the reproducibility of the procedure. All isolates included in this study were typed by this new rapid procedure within 24 h. When used to analyze *E. coli* O157:H7 strains, the 24-h procedure, with its maximum electrophoresis time of 14 h, was able to achieve sufficient specificity in its banding patterns (Fig. 1). Each sample of *E. coli* was processed by both conventional and rapid procedures, and the resulting DNA profiles were compared. In all cases, the results of the rapid electrophoresis approach compared favorably with the resolution achieved by the conventional technique (data not shown). The specific enzyme used in each case was chosen to result in a similar size range of bands for each organism analyzed on the same gel.

In order to evaluate the applicability of this procedure to different gram-negative bacteria, samples of DNA isolated by both techniques from 10 *E. coli*, 5 *N. meningitidis*, 5 *Salmonella* sp., 5 *Shigella* sp., 5 *Stenotrophomonas maltophilia*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 2 *B. pertussis*, and 1 *Klebsiella* sp. isolates were run in adjacent wells on the same gel. The restriction patterns obtained by the standard and rapid methods were indistinguishable for each strain. Examples of this are shown in Fig. 2 and 3. Background smearing was less noticeable in the samples prepared by the rapid method, suggesting that the DNA had remained intact.

The procedure was shortened at several stages. The most notable time savings were achieved by (i) utilizing bacterial

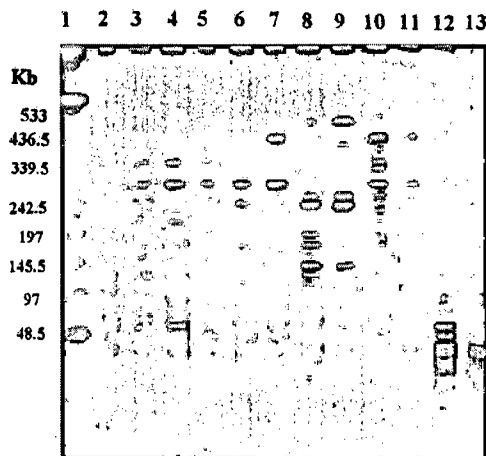


FIG. 2. PFGE of *E. coli* isolates showing *Xba*I-digested genomic DNA prepared by standard and rapid methods. Lane 1, lambda concatamers used as molecular size markers; lanes 2 to 11, paired samples of *E. coli* O157:H7 DNA from individual patients; lanes 12 and 13, paired samples of DNA from non-O157:H7 *E. coli*. The first and second lanes of each pair contain patterns of DNA prepared by the standard and rapid methods, respectively.

cells directly from the culture plates of clinical specimens, (ii) expediting cell lysis and proteinase K treatment, (iii) shortening the washing times by using preheated water and TE buffer, (iv) shortening the restriction digestion time, and (v) using SeaKem Gold agarose, which allows for more rapid electrophoresis. It is evident that the modified procedure provides a large amount of clean, intact chromosomal DNA that can be easily digested with a variety of restriction enzymes in a short period. From a single isolate, a comparison of the DNA fingerprints obtained from several-day-old and from fresh cultures gave indistinguishable patterns (data not shown). This suggests that in an outbreak situation it should be possible to directly process isolates coming from different laboratories.

Rapid, accurate typing is of fundamental importance for effective epidemiology and outbreak investigation. Important

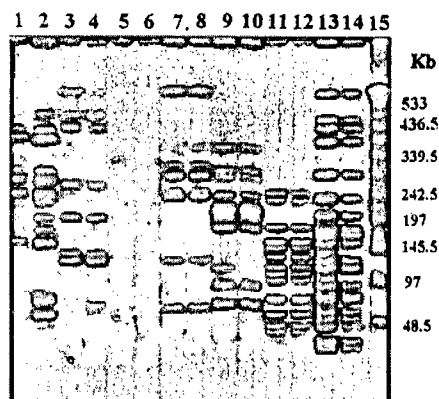


FIG. 3. PFGE of genomic DNA from seven bacterial pathogens. Genomic DNA was prepared by standard and rapid methods and digested with *Xba*I enzymes (all except *N. meningitidis* and *B. pertussis*, which were digested with *Spe*I). DNA samples were electrophoresed in pairs. The first and second lanes of each pair show patterns of digested DNA prepared by the standard and rapid methods, respectively. Lanes 1 and 2, *E. aerogenes*; lanes 3 and 4, *Klebsiella* sp.; lanes 5 and 6, *Stenotrophomonas maltophilia*; lanes 7 and 8, *Salmonella montevideo*; lanes 9 and 10, *Shigella flexneri* 3; lanes 11 and 12, *N. meningitidis*; lanes 13 and 14, *B. pertussis*; lane 15, lambda concatamers used as molecular size markers.

