

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 367**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2010** **E 10735085 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015** **EP 2591102**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento específico del contenido de ADN total de gérmenes bacterianos y un kit para dicho fin**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2015

73 Titular/es:
DIAGON KFT. (100.0%)
Baross u. 48-52
1047 Budapest, HU

72 Inventor/es:
KISS, GÁBOR;
KISS, JÁNOS;
SZTANCSIK, KATALIN y
BERNÁTH, GEORGINA

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 367 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el aislamiento específico del contenido de ADN total de gérmenes bacterianos y un kit para dicho fin

El sujeto de la presente invención es un procedimiento para el aislamiento específico del contenido de ADN total de gérmenes de muestras de orígenes diferentes y un KIT para la realización del procedimiento en la práctica.

En el control higiénico de la salud pública de aguas potables, aguas ambientales, productos alimenticios, áreas de trabajo, diferentes superficies comunales y ambientales una parte esencial de las pruebas microbiológicas de muestras recogidas es la determinación cualitativa y cuantitativa de gérmenes bacterianos. Para tales determinaciones -además del cultivo in vitro en medios selectivos o no selectivos y de la detección microscópica de ellos y además de las reacciones bioquímicas elaboradas por etapas metabólicas bacterianas individuales- ahora están disponibles también varios procedimientos diagnósticos moleculares basados en ácidos nucleicos, tales como por ejemplo reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la amplificación in vitro de secuencias de ácidos nucleicos, o el procedimiento de secuenciación revelando secuencia de bases de ácidos nucleicos, o electroforesis en gel de agarosa que analiza el tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos obtenidos [Nucleic Acid Isolation and Purification, 2ª edición, Roche Diagnostics GmbH, 2003]. A diferencia de las técnicas tradicionales, estos procedimientos diagnósticos moleculares basados en ácidos nucleicos permiten análisis incluso en el caso de una cantidad pequeña de muestras iniciales. La plantilla de estos procedimientos diagnósticos moleculares basados en ácidos nucleicos es el ácido nucleico bacteriano en una concentración y pureza requerida por el procedimiento analítico actual en uso. Sin embargo, estos dos parámetros, la concentración de ácidos nucleicos y la pureza varían con los procedimientos preanalíticos aplicados, es decir con los procedimientos de alteración de muestra y de extracción de ácidos nucleicos. La alteración de muestra para acceder a los ácidos nucleicos de plantilla es un procedimiento multietapa, durante el que el uso actual que satisface las etapas individuales puede tener lugar por separado o combinado con cada uno de los otros. Tradicionalmente la alteración comienza con lisis celular, seguida por la unión-extracción y purificación selectivas del ácido desoxirribonucleico (ADN) en las siguientes etapas y después el procedimiento finaliza con la determinación cualitativa y cuantitativa del ácido nucleico aislado purificado. La alteración puede tener lugar asegurando el pH, la temperatura y las condiciones iónicas adecuados, mecánicamente (por ejemplo por hinchazón, disgregación por ultrasonidos, alteración por triturado), químicamente (por ejemplo con un tampón que contiene enzimas, tensioactivos, detergentes quelantes de iones), en un compuesto combinado de desnaturizador proteico y aditivos que inhiben las desoxirribonucleasas intracelulares. A partir del lisado obtenido por alteración, el ácido nucleico objetivo puede aislarse y purificarse con la ayuda de precipitación-extracción, centrifugación, electroforesis o cromatografía. El análisis semicuantitativo del rendimiento de ácidos nucleicos purificados a partir de macromoléculas y fragmentos celulares adicionales puede tener lugar por ejemplo midiendo la emisión fluorescente de ADN intercalando tinción poliaromática (por ejemplo bromuro de etidio) inducida a longitud de onda ultravioleta (UV). El análisis cuantitativo del análisis de ácidos nucleicos aislados se puede llevar a cabo en base a la densidad óptica (D.O.) medida a longitud de onda λ_{260} con espectrometría de luz ultravioleta. Una unidad de D.O. corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de ADN. Con el fin de definir la pureza del ADN aislado, se usa la proporción de la densidad óptica medida a dos longitudes de onda de UV diferentes ($\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$), que es la proporción de absorción lumínica medida a la longitud de onda característica de la solución acuosa de los ácidos nucleicos y la solución acuosa de las proteínas (λ_{260} y λ_{280}). De forma favorable el valor de la proporción de $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$ varía en el intervalo entre 1,4-2,0. Valores inferiores indican contaminación proteica (por ejemplo componentes proteicos residuales del lisado celular), mientras que valores más altos (>2) indican errores de medidas espectrofotométricas u otras posibilidades de contaminación. Cuando se usa PCR, favorablemente la proporción $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$ debe estar entre 1,4-1,8.

En la práctica de salud pública de cada día tradicional, la mayoría del ADN bacteriano comúnmente se aísla usando la mezcla de fenol-cloroformo [Sambrook J. et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición 2001]. El procedimiento está basado en que las células se alteran con tampones de lisis que contienen detergentes, enzimas que degradan proteínas, después se añade mezcla de fenol-cloroformo al lisado, como resultado de lo que la fase de fenol ácida extrae entre otros los componentes proteicos y de ARN del lisado [Cohn E.J., Conant J.B. (1926): PNAS 12: 433-438] y el ADN se puede aislar con un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo con isopropanol [Kirby K.S. (1956): Biochem.J. 64: 405-408].

Los disolventes orgánicos mencionados anteriormente son indudablemente eficientes en el procedimiento de alteración y aislamiento, pero su efecto tóxico potencial que amenaza al personal de laboratorio y al ambiente no se puede despreciar. Una solución bastante común en evitar el uso de disolventes orgánicos mencionados anteriormente es cuando después de alterar muestras biológicas se añade también un componente caotrópico [Chomczynski P. et al. (1997): Biotechniques 22: 550-553.] al sistema de tampón aislando el contenido de ADN genómico. Debido al componente caotrópico que desnaturiza proteínas (por ejemplo NaJ, KJ, Na-perclorato, clorhidrato de guanidio, -GC, guanidio, tiocianato -GTC) y al nivel de pH apropiado las proteínas asociadas a ácidos nucleicos se disocian y la inhibición funcional de nucleasas que degradan ácidos nucleicos facilita aislamiento de ADN eficiente. La Patente de los EE.UU. 4900677 describe un procedimiento adecuado para la alteración tanto de bacterias Gram negativas como de bacterias Gram positivas, después de lo que el contenido en ADN cromosómico de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis* se aísla, entre otros, en un procedimiento rápido usando una solución libre de disolventes orgánicos. Con el fin de extraer ADN cromosómico, la masa celular de 10^7 - 10^8 inicial se altera en un cóctel basado en tampón de Tris de pH = 8,0 que contiene enzimas con espectros de objetivos diferentes (lisozima,

endo-N-acetil-muraminidasa, acromopeptidasa, etc.), componentes solubilizantes (por ejemplo dimetilsulfóxido, dimetilformamida), componentes tensioactivos (por ejemplo dodecilsulfato de sodio, Tritón X-100, CHAPS, CHAPSO) y componentes quelantes de iones (por ejemplo EDTA), mezclando con agitador vorticial. El contenido de ácido ribonucleico (ARN) contaminante se digiere con enzima ribonucleasa (ARNasa) y el contenido de proteínas enzimáticas y no enzimáticas residual se neutraliza añadiendo Proteinasa K. Un componente caotrópico (por ejemplo: Na-trifluoroacetato, Na-perclorato, NaJ) que respalda el aislamiento de ADN se añade al sistema y el ADN obtenido en casi una hora se purifica usando diálisis de membrana de colodión. La alteración de muestras y la neutralización de proteínas residuales se respaldan adicionalmente con temperaturas de reacción que varían (37 °C y 60 °C). De acuerdo con la Patente de los EE.UU. N.º: 5595876 la neutralización de proteínas residuales se respalda también incrementando la temperatura, en el curso de la así llamada extracción de ADN de tubo individual in situ de bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Evitar el uso de disolventes orgánicos en el procedimiento de alteración y aislamiento como se describe anteriormente es exitoso, pero el rendimiento de la extracción y la pureza del ADN aislado se reducen.