public health decisions regarding the institution of preventive measures or the providing of reassurance that no true outbreak exists (10) are often based primarily on molecular typing data. It is well established that different strains of one serotype circulate in most populations. PFGE is reproducible because it looks at a stable genotype rather than at variably expressed phenotypic characteristics. Most standard PFGE procedures take 5 to 6 days, although more rapid methods have been described (13, 19). None of these rapid approaches provide results with the speed of the procedure described here, and all of them require trade-offs not encountered in the present approach. Other rapid PFGE procedures have saved time either through the elimination of proteinase K digestion or by the use of achromopeptidase. These approaches, however, have mainly been applied to gram-positive organisms without extensive investigation of their applicability to gram-negative organisms (2, 13, 17), and the turnaround time still exceeds 1 day. The procedure described in this report allows for the successful typing of a variety of gram-negative organisms within a 24-h period. This has broad implications for both epidemiologic investigations and therapeutic interventions in outbreak situations.

I thank Jon Counts and Donna Osmond for their continuous support during the development of this method. I also thank Jairam Lingappa for his excellent suggestions to improve the text of the manuscript and Kaye Campos and Bill Lawrence for their technical assistance.

REFERENCES

- Arbeit, R. D. 1995. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 190-208. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Bannerman, T. L., G. A. Hancock, F. C. Tenover, and J. M. Miller. 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 33:551-555.
- Barrett, T. J., H. Lior, J. H. Green, R. Khakhria, J. G. Wells, B. P. Bell, K. D. Greene, J. Lewis, and P. M. Griffin. 1994. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 32:3013-3017.
- Birren, B., and E. Lai. 1993. Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Böhm, H., and H. Karch. 1992. DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30:2169-2172.
- Brosch, R., C. Buchrieser, and J. Rocourt. 1991. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res. Microbiol.* 142:667-675.
- Cameron, D. N., F. M. Khambaty, I. K. Wachsmuth, R. V. Tauxe, and T. J. Barrett. 1994. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 32:1685-1690.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1993. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers—western United States, 1992-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 42:258-263.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1994. Outbreak of *Salmonella enteritidis* associated with nationally distributed ice cream products—Minnesota, South Dakota, and Wisconsin, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 43:740-741.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 44:157-160.
- de Moissac, Y. R., S. L. Ronald, and M. S. Peppler. 1994. Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Bordetella pertussis* in a whooping cough outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 32:398-402.
- Foodborne and Diarrheal Diseases Branch, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. 1996. Standardized molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis: a training manual. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.
- Goering, R. V., and M. A. Winters. 1992. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30:577-580.
- Jackson, L. A., E. R. Alexander, C. A. DeBott, P. D. Swenson, J. Boase, M. G. McDowell, M. W. Reeves, and J. D. Wenger. 1996. Evaluation of the use of mass chemoprophylaxis during a school outbreak of enzyme type 5 serogroup B meningococcal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15:992-998.
- Johnson, W. M., K. Bernard, T. J. Marrie, and S. D. Tyler. 1994. Discriminatory genomic fingerprinting of *Legionella pneumophila* by pulsed-field electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 32:2620-2621.
- Kersulyte, D., M. J. Struelens, A. Deplano, and D. E. Berg. 1995. Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 33:2216-2219.
- Leonard, R. B., J. Mayer, M. Sasser, M. L. Woods, B. R. Mooney, B. G. Brinton, P. L. Newcomb-Gayman, and K. C. Carroll. 1995. Comparison of MIDI Sherlock system and pulsed-field gel electrophoresis in characterizing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a recent hospital outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 33:2723-2727.
- Maslow, J. N., A. M. Slutsky, and R. D. Arbeit. 1993. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563-572. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Matushek, M. G., M. J. M. Bonten, and M. K. Hayden. 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2598-2600.
- Murray, B. E., K. V. Singh, J. D. Heath, B. R. Sharma, and G. M. Weinstock. 1990. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J. Clin. Microbiol.* 28:2059-2063.
- Pfaller, M. A. 1991. Typing methods for epidemiologic investigation, p. 171-182. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Saulnier, P., C. Bourneix, G. Prévost, and A. Andremon. 1993. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 31:982-985.
- Schlichting, C., C. Branger, J.-M. Fournier, W. Witte, A. Boutonnier, C. Wolz, P. Goulet, and G. Döring. 1993. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. *J. Clin. Microbiol.* 31:227-232.
- Schoonmaker, D., T. Heimberger, and G. Birkhead. 1992. Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 30:1491-1498.
- Swaminathan, B., and G. M. Matar. 1993. Molecular typing methods, p. 26-50. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
- Yakubu, D. E., F. J. R. Abadi, and T. H. Pennington. 1994. Molecular epidemiology of recent United Kingdom isolates of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *Epidemiol. Infect.* 113:53-65.
- Yakubu, D. E., and T. H. Pennington. 1995. Epidemiological evaluation of *Neisseria meningitidis* serogroup B by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 10:185-190.

EP 0 320 937 A2

semiconductor relay. Also, in order to adjust for an arbitrary pulse duration time within the range of approximately 1 millisecond to approximately 1,000 seconds, a block mechanism composed of a large-scale integrated circuit semiconductor (LSI) should preferably be employed as a connection time control mechanism. The waveform of the applied pulses is selected from a square wave, a sine wave, a saw tooth wave and other waves. In general, the square wave is employed. The electrophoresis apparatus in accordance with the present invention may also be provided with additional mechanisms such as a known temperature control mechanism (mainly a cooling mechanism), a buffer feeding, holding and discharging mechanism, and an electrophoresis medium fitting and holding mechanism. Figure 2 shows an example of the potential values and periods of the applied pulses.

The present invention will further be illustrated by the following nonlimitative examples.

Example 1

[Preparation of the agarose gel membrane in which the thickness of the membrane has a predetermined gradual change along the direction of electrophoresis]

Aqueous agarose gel membranes having a gel concentration of 1.5% were prepared by applying a solution for gel formation (aqueous agarose solution), which contained a TBE buffer having the composition shown below and agarose dissolved therein, onto a 20cm-square glass plate having smooth surfaces, and keeping the applied solution at a low temperature to gel it. In this manner, two kinds of aqueous agarose gel membranes having different membrane thickness functions, wherein the gel membrane thickness was changed from 2.0mm to 5.0mm (gel membrane 1) and wherein the gel membrane thickness was changed from 0.5mm to 5.0mm (gel membrane 2), were prepared.

1) Composition of TBE buffer	
Tris(hydroxymethyl)aminomethane [Tris]	103g
Boric acid	55g
EDTA*2Na salt	9.3g
Made up to 10.0 liters with water.	
2) Composition of aqueous agarose solution	
Agarose	150g
TBE buffer shown above	10 liters

Thereafter, wells for samples were made in the vicinity of the edge of each aqueous agarose gel membrane on the larger thickness side by the conventional procedure by use of a well type comb having a size of 10mm x 15mm.

[Performance evaluation of the agarose gel membrane in accordance with this embodiment of the invention]

As DNA samples, TdC DNA (166 kbp), λ DNA (48 kbp) and a degradation product of λ DNA by Hind III were used. Each DNA sample in an amount of 0.02 μ g was dissolved in 5 μ l of the TBE buffer having the same constituent concentrations as mentioned above and containing 10% of glycerol and 0.0015% of bromphenol blue, and used for analysis. The samples were applied into the wells by use of a Gilson Pipetman pipette having a cut pipette edge. Prior to pulse application, a d.c. field was applied in one direction for 15 minutes until the sample was introduced into the agarose gel membrane.

Electrophoresis was carried out in accordance with the pulse inversion procedure by connecting the edge of the agarose gel membrane on the larger thickness side to the cathode side and keeping the temperature at 14.0°C. The electrophoresis conditions are shown in Table 1.