Incrementar el rendimiento de ADN se intenta por un enfoque intermedio, que respalda el aislamiento selectivo de ADN añadiendo una cantidad pequeña de disolvente orgánico miscible con agua en un medio de tampón alcalino (por ejemplo: pH = 8-9). En la Patente de los EE.UU. 5945515, en uno de los ejemplos de eucariotas, a partir del sistema que lisa que contiene también un componente caotrópico (GTC) en tampón alcalino el contenido de ARN se hace precipitar de manera preliminar añadiendo una cantidad pequeña de disolvente orgánico, después el precipitado se separa por centrifugación y por esto el ADN a aislarse permanece en la solución de forma selectiva. En ejemplos adicionales de la descripción de patente, con el fin de acelerar el aislamiento de ADN anterior, se redujeron en número las etapas de centrifugación y después se omitieron. Cuando se analiza la pureza del ADN obtenido de esta manera, los residuos contaminantes de ARN se detectaron también en electroforesis de geles de agarosa.

Además de los enfoques de aislamiento tradicionales e intermedios anteriores, en la práctica otras técnicas alternativas de aislamiento de ADN que operan sobre diferentes principios han llegado a difundirse ampliamente durante aproximadamente dos décadas. De hecho un tipo de estas técnicas alternativas usa el principio de cromatografía en el aislamiento de macromoléculas biológicas [por ejemplo la purificación de ADN plasmídico a partir de *E. coli* lisada usando sistema cromatográfico de casetes de cartuchos de acuerdo con la Patente de los EE.UU. 6428703, o la separación de ácidos nucleicos en cartucho de cromatografía silanizado de acuerdo con el documento WO 91/05606]. Estos procedimientos están todos basados en la idea de que después de la lisis celular el contenido de ADN del lisado se une de forma selectiva, reversiblemente sobre la superficie de vehículos. Estas superficies de vehículos pueden ser filtros (nitrocelulosa, nailon, acetato de celulosa, óxido metálico), matrices basadas en plástico (PVDF) o vidrio (gel de sílice SiO₂, SiO₂-TiO₂) [Boom R. et al. (1990): J.Clin.Microbiol. 28: 495-503., Mackey K. et al. (1998): Mol.Biotechnol. 9: 1-5., Boom R. et al.(1999): J.Clin.Microbiol. 37: 615-619., Dames S. et al. (2006): J.Mol.Diagn. 8: 16-21., Gushikem Y., Rosatto S.S. (2001): J.Braz.Chem.Soc. 12: 695-705], o pueden ser micropartículas y perlas obtenidas combinando diferentes iones y polímeros, durante el uso de los que las etapas de alteración y extracción de ADN pueden automatizarse [Youngman L.D. et al. (2002): Clin.Chem. 48: 1629-1630., Smith K. et al. (2003): J.Clin.Microbiol. 41: 2440-2443]. El documento WO 2004/033707 describe el uso de vehículos de Na-silicato, el documento WO 2004046231 describe el uso de sílice, gel de sílice unido a vehículo de polipropileno, poliestireno, policarbonato (tubo, pocillo de microplaca) en el curso del aislamiento de ADN mitocondrial eucariota (ADNmt) o de contenido de ADN en sangre total. En el procedimiento de etapa individual descrito en el documento WO 1998023630 el papel del polímero hidrófobo aromático hidroxilado, polihidroxiestireno se describe en retención de los componentes contaminantes del lisado celular, mientras que el ácido nucleico se marcha con el eluyente. El documento WO 2002/000930 describe extracción de ADN a partir de muestra de mancha de heces aplicada sobre un vehículo de nailon o sobre un vehículo impregnado de guayacol, con la ayuda de una sal de guanidinio, mientras que en la publicación de los EE.UU. N.º: 2008/0319182 la unión del ADN se asegura proporcionando una superficie catiónica especial. Los ácidos nucleicos, incluyendo ADN, se unen sobre la superficie de estos vehículos sometidos a circunstancias físico-químicas únicas (temperatura, fuerza centrífuga, condiciones electrolíticas, etc.), con enlaces secundarios reversibles y con características de selectividad para el vehículo. Después de retirar el vehículo con el ADN unido en su superficie de la solución y después de una desalinización apropiada, el ADN unido se puede aislar eluyéndolo a partir del vehículo.

Nocker A., Camper A.K. (2006): Appl. Environ. Microbiol. 72(3): 1997-2004 divulga un procedimiento para distinguir entre células bacterianas viables y células bacterianas muertas. Bromuro monoazida de etidio (EMA) un tinte intercalante de ácidos nucleicos se usa para la discriminación selectiva de células muertas, ya que EMA disuelto en agua, puede entrar solo en las células bacterianas con paredes celulares y membranas celulares deficientes.

El documento WO 96/21729 divulga filtración de material biológico a través de tierra de diatomeas para reducir concentración de ARN, para purificar ADN de plásmido recombinante (u otro) de componentes de ARN, para separar diferentes formas de ARN (solubles), en una mezcla de material biológico.

Para aplicaciones moleculares aguas abajo (por ejemplo PCR, digestión enzimática, secuenciación, electroforesis, etc.) los parámetros más importantes del ADN aislado son pureza (véase más adelante), cantidad (concentración µg/ml) y la integridad/fragmentación es decir el mantenimiento físico de la molécula.

La ventaja de los procedimientos de extracción tradicionales con los disolventes orgánicos mencionados anteriormente es la pureza relativamente satisfactoria (índice de D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ = 1,4-1,7) y la gran concentración (>50 µg/ml). Su desventaja es que los disolventes residuales pueden perturbar las aplicaciones moleculares aguas abajo sensibles (por ejemplo PCR en tiempo real dirigida a sonda de hidrólisis, microensayo) y que el procedimiento de aislamiento lleva mucho tiempo (mínimo 1,5-2 horas). Con respecto a su eficiencia estos procedimientos tienen pobre reproducibilidad, la varianza combinada entre dos aislamientos independientes (% de VC) es alta, de forma que son difíciles de ajustar a protocolos de laboratorio estándar.

Las técnicas alternativas y los reactivos alternativos basados en la unión selectiva a ADN a partir de una solución que usa vehículos enumerados anteriormente tienen parámetros técnicos mejores, su índice de reproducibilidad es mejor, operan de acuerdo con un protocolo ligeramente más rápido y debido a su naturaleza estandarizada son más fáciles de ajustar a procedimientos de aislamiento instrumentales.

La patente de los EE.UU. N.º: 5234809 describe un procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos, entre otros, con cuyo uso se puede aislar tanto ADN de cadena simple como ADN de cadena doble. En el curso del procedimiento descrito el ácido nucleico objetivo se aísla sin análisis preliminar, a partir de la muestra biológica compleja en sí misma (por ejemplo sangre total, suero sanguíneo, orina) de una forma tal que en el sistema de tampón de tubo individual el quelante de iones (por ejemplo EDTA) que une iones divalentes, el compuesto caotrópico (por ejemplo GTC) que precipita moléculas proteicas a partir de su solución y la superficie de matriz (por ejemplo sílice, o partículas de látex, o filtro de nitrocelulosa) que une ácidos nucleicos objetivo están todos en el mismo espacio de reacción. En el caso de muestras bacterianas el resultado del procedimiento está influenciado significativamente por la concentración celular inicial, de tal forma que el intervalo de tamaño de las partículas de sílice de la matriz de unión de ácidos nucleicos varía por aplicación.

El documento WO 95/34569 contiene un ejemplo adicional de alteración celular y aislamiento de ADN en el mismo espacio de reacción, en el curso del que la muestra pequeña significativamente contaminada (por ejemplo 5 x 10³ células, 0,5 µl de sangre) está lisada en la misma microplaca de pocillos, en la que el contenido de ADN se extrae sobre una superficie de matriz no porosa, dispersa, homogénea que consiste en partículas de SiO₂ de 40 nm. El tamaño del ADN aislado en el curso del procedimiento varía en el intervalo entre 50-60.000 nucleótidos. De forma similar, el documento DE 4422044 también describe alteración celular y aislamiento de ADN en el mismo espacio de reacción, en el curso del que el contenido de ADN de plásmido bacteriano, o cultivos de HeLa está aislado con eficiencia similar a partir de la misma cantidad pequeña de muestra inicial como anteriormente.