After the electrophoresis was finished, the gel membrane was immersed in a dyeing liquid containing 0.5 μ g of ethidium bromide per 1ml of the TBE buffer, and the DNA electrophoretic image was converted into a visible image. Thereafter, the visible electrophoretic image was photographed by using a Fuji Instant

Simplified Protocol for Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Streptococcus pneumoniae*

M. CATHERINE McELLISTREM,^{1,2*} JANET E. STOUT,³ AND LEE H. HARRISON^{1,2}

Public Health Infectious Diseases Laboratory, University of Pittsburgh Graduate School of Public Health,¹
Department of Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine,² and Veterans Affairs Medical Center,³
Pittsburgh, Pennsylvania

Received 23 June 1999/Returned for modification 19 August 1999/Accepted 8 October 1999

A variety of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocols for the molecular subtyping of *Streptococcus pneumoniae* have been reported; most are time-consuming and complex. We sought to modify reference PFGE protocols to reduce the time required while creating high-quality gels. Only protocol modifications that resulted in high-quality banding patterns were considered. The following protocol components were modified. Lysis enzymes (lysozyme, mutanolysin, and RNase A) were deleted in a stepwise fashion, and then the lysis buffer was deleted. Lysis and digestion were accomplished in a single step with EDTA and *N*-lauroyl sarcosine (ES; pH 8.5 to 9.3) incubation at 50°C in the absence of proteinase K. All enzymes except the restriction enzyme were omitted. A minimum incubation time of 6 h was required to achieve high-quality gels. All of the reactions were performed within 9 h, and the total protocol time from lysis to gel completion was reduced from 3 days to only 36 h. Combining lysis and digestion into a single step resulted in a substantial reduction in the time required to perform PFGE for *S. pneumoniae*. The ES solution may have caused cell lysis by activating *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase, the pneumococcal autolysin.

Molecular subtyping has revolutionized the field of infectious disease epidemiology. Molecular epidemiology allows the differentiation of isolates that appear identical by conventional methods, such as antimicrobial susceptibility testing or serotyping. While a variety of subtyping techniques have been developed, an ideal method would be simple to perform, be reproducible, and result in high-resolution banding patterns.

Streptococcus pneumoniae is a significant public health concern, especially with the emergence of drug-resistant strains. Molecular epidemiology can be used to study the spread of drug-resistant *S. pneumoniae* in populations, making it an important adjunct for surveillance of this important pathogen. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), created by Schwartz, Cantor, and colleagues in 1982 (22), allows large DNA fragments to be separated on an agarose gel by virtue of their molecular weights. The electric field is sequentially changed at variable time intervals, or pulse times. The larger fragments take longer to realign in each field and thus move a shorter distance down the gel compared to the lower-molecular-weight fragments. Since the inception of PFGE, modifications have allowed the development of both field inversion gel electrophoresis (FIGE) and contour-clamped homogenous field electrophoresis (CHEF). CHEF has hexagonally arranged electrodes which cause movement of DNA fragments down a gel by alternating pulsed currents (21).

Commonly used methods for the molecular subtyping of *S. pneumoniae* include PFGE, BOX fingerprinting, restriction fragment end labeling, ribotyping, and PCR with primer enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC2) (11). While the first three provide the most discrimination between strains, it has been suggested that BOX fingerprinting and restriction fragment end labeling are the best methods

because of the quick turnaround time and ease of computer analysis. Restriction fragment end labeling can be completed in 48 h, while BOX fingerprinting requires 72 h to perform. Recently, amplified-fragment length polymorphism analysis (AFLP) has been compared to PFGE in terms of time to completion and dendrogram analysis. While variation occurred in the dendrogram clusters, both protocols required approximately 2.5 days to complete, in addition to the 20 h required to perform PFGE (25). PFGE has been criticized for being time-consuming and labor-intensive. We sought to simplify existing *S. pneumoniae* PFGE protocols so as to create reproducible, high-quality gels with minimal time and effort.

MATERIALS AND METHODS

A Medline search was performed to identify *S. pneumoniae* PFGE protocols published from 1985 to 1998 (2, 3, 5, 6, 9, 13-17, 19, 23, 25, 26). Most protocols contained the following steps: bacterial cell suspension and agarose suspension, lysis, digestion, Tris-HCl-EDTA (TE) washes, enzyme restriction, and electrophoresis. We serially modified aspects of several published protocols to create a simplified method. Only changes which resulted in reproducible high-quality banding patterns were adopted. The standard protocol we used was as follows.

S. pneumoniae cultures were grown overnight on Trypticase soy agar with 5% sheep blood (BBL) and suspended in 2 ml of cell suspension buffer (1 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 7.6]) to an optical density of 1.3 to 1.5 at 450 nm. The bacterial suspension was mixed with an equal amount of 2% low-melting-point agarose (Sea Plaque; FMC Bioproducts, Rockland, Maine) and pipetted into 100- μ l plug molds. After being solidified on ice for 10 min, the plugs were lysed by incubation with 2 ml of lysis buffer (1 M NaCl, 100 mM EDTA, 6 mM Tris-HCl, 0.5% Brij 58, 0.5% deoxycholate, 0.5% *N*-lauroyl sarcosine [pH 7.6]) supplemented with 1 mg of lysozyme/ml-50 μ g of RNase A/ml for 3 h at 37°C. Next, each plug was incubated with 2 ml of ES buffer (0.5 M EDTA, 1% *N*-lauroyl sarcosine [pH 8.0 to 9.3]) and 100 μ g of proteinase K/ml overnight at 50°C. The plugs were then washed three times with 10 ml of TE buffer containing 10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA (pH 7.6) at 37°C for 30 min each time. After preincubation of a 2- by 5-mm section of a plug in NE 4 buffer (New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.) for 20 min, the DNA was digested with NE 4 buffer mixed with 30 U of *Sma*I and 200 μ g of bovine serum albumin/ml at room temperature overnight. For ease of comparison, the run parameters from the modified protocol were used (5, 6, 13, 14, 16, 17, 22, 25, 26). The total time from lysis to gel completion was 3 days.

We performed PFGE on invasive penicillin-nonsusceptible *S. pneumoniae* (PNSP) strains from the Baltimore metropolitan area, collected as part of the Maryland Bacterial Invasive Disease Surveillance project (BIDS) (10). BIDS is a component of the multistate Emerging Infections Program that is coordinated by

* Corresponding author. Mailing address: Public Health Infectious Diseases Laboratory, University of Pittsburgh Graduate School of Public Health, A521 Crabtree Hall, 130 DeSoto St., Pittsburgh, PA 15261. Phone: (412) 648-6401. Fax: (412) 648-6399. E-mail: McEllistremC@msx.dept-med.pitt.edu.

the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Serotypes were determined by the quellung reaction with type-specific antiserum prepared at the CDC (4). Strains of serotypes 6A, 9V, 14, 19A, 19F, and 23F were chosen to provide a representative sample of PNSP isolates (12). Penicillin-susceptible isolates were also chosen from serotypes 9V, 23F, and 33F. A serotype 23F isolate, the multiresistant *S. pneumoniae* Spanish clone (Cleveland strain), was donated by A. Tomasz of Rockefeller University, New York, N.Y. (20).

RESULTS

Serial deletion of the lysis enzymes, including lysozyme, mutanolysin, and RNase A, caused no qualitative or quantitative changes in the banding pattern. The lysis step was deleted, and the digestion step was successfully performed in the absence of proteinase K. Lysis and digestion were completed in a single step with ES buffer (pH 8.0 to 9.3) at 50°C for 6 h. After the plug was washed three times in TE buffer, the DNA was digested by a 2-h incubation with 250 U of *Sma*I/ml mixed in NE 4 restriction buffer supplemented with 200 µg of bovine serum albumin/ml. The total protocol time from lysis to the end of electrophoresis was reduced to 36 h. While melting the agarose containing the DNA fragments at 62°C for 10 to 15 min is technically easier (13, 25), this resulted in sporadic loss of high-molecular-weight bands, increased lane background, and decreased overall intensity of the remaining bands.