Una ventaja del mismo espacio de reacción anterior es la minimización de contaminación técnica (por ejemplo pipeteando). Sin embargo, no puede despreciarse que en este espacio de reacción común, además de moléculas de ácidos nucleicos a aislarse, también pueden absorberse o unirse en las superficies de matrices componentes adicionales (por ejemplo lípidos, ácidos nucleicos de cadena individual, pigmentos, moléculas pequeñas) como inhibidores potenciales de aplicaciones aguas abajo (por ejemplo PCR). La eliminación de estos inhibidores aguas abajo potenciales requiere etapas separadas adicionales en el procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos. Debido a esto, la elución de ácidos nucleicos unidos a vehículos basados en sílice enumerados anteriormente con un eluyente que contiene también quelante de iones está precedida por lavar varias veces con tampón y disolvente orgánicos. Como se menciona anteriormente, tema fundamental de aislamiento de ADN es el mantenimiento o la integridad de la molécula durante el proceso completo. Los efectos mecánicos aplicados, tales como pipeteo, mezclado, centrifugación, así como los contactos con diferentes componentes detergentes, quelantes de iones y caotrópicos puede dar como resultado distorsiones o incluso fracturas en la estructura de los ácidos nucleicos. La realización de lisis celular y el aislamiento de ácidos nucleicos en el mismo espacio de reacción como se describe anteriormente minimiza la necesidad de centrifugación todo ofrece posibilidades para mantenimiento incrementado de la integridad del ADN. Al mismo tiempo, además de la integridad del ADN, la pureza y el rendimiento de ácidos nucleicos requeridos por aplicaciones moleculares aguas abajo no se puede despreciar. Siguiendo esta ayuda completa, a diferencia de los medios de espacio único, en el procedimiento de los autores de la invención de acuerdo con la invención los autores de la invención llevan a cabo lisis celular y después aislamiento de ADN selectivo en espacios de reacción aparte, como resultado de lo que las etapas de lavado llegan a ser más simples, el aislado de ADN se produce en aproximadamente 30 minutos, su pureza de acuerdo con la proporción D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ (1,8 en promedio) y su rendimiento (20-100 µg/100 mg de muestra inicial) es favorable para PCR y otras aplicaciones moleculares aguas abajo. En el procedimiento de los autores de la invención de acuerdo con la invención, para la unión selectiva de ADN de cadena doble bacteriano se crea una -SiO₂-TiO₂-matriz con estabilidad química y térmica incrementadas, sobre cuya superficie están grupos -OH (silanol, tilanol) y grupos de dodecilamina químicamente activos y que se ha reticulado de forma preliminar favorablemente con engarces de dodecilamina.

La Patente de los EE.UU. N.º 6787307 proporciona una solución para aislamiento de ácidos nucleicos, ADN de cromosoma bacteriano, extracción de ADN plasmídico con una superficie de matriz que consiste en partículas de sílice magnetizadas. En el procedimiento descrito, usando el campo magnético apropiado las partículas de sílice magnetizadas pueden separarse fácilmente de forma conjunta con la unión de ácidos nucleicos a su superficie, para aislarse a partir del lisado. En la etapa de aislamiento anterior, además las moléculas de ADN objetivo del lisado producidas por alteración celular, componentes celulares adicionales, los inhibidores de aplicaciones aguas abajo (por ejemplo PCR), también llegan a adherirse a la superficie de matriz. La eliminación de estos últimos componentes es un procedimiento multietapa que lleva mucho tiempo (véase anteriormente). A diferencia de esto, en el procedimiento de

los autores de la invención de acuerdo con la invención, no se adhiere ningún inhibidor a la superficie de matriz de unión a ADN creada por los autores de la invención.

De acuerdo con una de las realizaciones de la Publicación de los EE.UU. N.º: 2010/0021905, la mezcla ADN-ARN de origen de tejido de mamíferos está unida a una superficie de matriz basada en sílice, en circunstancias tamponantes respaldando la unión de ambos ácidos nucleicos. El ADN unido se eluye en un reactivo alcalino (pH = 10) por separado a partir de las proteínas y el ARN. La selectividad del procedimiento se incrementa en proporción con el tamaño de anión de sal de guanidinio, de tal forma que de acuerdo con la enseñanza de la descripción, en vez de iones de cloruro la presencia de iones de tiocianato es más favorable para la extracción eficiente de ADN. En el respaldo caotrópico de aislamiento de ADN en el vehículo de acuerdo con la invención de los autores, la superficie de -SiO₂-TiO₂ -matriz, clorhidrato de guanidinio también demostró ser favorable.

Las dificultades de las técnicas alternativas conocidas pueden deberse primero de todo a que

a) si son capaces de aislar ADN con gran selectividad, después el rendimiento de ADN puro libre de componentes que inhiben aplicaciones moleculares aguas abajo (por ejemplo PCR), permanece por debajo de 20 µg del ADN aislable total, o

b) si es posible rendimiento de ADN mayor (20-100 mg/ml), después la pureza del ADN obtenido es más cuestionable, que si la proporción D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ es baja (1,3-1,4).

Además, las técnicas alternativas se caracterizan generalmente por que

a) en la mayoría de los casos los parámetros de selectividad y cantidad de unión de ácido nucleico al vehículo son cuestionables, es decir además de los ADN de doble cadena que se desea aislar hay también unidos ADN de cadena simple y ARN y la presencia de estos últimos puede distorsionar o perturbar las aplicaciones moleculares aguas abajo y la especificidad molecular,

b) la cantidad del ADN aislado depende significativamente de la capacidad de unión de los vehículos,

c) la calidad y el contenido de inhibidor del ADN aislado depende significativamente de la muestra,

d) son mayoritariamente eficientes en el caso de muestras microbianas selectivamente enriquecidas, no son tan eficientes en aislamiento a partir de muestras bacterianas complejas o mezcladas,

e) de la forma más importante, casi todas las técnicas de aislamiento extraen ADN tanto de bacterias viables como de bacterias no viables y el ADN cromosómico que deriva de células no viables genera señales de falsos positivos en el curso de los procedimientos de detección.

Al respecto del trabajo de los productos químicos y de los reactivos, en la práctica actual no hay ningún procedimiento de preparación de ADN que cumpla todos de los siguientes requerimientos al mismo tiempo:

a. se puede llevar a cabo de forma razonablemente rápida incluso en el caso de antecedentes de infraestructura de laboratorio generales,

b. aísla el ADN total exclusivamente de células vivas, es decir proporciona un resultado dinámico,

c. proporciona un resultado significativo incluso en el caso de número apropiadamente bajo de gérmenes microbianos,

d. es específico solo del ADN de cadena doble,

e. es adecuado para obtener ADN de pureza química apropiadamente alta (sin inhibidores) y en una concentración apropiadamente alta,

f. se puede caracterizar por reproducibilidad favorable y por un número bajo de varianza combinada,

g. muestras microbianas recogidas son posibles de muchas fuentes diferentes.

El objetivo del procedimiento de acuerdo con la invención es eliminar las características desventajosas de las técnicas conocidas y elaborar un procedimiento de preparación, en el que el aislamiento específico del contenido de ADN total de gérmenes bacterianos tiene las ventajas incluidas en los puntos a.-g. y puede introducirse como un procedimiento validado fiable en la práctica diagnóstica microbiológica (salud pública, práctica clínica, higiene del agua y de la comida).

Se puede ver en base a los ejemplos descritos anteriormente que ninguno de los procedimientos de alteración celular y de extracción de ácidos nucleicos de la fase preanalítica que precede a diagnósticos moleculares basados en ácidos nucleicos bacterianos se encarga de la separación de poblaciones de células viables o no viables de las muestras iniciales. Hacer una distinción entre las dos condiciones celulares últimas puede influir significativamente en el resultado de aislar el contenido de ADN total bacteriano y también de aplicaciones moleculares aguas abajo.

De forma similar a eucariotas, las dinámicas de poblaciones celulares bacterianas están también reguladas por proliferación celular y muerte celular influidas por factores extracelulares e intracelulares. Por esta razón, cuando se aísla el contenido en ADN total bacteriano de muestras de higiene de salud pública el fenómeno de muerte celular es un factor que no puede ignorarse.

En sistemas biológicos un tipo de muerte celular es necrosis, es decir daño celular inducido por efectos físicos y/o químicos y/o biológicos, que es un proceso que se puede describir por ejemplo por la permeabilidad pasiva incrementada de la membrana celular y de la pared celular, la disgregación de los componentes celulares y escape del contenido celular, generalmente por la degradación de la célula [Robbins y Cotran Pathologic Basis of Disease: 8ª edición, Saunders, Elsevier, 2010], proceso en el que los productos de descomposición que se derivan de la célula necrótica tienen efectos tóxicos sobre otras en la vecindad. En sistemas biológicos otro tipo de muerte celular es apoptosis, que es muerte celular programada bien definida en eucariotas [Díaz L.F. et al.(2005): Cell Death and Differentiation 12: 1449-1456]. Este último tipo de muerte celular es un procedimiento activo sometido a control genético influido por estímulos ambientales (por ejemplo reordenamientos morfológicos que acompañan cambios en actividad metabólica de periodos distintos en ontogenia), en el curso de los que debido a los cambios estructurales en la membrana celular (por ejemplo pérdida de asimetría de fosfatidilserina, modificación de procedimientos de transporte) la capacidad de adhesión y la turgencia de la célula disminuye y aparece contracción de la célula junto con escisiones enzimáticas intracelulares, en el curso de las que el contenido de ADN llega a fragmentarse y al final del proceso la célula que ha sufrido apoptosis se utiliza por otras en la vecindad. Un número creciente de datos se relacionan con el papel de los mecanismos apoptóticos en la así llamada adaptación al estrés ambiental de poblaciones procariotas [Lewis K. (2000): Microbiol.Mol.Biol.Rev. 64: 503-514., Koonin E.V., Aravind L. (2002): Cell Death and Differentiation 9: 394-404]. Un ejemplo para esto es la esporulación del género de Gram-positivas *Bacillus* o *Streptomyces* y el género de Gram-negativas *Myxobacteria*, que conduce a la célula a la muerte celular programada con enzimas de autólisis inducidas en la célula madre. La aparición adaptativa de mutaciones no cultivables en numerosas bacterias Gram-negativas se puede mencionar también aquí como un ejemplo [Hochman A. (1997): Critical Rev.Microbiol. 23: 207-214].

Para el aislamiento de contenido en ADN total de gérmenes bacterianos de muestras de higiene de salud pública, una etapa anterior para separar poblaciones celulares viables y no viables es de significancia diagnóstica. Consecuentemente un objetivo adicional del procedimiento de los autores de la invención es elaborar un procedimiento de separación celular que asegure la separación de células bacterianas viables y no viables y respaldar el aislamiento de contenido en ADN total exclusivamente a partir de células viables.

Los criterios de muerte celular descritos anteriormente pueden explicar la observación de los autores de la presente invención, de acuerdo con la que en nuestra prueba los complejos de muestras necróticas aparecen en la superficie de las células bacterianas no viables, complejos que resultan en la agregación de esta población celular. Los autores de la invención también observaron que la hidratación de células no viables, su suspensibilidad inferior es diferente de la suspensibilidad de células viables y las proporciones de superficie celular a volumen celular también cambian. Los autores de la invención se dieron cuenta de que en base a las características fisicoquímicas anteriores las células bacterianas viables y no viables se pueden separar claramente, si una solución que contiene una mezcla tamponada de detergente y electrolito apropiados, favorablemente Tritón X-100, ácido etilendiaminatetraacético, KCl o NaCl, ácido cítrico-1-hidrato, que es el así llamado tampón que retira las células no viables de los autores de la invención se usa y las células se sedimentan cambiando la fuerza del campo de centrifugación que influye en la sedimentación. Los autores de la invención supusieron que como resultado del cambio en la hidratación de la bacteria sometida a necrosis, la superficie celular, el volumen celular, que es el tamaño celular y la densidad cambiarán también, lo que, conjuntamente con el cambio de fuerza de campo elegido apropiadamente, es un factor de diferenciación durante la sedimentación por centrifugación.

Cuando se estudian ejemplos de eucariotas, la separación de células viables y no viables por centrifugación a una fuerza de campo apropiada tiene lugar en base al tamaño celular y a la densidad/hidratación. Como resultado de esto la masa de células no viables aparece en el sobrenadante, mientras que la masa de células viables aparece en el sedimento [Fisher D. et al.: Cell Separation: A Practical Approach, Oxford Univ.Press, 1998.]. Sin embargo, debe considerarse que incluso a campos de fuerza de centrifugación correspondiente la separación es a menudo incompleta y se puede detectar una pequeña cantidad de células viables en el sobrenadante. Una oportunidad adicional de separación que suplementa lo anterior es centrifugación de gradiente de densidad usada para la separación de células con diferentes tamaños y densidades y si es necesario, una solución de separación suplementaria adicional puede ser el cultivo in vitro de las fracciones de sedimentación individuales. La serie de etapas de separación descrita anteriormente es obviamente consumidora de mucho tiempo y durante estas etapas de separación las probabilidades de pérdida celular se acumulan, reduciendo la precisión de una aplicación aguas abajo. Sin embargo, el mantenimiento de masa celular de la muestra de prueba inicial es esencial en la separación de células viables y no viables para el aislamiento específico del contenido en ADN total de gérmenes bacterianos viables exclusivamente.

-Sobre la base de lo anterior, en nuestro procedimiento la distinción de células viables y no viables se basa en los diferentes tamaños celulares característicos de las dos afecciones celulares y en su permeabilidad e hidratación diferentes debidas a la transformación estructural y a la afinidad iónica cambiada de la membrana celular. La distinción hecha de acuerdo con nuestro procedimiento se comprueba con la ayuda de un dispositivo de citómetro de flujo.

El uso del citómetro de flujo se basa en que una suspensión celular centrada hidrodinámicamente se hace pasar a través de un haz de láser monocromo de una forma tal que las células que pasan por la ventana de detección una a una a un tiempo dado dispersan la luz hacia delante y hacia un lado correspondiendo a su tamaño y a su organización interna (dispersión hacia delante-tamaño) (dispersión lateral-organización interna) y la luz se redirige hacia los detectores por un sistema óptico. Los signos que llegan a los receptores se resumen por el aparato electrónicamente y se presentaron en forma de un dispersograma o histograma (curva de campana). En el caso de los autores de la invención el tamaño celular se toma como una base para hacer una distinción entre células viables y no viables (véase la descripción). El dispersograma y el histograma indican la cantidad de células que se pueden asignar al tamaño celular indicado, de tal forma que es obvio para un especialista experto en la técnica que la citometría de flujo es adecuada para la cuantificación instrumental de poblaciones celulares viables y no viables de la muestra en estudio [Shapiro H.M.: Practical Flow Cytometry, 2ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 1988].

Los autores de la invención se dieron cuenta de que después de lavar la muestra repetidamente varias veces con su tampón que retira células no viables y después de centrifugación en circunstancias dadas, las células no viables permanecen en el sobrenadante, mientras que las células bacterianas viables pueden sedimentarse selectivamente y reenviarse para aislamiento de ADN. Los autores de la presente invención probaron y validaron su reconocimiento con detección de citometría de flujo descrito anteriormente cuando comprobaron la presencia de células viables y no viables en el sedimento y en el sobrenadante. Sus resultados se resumen en la figura 1 en dispersogramas e histogramas de 1a. y 1b. (para explicación detallada véase la descripción de la figura).

En este punto, con el sedimento que contiene células viables separadas de la muestra celular tratada con tampón que retira células no viables desarrollado por los autores de la invención, el procedimiento de aislamiento de ADN puede iniciarse (lisis, unión de ADN, lavado, elución).