Incubation with ES buffer with or without proteinase K (1 mg/ml) for less than 6 h did result in an identical banding pattern compared to that with the standard protocol. However, the bands were faint due to increased lane background, making interpretation more difficult. The addition of a second block of time to the gel run parameters allowed the improved resolution of bands between 50 and 100 kb and facilitated analysis of the gel. We did note that a small percentage of the organisms did not lyse during the first 6-h incubation; however, when these isolates were incubated a second time in the ES buffer overnight, adequate lysis did occur. The likelihood of complete lysis increased if we incubated only one plug in each tube of ES buffer.

We were able to reproduce this simplified protocol in two laboratories. The plugs containing pneumococcal DNA still create reproducible banding patterns after 6 months of storage in TE buffer at 4°C. The final simplified protocol is as follows. *S. pneumoniae* cultures were grown overnight on Trypticase soy agar with 5% sheep blood (BBL) and suspended in 2 ml of cell suspension buffer (1 M NaCl–10 mM Tris-HCl [pH 7.6]). The cell suspension was adjusted to an optical density of 1.3 to 1.5 at 450 nm. Equal amounts of bacterial suspension and 2% low-melting-point agarose (Sea Plaque) were mixed and pipetted into 100-µl plug molds. After the plugs were solidified on ice for 10 min, they were lysed and digested in one step. Each plug was incubated in 2 ml of ES buffer (pH 8 to 9.3) for 6 h at 50°C. The plugs were then washed three times with 10 ml of TE buffer containing 10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA (pH 7.6) at 37°C for 15 min each time. After preincubation of a 2-by-5-mm section of a plug in NE 4 restriction buffer for 15 min, the DNA was digested with NE 4 buffer mixed with 250 U of *Sma*I/ml and 200 µg of bovine serum albumin/ml at room temperature for 2 h. Each 1-by-5-mm section of plug was loaded into a 1% agarose gel, and PFGE was performed with CHEF DRIII at the following parameters: pulse times, 1 to 30 s for 19 h and 5 to 9 s for 8 h; 198 V; 1 liter/min; 14°C. The gel was stained with ethidium bromide for 20 min and captured on the Bio-Rad Gel Doc 2000 system. The PFGE banding patterns of PNSP isolates prepared by the standard protocol compared to the patterns of the same strains prepared by the simplified protocol are shown in Fig. 1. The simplified protocol reliably reproduces the banding pattern created with the stan-

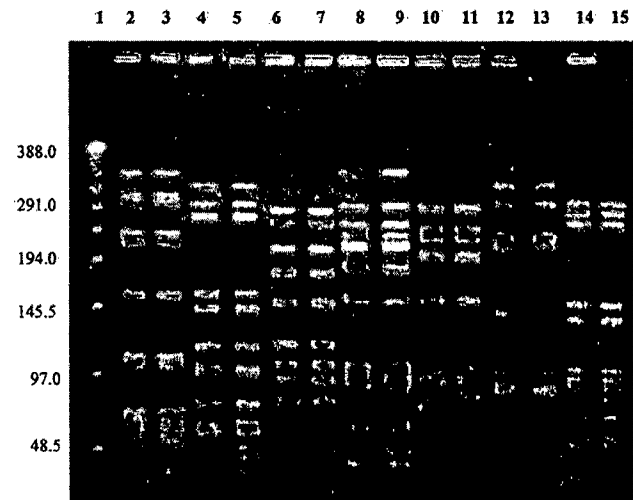


FIG. 1. PFGE of invasive *S. pneumoniae* isolates. Even-numbered lanes, simplified protocol; odd-numbered lanes, standard protocol. Lane 1, lambda ladder; lanes 2 and 3, serotype 6A; lanes 4 and 5, serotype 9V; lanes 6 and 7, serotype 19F; lanes 8 and 9, serotype 23F (Spanish clone); lanes 10 and 11, serotype 19A; lanes 12 and 13, serotype 14; lanes 14 and 15, serotype 9V.

dard protocol. Lane 9 (standard protocol) does have a faint band above 388 kbp which is not seen in lane 8 (simplified protocol). This band most likely represents unrestricted DNA. The PFGE patterns for the penicillin-susceptible isolates prepared with the simplified protocol and those with the standard protocol were also identical (data not shown).

DISCUSSION

A wide variety of methods are available for the molecular subtyping of infectious agents. In order to be useful, a technique must provide adequate discrimination of epidemiologically unrelated strains, result in gels with high-resolution, reproducible banding patterns within a short time; and be amenable to computer genetic relatedness analysis. Unfortunately, most of the methods available are labor-intensive and time-consuming.