Durante nuestros experimentos, los autores de la presente invención tuvieron éxito en desarrollar una matriz vehículo de unión de ADN, con la que exclusivamente se unen ADN de cadena doble directamente y selectivamente tras la lisis celular, sin los componentes inhibidores de contaminación de la muestra lisada. En nuestra matriz vehículo de unión a ADN de cadena doble el uso de $-\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ -matriz que contiene $-\text{OH}$ químicamente activos y grupos de dodecilamina es favorable. Ello es especialmente favorable, si los grupos de dodecilamina activados están reticulados de forma preliminar con engarces de dodecilamina. Con esta matriz reticulada, las condiciones para reacción específica de unión a objetivo se crean inhibiendo mientras la unión de contaminantes y componentes inhibidores residuales de muestras complejas (sangre, heces, suelo).

La sensibilidad del procedimiento de los autores de la invención se demostró por el aislamiento efectivo del contenido de ADN total de las muestras de prueba ralas con título de UFC (unidades formadoras de colonia) bajo (véase figura 2 y su explicación detallada).

El sujeto de nuestra invención es un procedimiento para el aislamiento específico del contenido de ADN de gérmenes bacterianos de muestras diferentes, en el curso de los que las células no viables se lisan, a partir del lisado el contenido en ADN total se une selectivamente, el contenido de ADN total se lava y se desaliniza y después el ácido nucleico desalinizado se eluye a partir de la superficie de unión en una solución acuosa. Por muestra, los autores de la presente invención quieren decir materiales de prueba de higiene de salud pública tales como agua, comida, materiales ambientales cénicos, sólido y líquidos, así como aire atrapado en líquido, cuyas poblaciones celulares bacterianas se tratan con el tampón que retira células no viables de los autores de la invención directamente después de la toma de muestras o antes del enriquecimiento, antes de la alteración lítica. La esencia de usar el tampón que retira células no viables de los autores de la presente invención es que las células bacterianas no viables y las células bacterianas viables se distinguen en base a sus características fisicoquímicas, como resultado de lo que el ADN de cadena doble que deriva exclusivamente del lisado de las células viables está unido sobre la matriz vehículo de unión a ADN, favorablemente $-\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ -matriz que contiene $-\text{OH}$ químicamente activado y grupos dodecilamina, favorablemente reticulados con engarces de dodecilamina reticulados de forma preliminar. Sobre matriz vehículo de unión a ADN vínculos secundarios no específicos se bloquean añadiendo trehalosa o dextrano y BSA.

En el caso de una realización favorable del procedimiento las células bacterianas viables y no viables se distinguen en base a su permeabilidad de superficie celular diferente y afinidad iónica enumeradas anteriormente.

En el caso de una realización favorable adicional del procedimiento se usa una solución de lavado que penetra diferencialmente para distinguir células bacterianas viables y no viables. Por ejemplo una solución de lavado que contiene detergente, electrolito, favorablemente Tritón X-100, ácido etilendiamina-tetraacético, KCl o NaCl, ácido cítrico-1-hidrato en una mezcla tamponada (para composición véase figura 4-tabla 1) se usa y la fuerza de campo de la centrifugación que influye en la sedimentación celular se cambia.

En el procedimiento de los autores de la invención la lisis de células bacterianas viables se lleva a cabo con alteración mecánica o con alteración mecánica y enzimática combinadas, siendo la última favorablemente digestión con lisozimas, en tubos de destrucción preparados de forma única. La alteración mecánica de las células bacterianas está respaldada con el uso de un dispositivo de mesa.

Prácticamente, en el procedimiento de los autores de la invención de acuerdo con la invención, el contenido de ADN de

doble cadena de al menos 10^4 U.F.C./ml de muestra bacteriana se aísla con un tampón de lisis que contienen un componente rédox, agente quelante y detergentes, favorablemente ditioneitol (DTT), ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), Tritón X-100 y dodecilsulfato sódico (SDS). Sustancias colorantes contaminantes que derivan de las células bacterianas viables y de inhibidores de PCR adicionales (porfirinas, compuestos de hemo, materiales poliaromáticos) se separan durante la sedimentación del lisado bacteriano, debido a que el tampón de lisis también proporciona ambiente fisicoquímico favorable para la precipitación de estos materiales.

En el caso de una realización muy favorable del procedimiento de acuerdo con la invención, la unión selectiva libre de degradación de los ADN de cadena doble que derivan del lisado de células bacterianas viables se lleva a cabo en una $-\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ -matriz (para composición véase figura 5-tabla 3) que contiene grupos $-\text{OH}$ y dodecilamina activados químicamente, matriz que está preliminarmente reticulada con engarces de dodecilamina. En la matriz vínculos secundarios no específicos (ARN, proteínas, otras macromoléculas) se bloquean añadiendo trehalosa o dextrano y BSA.

La cantidad y calidad (pureza) del ADN de doble cadena aislado se comprueba con un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm y los valores de extinción de D.O._{260} y de D.O._{280} se comparan. La prueba de cantidad semicuantitativa es electroforesis de gel de agarosa convencional tras la amplificación de PCR in vitro del ADN aislado (para un ejemplo véase la figura 3 y su explicación detallada).

La invención también se refiere a un KIT adecuado para extraer el contenido de ADN total de gérmenes bacterianos para la realización del procedimiento descrito anteriormente, que está primero de todo para el propósito de analizar agua, comida, superficies comunales diferentes y muestras de salud pública. La imagen estructural de composición del KIT puede verse en la figura 6 (para la explicación detallada véase la descripción de la figura).

A continuación las figuras se explican en detalle.

Figura 1. Demostrar la eficiencia de la retirada de células no viables antes del aislamiento del contenido de ADN total de los gérmenes bacterianos, con la ayuda de la citometría de flujo. El eje de las x indica el tamaño celular, mientras que el eje de las y indica la cantidad de células que pueden asignarse al tamaño dado. La Figura 1a. muestra el dispersograma de citometría de flujo (puntos) y el histograma (curvas de campana) de la fracción de sedimentación de células bacterianas después de la centrifugación -tratadas con tampón que retira células no viables preparado por los autores de la presente invención (para la composición de tampón véase figura 4-tabla 1).

La Figura 1b. muestra el dispersograma de citometría de flujo (puntos) e histograma (curvas de campana) de la fracción sedimentaria de células bacterianas después de centrifugación -no tratadas con células no viables que eliminan tampón. Comparando las dos figuras, se puede ver que de acuerdo con la figura 1a. las células viables, isodiamétricas, hidratadas se pueden sedimentar en una fracción homogénea (referida como "pella" en la figura), mientras que las células necróticas ligeramente hidratadas o no hidratadas en absoluto permanecen en el sobrenadante como un resultado de tratamiento con tampón que retira células no viables).

De acuerdo con la figura 1b. cuando las células de muestra no se tratan con tampón que retira células no viables la composición del sedimento (pella) es heterogénea y una fracción adicional adicionalmente permanece además de las células viables, el histograma se extiende incorrectamente.

Figura 2. Aislamiento de contenido total de ADN de gérmenes bacterianos de acuerdo con el procedimiento de una muestra acuosa con titulación de U.F.C. (U.F.C./100 ml), comparando los valores logarítmicos de cantidad celular (eje y, curva inferior con cuadrángulos) que pueden asignarse a los números de muestra (eje x) y el rendimiento de ADN aislado (eje y, curva superior con triángulos). El contenido en ADN total de los gérmenes bacterianos se aisló de muestras de agua de diluciones diferentes, es decir títulos diferentes de U.F.C. (eje y, curva inferior con cuadrángulos) de *Legionella pneumophila*. El flujo de línea de regresión de rendimiento de ADN bacteriano ($\mu\text{g/ml}$) obtenido por nuestro procedimiento de aislamiento y del número de células inicial es similar, pero en el caso de rendimiento de ADN hay una pendiente mayor. En base al flujo similar de las líneas de regresión se puede concluir que el aislamiento de ADN total bacteriano por el procedimiento de los autores de la invención sigue de forma fiable la cantidad de células totales. El hecho de que el ADN se pueda aislar favorablemente (valores de mg/ml en la curva superior de eje y asignados a los números de muestra 5-8 en el eje x) incluso en el caso de la pendiente mayor de la línea de regresión de rendimiento de ADN y en el caso de la dilución significativa (valores de U.F.C. en la curva inferior de eje y asignados a los números de muestra 5-8 en el eje x) conduce a los autores de la invención a la conclusión de que el aislamiento de ADN de cadena doble de acuerdo con el procedimiento de los autores de la presente invención es también fiable en el caso de un título bajo de células, es decir en dilución grande. Consecuentemente el aislamiento de ADN de acuerdo con el procedimiento de los autores de la invención demostró ser sensible.

Figura 3. Análisis semicuantitativo de ADN bacteriano total aislado con el procedimiento de los autores de la presente invención de acuerdo con la invención, en el ejemplo de *E. coli*, con electroforesis de gel de agarosa. En el curso del procedimiento semicuantitativo primero el ADN libre de inhibidores, eluido desde la superficie de matriz se hace entrar en una reacción de PCR, a continuación el polinucleótido multiplicado se analiza con electroforesis de gel de agarosa usando bromuro de etidio de tinción ADN-intercalante para emisión fluorescente inducida por excitación UV. En base a las bandas de densidad vistas en la figura, el umbral de sensibilidad del procedimiento de aislamiento de los autores de

la invención es 10^4 U.F.C./ml. En la columna del extremo izquierdo del gel de agarosa se puede ver el electroforograma del polinucleótido de referencia de pesos moleculares, las otras columnas muestran la imagen electroforética del producto de PCR amplificado aislado de E. coli de muestra de agua. Los aislados de ADN de títulos bacterianos de 10^8 x U.F.C./ml; 10^6 x U.F.C./ml; 10^4 x U.F.C./ml mostrados en la parte superior de las columnas tuvieron lugar en 10 repeticiones independientes.

Figuras 4 y 5. Las Tablas 1-5 contienen detalles de las condiciones de realización posibles del procedimiento de acuerdo con la invención, tales como los componentes y los intervalos de pH del tampón que retira las células no viables, el tampón de lisis, la matriz de unión, el tampón de desalinación-lavado y el eluyente.

Figura 6. Composición del KIT para el aislamiento específico del contenido en ADN total de los gérmenes bacterianos. El kit mostrado es para procesar 42 muestras. En la figura se puede ver un sistema de aislamiento integral complejo para aislamientos de ADN microbiano. El KIT contiene las soluciones usadas en las etapas procedimentales que siguen a la retirada de células no viables, tales como el tampón de lisis, la matriz de unión, el tampón de lavado de desalinización y el eluyente, así como los tubos de destrucción descritos en el ejemplo de uso y fijados para adaptar a demandas actuales.

A continuación los autores de la invención resumen las ventajas de las realizaciones posibles de su invención. En el curso de la realización se debe seguir favorablemente más adelante la guía de las tablas de las figuras 4 y 5 anotadas a continuación.

1) La Tabla 1 muestra la composición favorable de la solución de lavado adecuada para la separación de células viables y no viables de acuerdo con la invención de los autores de la invención. Como un resultado de la separación de células viables y no viables los autores de la invención permiten el aislamiento del contenido de ADN total exclusivamente a partir de las células viables de las muestras de higiene de salud pública.

2) En el tampón de lisis de acuerdo con la tabla 2 que contiene ditioneitol reductor (DTT), dodecilsulfato sódico (SDS) y detergente no iónico (Tritón X-100), en un ambiente de tampón de Tris-HCl alcalino, en presencia de quelante de iones divalentes (EDTA), a diferencia de tampones de lisis ordinarios, la integridad de ADN en las células bacterianas alteradas se mantiene muy favorablemente.

Si el tampón de lisis de acuerdo con la invención de los autores de la invención se combina con un tubo de destrucción preparado por los autores de la invención que contiene limaduras de vidrio y bola de acero, se crea un procedimiento de alteración, que se puede adaptar a la preparación de ADN automatizada y al sistema de tratamiento de muestras en base a la destrucción mecánica.

3) El tampón de lisis descrito en el punto 2 puede también combinarse eficientemente con alteración tradicional llevada a cabo con lisozimas.

4) Con la mezcla de componentes mostrada en la tabla 3 los autores de la invención desarrollaron una matriz vehículo de unión a ADN, con la que el ADN se une directamente después de lisis celular en un grado suficientemente alto, en un orden de magnitud por encima de capacidad de unión de $20 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$.

La superficie de unión a ADN de acuerdo con el procedimiento de los autores de la invención es una $-\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ -matriz que contiene grupos $-\text{OH}$ y dodecilamina químicamente activados, reticulados favorablemente con engarces de dodecilamina, cuya matriz une ADN de cadena doble selectivamente y exclusivamente en el ambiente de acuerdo con la tabla 3 y definitivamente no une los inhibidores de PCR más comunes que derivan de las muestras biológicas (por ejemplo porfirinas, bilirrubina). En la matriz vínculos secundarios no específicos (ARN, proteínas, otras macromoléculas) se bloquean añadiendo trehalosa o dextrano y BSA.

De acuerdo con la experiencia de los autores de la invención, el componente caotrópico desnaturalizante clorhidrato de guanidinio demostró ser favorable.

5) Con nuestro tampón de lavado de eliminación de sales de acuerdo con la tabla 4 la contaminación de ADN unido sobre la superficie de matriz vehículo de unión a ADN se retira fácilmente en presencia de quelante de iones divalentes, en dos etapas de lavado con periodos de centrifugación cortos.

6) El ADN unido en la superficie de matriz vehículo de ADN de acuerdo con la tabla 3 y tratado con nuestro tampón de eliminación de sales-lavado de acuerdo con la tabla 4 se eluye de la superficie de unión con agua de calidad de PCR de acuerdo con la tabla 5.

7) El valor promedio característico de pureza de ADN eluido de acuerdo con el punto 6 es: $\text{D.O. } 260/\text{D.O. } 280 = 1,8$

El valor de VC combinado característico de pureza entre dos aislamientos independientes llevado a cabo con nuestro procedimiento es: 9 %

La concentración promedio de ADN eluida de acuerdo con el punto 6 es 60 mg/ml , el valor de VC combinado característico es: 7,5 %

La fragmentación promedio de ADN eluido de acuerdo con el punto 6 es 5-12 kilobases (kb), el valor de VC combinado característico es: 15 %. El número de gérmenes bacterianos inicial más bajo para aislamiento de ADN llevado a cabo con nuestro procedimiento de acuerdo con la invención es: 10^4 U.F.C./ml, el valor de VC combinado característico es: 10,5 %

5 8) La cantidad de ADN aislado total a partir de títulos de número de gérmenes diferentes con la ayuda de matriz vehículo de unión a ADN puede analizarse apropiadamente por detección semicuantitativa (véase figura 3 y su explicación). En el curso de detección semicuantitativa primero el ADN libre de inhibidores, eluido a partir de la superficie de la matriz se hace entrar en una reacción de POOCR, después el polinucleótido multiplicado se detecta en electroforesis de gel de agarosa convencional, con densidad fluorescente emitida por bromuro de etidio de tinción intercalante de ADN sometido a exposición a UV (véase descripción).

10 9) Una característica especial del procedimiento de los autores de la invención es que el tamaño del ADN bacteriano que se puede preparar es mínimo 500-1500 pares de bases (pb) de ácido nucleico polimérico lineal y el uso del procedimiento de los autores de la presente invención para la reparación de ADN menor que este no es favorable.

15 Una ventaja adicional del procedimiento de los autores de la invención es que el mantenimiento fisicoquímico del ADN extraído, su pureza y concentración lo hacen adecuado para usar en aplicaciones de PCR aguas abajo.

Una ventaja adicional del procedimiento de la invención de los autores de la invención es que ello puede realizarse rápidamente y puede combinarse con procedimientos de extracción tradicionales y alternativos con la ayuda del tampón de lisis preparado para este propósito.

Una pocas de las posibles realizaciones de acuerdo con la invención se describen a continuación.

20 Ejemplos de realización

Oportunidades ideales para el aislamiento de contenido en ADN total de gérmenes bacterianos en muestras de agua, comida, muestras clínicas, muestras ambientales sólidas y líquidas, así como muestras de aire atrapadas en líquido, etc.

25 En el curso de la realización se debe seguir favorablemente más adelante la guía de las tablas de las figuras 4 y 5 anotadas a continuación.