PFGE has recently become an important method for determining microbial genetic relatedness. While it provides excellent intraspecies discrimination among a broad array of bacterial and fungal pathogens, it is time-consuming.

Our simplified protocol offers substantial advantages over published PFGE protocols for *S. pneumoniae*. By our method, any *S. pneumoniae* isolate can be optimally and efficiently subtyped on a high-quality gel within 36 h, thereby eliminating a key disadvantage of PFGE compared to BOX fingerprinting and restriction fragment end labeling.

The elimination of the lysis step and deletion of all enzymes except *Sma*I provides a simple, easy-to-use method for lysing *S. pneumoniae*. The lysis and digestion steps are accomplished with a two-reagent alkaline buffer. We did note that a small percentage of the organisms did not lyse during the first 6-h incubation; however, when these isolates were incubated a second time in the ES buffer overnight, adequate lysis did occur. The likelihood of complete lysis increased if we incubated only one plug in each tube of ES buffer. The need for endonuclease-free, filtered water is critical. Nonfiltered water can contain significant concentrations of bacteria and their accompanying RNA- and DNA-digesting enzymes. Without proteinase K, these enzymes could cause degradation of the *S.*

pneumoniae isolate's DNA. Moreover, residual proteinase K affects the ability of the restriction enzyme to cut the DNA. The lack of proteinase K may have improved our ability to restrict more of the pneumococcal DNA, as the simplified protocol was not associated with the faint high-molecular-weight band seen with the standard protocol (Fig. 1, lane 9). The addition of a second block time on the CHEF DRIII and the avoidance of heating of the DNA-containing fragments reproducibly creates high-resolution banding patterns without any background lane intensity. The lysis and digestion steps are accomplished with a two-reagent alkaline buffer. *S. pneumoniae* undergoes autolysis by detergent activation of *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase (24). Perhaps *N*-lauroyl sarcosine, a detergent, causes autolysis by activation of pneumolysin (18).

There are other rapid PFGE protocols for gram-positive (8, 15, 17) and gram-negative (7) bacteria. *Staphylococcus* can be subtyped without proteinase K but requires lysostaphin (8). Many gram-negative rods can be subtyped without the lysis step but require digestion with proteinase K (1). To the best of our knowledge, no other protocol has been able to delete the lysis step and perform digestion without proteinase K. Future studies could address whether additional organisms could be subtyped with our simplified protocol. Moreover, this protocol restricted the pneumococcal DNA with *Sma*I. Restriction of pneumococcal DNA with additional enzymes, including *Apa*I, could be performed in future investigations. While the time to gel completion was diminished, the gels produced are often not of adequate quality (15) and may not have the same banding pattern as gels produced with standard protocols (17). In addition, the other protocols require multiple buffers and/or enzymes due to the lack of autolysins in most other bacteria (7, 15, 17). The unique ability of *S. pneumoniae* to undergo autolysis allows complete lysis and digestion without the addition of complex buffers or enzymes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the participating hospital infection control practitioners and microbiology laboratory personnel of the Maryland Emerging Infections Program for identifying the pneumococcal cases and providing the bacterial isolates; Yvonne Dean-Hibbert and Lillian Billmann for assistance in conducting surveillance; Kim Holmes for assistance with data collection; and Althea Glenn for processing the isolates. We gratefully acknowledge Alexander Tomasz for the capsular type 23F Spanish-U.S. clone of *Streptococcus pneumoniae*. We also thank Jan Patterson, Victor Yu, and Judy Johnson for their assistance and guidance.