A/ Alteración de muestras con tratamiento mecánico y enzimático

La reacción se optimizó para instrumentos de laboratorio de biología molecular generales y por dispositivos de aislamiento (por ejemplo FastPrep™).

Primera fase del procedimiento/Retirada de células bacterianas no viables de la muestra

30 1. La muestra bacteriana cultivada en líquidos se sedimenta a temperatura ambiente (TA), 10 minutos.

2. La fase líquida de la muestra se transfiere a un tubo de centrifuga limpio, estéril.

3. La muestra transferida se centrifuga: 3.000 rpm, 1 min., 25 °C.

4. El sobrenadante se retira, después el sedimento se resuspende en 5 ml de TAMPÓN QUE RETIRA CÉLULAS NO VIABLES (para su composición y pH véase tabla 1).

35 5. La suspensión se mezcla cuidadosamente con un mezclador de vórtice.

6. La suspensión se centrifuga: 3.000 rpm, 1 min., 25 °C.

7. El sobrenadante se retira, después el precipitado se resuspende en 5 ml de TAMPÓN QUE RETIRA CÉLULAS NO VIABLES (para su composición y pH véase tabla 1).

8. La suspensión se mezcla cuidadosamente con un mezclador de vórtice.

40 9. La suspensión se centrifuga: 2.000 rpm, 1 min., 25 °C.

10. El sobrenadante se retira, después el sedimento se resuspende en 1 ml de TAMPÓN QUE RETIRA CÉLULAS NO VIABLES (para su composición y pH véase tabla 1).

11. La suspensión se mezcla cuidadosamente con un mezclador de vórtice.

12. La suspensión se centrifuga: 1.000 rpm, 3 min., 4 °C.

45 13. El sedimento se redisuelve en 0,2-0,5 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH = 7,5).

14. La muestra está lista para lisis celular.

Las características obligatorias de la primera fase del procedimiento son las siguientes:

a) Las soluciones de reserva se almacenaron a +4 °C.

5 b) Cuando se preparan soluciones madre relativas a procedimientos de PCR deben seguirse estrictamente protocolos de laboratorio estándar (norma EN ISO 20838:2006, GLP).

c) Trabajar en un ambiente estrictamente estéril (normas ISO 209, FS 209, BS5295, ISO 14644-1:1999), a un nivel de seguridad mínimo de BSL2 (Nivel de Bioseguridad 2).

Segunda fase del procedimiento/Lisis celular y unión de ADN de doble cadena sobre la superficie de matriz vehículo

10 1. Transferir la muestra tratada de acuerdo con las etapas 1-14 de la primera fase del procedimiento en un tubo de destrucción de 2 ml conteniendo 0,1 g de limaduras de vidrio y una bola de acero de CR-Va del tamaño de 4,5" (4,5 x 25,4 mm).

2. Situar el tubo de destrucción que contiene la muestra en un disruptor asimétrico homogeneizante (por ejemplo Fast-Prep™) y después comenzar la alteración cíclica. Después de 30 segundos la muestra puede hacerse pasar.

15 3. Añadir enzima lisozima a la muestra a una concentración final de 100 mg/ml e incubarla durante 15 minutos a 37 °C. Después se hace pasar la muestra.

4. Añadir 1 ml de TAMPÓN DE LISIS (composición y pH de acuerdo con la tabla 2) a la muestra tratada mecánicamente y enzimáticamente. Mantener a temperatura ambiente durante 1-2 minutos.

5. Centrifugar la suspensión: 13.000 rpm, 5 min., 4 °C.

6. Transferir 800 ml del sobrenadante dentro de un tubo de centrifuga de 2,5 ml estéril limpio.

20 7. Añadir 800 ml de MATRIZ DE UNIÓN A ADN (composición y pH de acuerdo con la tabla 3).

8. Cerrar el tubo de centrifuga.

5. Cuidadosamente rotar la suspensión 10-15 veces. En esta etapa no usar un mezclador de vórtice por medio alguno.

9. Incubarla durante 2 minutos a temperatura ambiente, rotar lentamente el tubo a intervalos amplios.

10. Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm; 1 minuto. Retirar el sobrenadante.

25 11. Suspender el precipitado en 700 ml de TAMPÓN DE LAVADO DE ELIMINACIÓN DE SALES (composición y pH de acuerdo con la tabla 4).

12 Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm; 1 minuto. Retirar el sobrenadante.

13. Suspender el precipitado en 500 µl de TAMPÓN DE LAVADO DE ELIMINACIÓN DE SALES (composición y pH de acuerdo con la tabla 4).

30 14. Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm, 30 segundos. Retirar el sobrenadante.

15. Eliminar el sobrenadante residual por encima del precipitado cuidadosamente, sin tocar o agitar la matriz.

16. Permitir secar la matriz: 2 min., 37 °C.

17. Añadir 100-120 µl de ELUYENTE (véase tabla 5) al precipitado de matriz seco. Suspender el precipitado.

18. Dejarlo permanecer a temperatura ambiente, 1 minuto.

35 19. Centrifugar: 12.000 rpm; 1 minuto.

20. Transferir el sobrenadante dentro de un tubo de centrifuga libre de ADNAsas estéril limpio.

21. El ADN aislado está listo para aplicaciones corriente abajo.

Las características obligatorias de la segunda fase del procedimiento son las siguientes:

40 a) Soluciones y componentes se almacenan a +4...+8 °C, con la excepción de MATRIZ DE UNIÓN A ADN, que se mantiene a temperatura ambiente.

b) Cuando se preparan soluciones madre relativas a procedimientos de PCR, deben seguirse estrictamente los

protocolos de laboratorio estándar (norma EN ISO 20838:2006, GLP).

c) Trabajar en un ambiente estrictamente estéril (normas ISO 209, FS 209, BS5295, ISO 14644-1:1999), a un nivel de seguridad mínimo de BSL2 (Nivel de Bioseguridad 2).

Tercera fase del procedimiento/Control de calidad y cantidad

- 5 La concentración de ADN aislado se determina por la técnica de laboratorio convencional de espectrofotometría, a una longitud de onda de $\lambda = 260$ nm. La pureza del ADN aislado se caracteriza por la proporción de valores de densidad óptica medidos a longitudes de onda de $\lambda = 260$ nm y $\lambda = 280$ nm.

Las características obligatorias de la tercera fase del procedimiento son las siguientes:

- 10 a) Durante el procedimiento de espectrofotometría seguir estrictamente los protocolos de laboratorio estándar relativos a procedimientos de PCR (norma EN ISO 20838:2006, GLP).

b) Trabajar en un ambiente estrictamente estéril (normas ISO 209, FS 209, BS5295, ISO 14644-1:1999), a un nivel de seguridad mínimo de BSL2 (Nivel de Bioseguridad 2).

B/ Alteración de muestras con tratamiento mecánico

- 15 La reacción se optimizó para instrumentos de laboratorio de biología molecular generales y por dispositivos de aislamiento (por ejemplo FastPrep™).

Primera fase del procedimiento/Eliminación de células bacterianas no viables a partir de la muestra. Las etapas y características obligatorias del procedimiento son las mismas que las descritas en la primera fase de la alteración de muestras A.