REFERENCES

- Anderson, D. J., J. S. Kuhns, M. L. Vasil, D. N. Gerding, and E. N. Janoff. 1991. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping to distinguish *Pseudomonas cepacia* isolates from a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 29:648-649.
- Carvalho, C., P. Geslin, and P. V. Vaz Pato. 1996. Pulsed field gel electrophoresis in *Streptococcus pneumoniae* isolated in France and Portugal. *Pathol. Biol.* 44:430-434.
- Doit, C., E. Denamur, B. Picard, P. Geslin, J. Elion, and E. Bingen. 1996. Mechanisms of the spread of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis in children in France. *J. Infect. Dis.* 174:520-528.
- Facklam, R. R., and J. A. Washington II. 1991. *Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci, p. 238-257. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Ferroni, A., L. Nguyen, P. Gehanno, I. Boucot, and P. Berche. 1996. Clonal distribution of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* 23F in France. *J. Clin. Microbiol.* 34:2707-2712.
- Gasc, A., P. Geslin, and A. M. Sicard. 1995. Relatedness of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* serogroup 9 strains from France and Spain. *Microbiology* 141:623-627.
- Gautam, R. K. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J. Clin. Microbiol.* 35:2977-2980.
- Goering, R. V., and M. A. Winters. 1992. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30:577-580.
- Hall, L. M. C., R. A. Whitley, B. Duke, R. C. George, and A. Efstratiou. 1996. Genetic relatedness within and between serotypes of *S. pneumoniae* from the United Kingdom: analysis of multilocus enzyme electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance patterns. *J. Clin. Microbiol.* 34:853-859.
- Harrison, L. H., A. Ali, D. M. Dwyer, J. P. Libonati, M. W. Reeves, J. A. Elliott, L. Billmann, T. Lashkerwala, and J. A. Johnson. 1995. Relapsing group B streptococcal bacteremia in adults. *Ann. Intern. Med.* 123:421-427.
- Hermans, P. W. M., M. Sluiter, T. Hoogenboezem, H. Heersma, A. van Belkum, and R. de Groot. 1995. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 33:1606-1612.
- Hofmann, J., M. S. Cetron, M. M. Farley, W. S. Baughman, R. R. Facklam, J. A. Elliott, K. A. Deaver, and R. Breiman. 1995. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N. Engl. J. Med.* 333:471-476.
- Lefevre, J. C., G. Faucon, A. M. Sicard, and A. M. Gasc. 1993. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 31:2724-2728.
- Lefevre, J. C., A. M. Gasc, J. Lemozy, A. M. Sicard, and G. Faucon. 1994. Pulsed field gel electrophoresis for molecular epidemiology of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Pathol. Biol.* 42:547-552.
- Leonard, R., and K. Carroll. 1997. Rapid lysis of gram-positive cocci for pulsed-field gel electrophoresis using *Achromo*peptidase. *Diagn. Mol. Pathol.* 6:288-291.
- Louie, M., L. Louie, G. Papia, J. Talbot, M. Lovgren, and A. E. Simor. 1999. Molecular analysis of the genetic variation among penicillin-susceptible and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Canada. *J. Infect. Dis.* 179:892-900.
- Matushek, M. G., M. J. M. Bonten, and M. K. Hayden. 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2598-2600.
- Merck and Co. The Merck index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 12th ed. 1996. Monographs 8519 and 8782. Merck and Co., Inc. Whitehouse Station, N.J.
- Moreno, F., C. Crisp, J. Jorgensen, and J. Patterson. 1995. The clinical and molecular epidemiology of bacteremias at a university hospital caused by pneumococci not susceptible to penicillin. *J. Infect. Dis.* 172:427-432.
- Munoz, R., T. J. Coffey, M. Daniels, C. G. Dowson, G. Laible, J. Casal, R. Hakenbeck, M. Jacobs, J. M. Musser, B. G. Spratt, and A. Tomasz. 1991. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 164:302-306.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, p. 6.50-6.62. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schwartz, D. C., W. Saffran, J. Welsh, R. Haas, M. Goldenberg, and C. R. Cantor. 1983. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47:189-195.
- Soares, S., K. G. Kristinsson, J. M. Musser, and A. Tomasz. 1993. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J. Infect. Dis.* 168:158-163.
- Tomasz, A. 1974. The role of autolysins in cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235:439-447.
- Van Eldere, J., P. Janssen, A. Hoefnagels-Schuermans, S. van Lierde, and W. E. Peetermans. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37:2053-2057.
- Yoshida, R., Y. Hirakata, M. Kaku, H. Takemura, H. Tanaka, K. Tomono, H. Koga, S. Kohno, and S. Kamihira. 1997. Trends of genetic relationship of serotype 23F penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan. *Microbiology* 43:232-238.