Segunda fase del procedimiento/Lisis celular y unión de ADN de doble cadena sobre la superficie de matriz vehículo

- 20 1. Transferir la muestra tratada de acuerdo con las etapas 1-14 de la primera fase del procedimiento en un tubo de destrucción de 2 ml conteniendo 0,1 g de limaduras de vidrio y una bola de acero de CR-Va del tamaño de 4,5" (4,5 x 25,4 mm).
2. Situar el tubo de destrucción que contiene la muestra en un disruptor asimétrico homogeneizante (por ejemplo Fast-Prep™) y después comenzar la alteración cíclica. Después de 30 segundos la muestra puede hacerse pasar.
- 25 3. Añadir 1 ml de TAMPÓN DE LISIS (composición y pH de acuerdo con la tabla 2) a la muestra tratada mecánicamente. Mantener a temperatura ambiente durante 1-2 minutos.
4. Centrifugar la suspensión: 13.000 rpm, 5 min., 4 °C.
5. Transferir 800 µl del sobrenadante dentro de un tubo de centrifuga de 2,5 ml estéril limpio.
- 30 6. Añadir 800 µl de MATRIZ DE UNIÓN A ADN (composición y pH de acuerdo con la tabla 3). Cerrar el tubo de centrifuga.
7. Cuidadosamente rotar la suspensión 10-15 veces. En esta etapa no usar un mezclador de vórtice por medio alguno.
8. Incubarla durante 2 minutos a temperatura ambiente, rotar lentamente el tubo a intervalos amplios.
9. Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm, 1 minuto. Retirar el sobrenadante.
- 35 10. Suspender el precipitado en 700 µl de TAMPÓN DE LAVADO DE ELIMINACIÓN DE SALES (composición y pH de acuerdo con la tabla 4).
11. Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm, 1 minuto. Retirar el sobrenadante.
12. Suspender el precipitado en 500 µl de TAMPÓN DE LAVADO DE ELIMINACIÓN DE SALES (composición y pH de acuerdo con la tabla 4).
13. Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm, 30 segundos. Retirar el sobrenadante.
- 40 14. Eliminar el sobrenadante residual por encima del precipitado cuidadosamente, sin tocar o agitar la matriz.
15. Dejar secar la matriz: 2 min., 37 °C.
16. Añadir 100-120 ml de ELUYENTE (véase tabla 5) al precipitado de matriz seco. Suspender el precipitado.
17. Dejarlo permanecer a temperatura ambiente, 1 minuto.

18. Centrifugar: 12.000 rpm; 1 minuto.

19. Transferir el sobrenadante dentro de un tubo de centrifuga libre de ADNasas estéril limpio.

20. El ADN aislado está listo para aplicaciones corriente abajo.

Las características obligatorias de la segunda fase del procedimiento son las siguientes:

- 5 a) Soluciones y componentes se almacenan a +4...+8 °C, con la excepción de MATRIZ DE UNIÓN A ADN, que se mantiene a temperatura ambiente.
- b) Cuando se preparan soluciones madre relativas a procedimientos de PCR, deben seguirse estrictamente los protocolos de laboratorio estándar (norma EN ISO 20838:2006, GLP).

- 10 c) Trabajar en un ambiente estrictamente estéril (normas ISO 209, FS 209, BS5295, ISO 14644-1:1999), a un nivel de seguridad mínimo de BSL2 (Nivel de Bioseguridad 2).

Tercera fase del procedimiento/Control de calidad y cantidad

La concentración de ADN aislado se determina por la técnica de laboratorio convencional de espectrofotometría, a una longitud de onda de $\lambda = 260$ nm. La pureza del ADN aislado se caracteriza por la proporción de valores de densidad óptica medidos a longitudes de onda de $\lambda = 260$ nm y $\lambda = 280$ nm.

- 15 Las características obligatorias de la tercera fase del procedimiento son las siguientes:

a) Durante el procedimiento de espectrofotometría seguir estrictamente los protocolos de laboratorio estándar relativos a procedimientos de PCR (norma EN ISO 20838:2006, GLP).

b) Trabajar en un ambiente estrictamente estéril (normas ISO 209, FS 209, BS5295, ISO 14644-1:1999), a un nivel de seguridad mínimo de BSL2 (Nivel de Bioseguridad 2).

- 20 C/ Alteración de muestras con lisis enzimática

Reacción optimizada para instrumentos de laboratorio de biología molecular general. Primera fase del procedimiento/ Eliminación de células bacterianas no viables a partir de la muestra. Las etapas y características obligatorias del procedimiento son las mismas que las descritas en la primera fase de la alteración de muestras A.

Segunda fase del procedimiento/Lisis celular y unión de ADN de doble cadena sobre la superficie de matriz vehículo

- 25 1. Añadir enzima lisozima a la muestra tratada de acuerdo con las etapas 1-14 de la primera fase del procedimiento, a una concentración final de 100 mg/ml e incubarla durante 15 minutos a 37 °C. Después se hace pasar la muestra.

2. Añadir 1 ml de TAMPÓN de lisis a la muestra tratada enzimáticamente (composición y pH de acuerdo con la tabla 2). Mantener a temperatura ambiente durante 1-2 minutos.

3. Centrifugar la suspensión: 13.000 rpm, 5 min., 4 °C.

- 30 4. Transferir 800 μ l del sobrenadante dentro de un tubo de centrifuga de 2,5 ml estéril limpio.

5. Añadir 800 μ l de MATRIZ DE UNIÓN A ADN (composición y pH de acuerdo con la tabla 3). Cerrar el tubo de centrifuga.

6. Cuidadosamente rotar la suspensión 10-15 veces. En esta etapa no usar un mezclador de vórtice por medio alguno.

7. Incubarla durante 2 minutos a temperatura ambiente, rotar lentamente el tubo a intervalos amplios.

- 35 8. Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm, 1 minuto. Retirar el sobrenadante.

9. Suspender el precipitado en 700 μ l de TAMPÓN DE LAVADO DE ELIMINACIÓN DE SALES (composición y pH de acuerdo con la tabla 4).

10. Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm, 1 minuto. Retirar el sobrenadante.

- 40 11. Suspender el precipitado en 500 μ l de TAMPÓN DE LAVADO DE ELIMINACIÓN DE SALES (composición y pH de acuerdo con la tabla 4).

12. Centrifugar la suspensión: 12.000 rpm, 30 segundos. Retirar el sobrenadante.

13. Eliminar el sobrenadante residual por encima del precipitado cuidadosamente, sin tocar o agitar la matriz.

14. Permitir secar la matriz: 2 min., 37 °C.

15. Añadir 100-120 μ l de ELUYENTE (véase tabla 5) al precipitado de matriz seco. Suspender el precipitado.
16. Dejarlo permanecer a temperatura ambiente, 1 minuto.
17. Centrifugar: 12.000 rpm; 1 minuto.
18. Transferir el sobrenadante dentro de un tubo de centrífuga libre de ADNasas estéril limpio.

5 19. El ADN aislado está listo para aplicaciones corriente abajo.

Las características obligatorias de la segunda fase del procedimiento son las siguientes:

- a) Las soluciones y componentes se almacenan a +4...+8 °C, con la excepción de MATRIZ DE UNIÓN A ADN, que se mantiene a temperatura ambiente.
- 10 b) Cuando se preparan soluciones madre relativas a procedimientos de PCR deben seguirse estrictamente protocolos de laboratorio estándar (norma EN ISO 20838:2006, GLP).
- c) Trabajar en un ambiente estrictamente estéril (normas ISO 209, FS 209, BS5295, ISO 14644-1:1999), a un nivel de seguridad mínimo de BSL2 (Nivel de Bioseguridad 2).

Tercera fase del procedimiento/Control de calidad y cantidad

- 15 La concentración de ADN aislado se determina por la técnica de laboratorio convencional de espectrofotometría, a una longitud de onda de $\lambda = 260$ nm. La pureza del ADN aislado se caracteriza por la proporción de valores de densidad óptica medidos a longitudes de onda de $\lambda = 260$ nm y $\lambda = 280$ nm.

Las características obligatorias de la tercera fase del procedimiento son las siguientes:

Durante el procedimiento de espectrofotometría seguir estrictamente los protocolos de laboratorio estándar relativos a procedimientos de PCR (norma EN ISO 20838:2006, GLP).

- 20 Trabajar en un ambiente estrictamente estéril (normas ISO 209, FS 209, BS5295, ISO 14644-1:1999), a un nivel de seguridad mínimo de BSL2 (Nivel de Bioseguridad 2).

- 25 Para la realización de etapas del procedimiento descrito en los ejemplos de la realización el uso de los siguientes dispositivos es favorable. Cabina laminar de Tipo A2 de Clase II BSL2, mezclador de vórtice, centrífuga de laboratorio refrigerado y microcentrífuga refrigerada, 2 ml de incubador de tubo, quizás baño de agua. Opcionalmente se puede usar un disruptor mecánico que respalda la alteración automática (por ejemplo FastPrep™, TeenPrep™, BigPrep™, etc.).

- 30 Una de las ventajas técnicas de la invención de los autores de la invención está representada por parámetros tecnológicos de medida buenos. De acuerdo con esto, entre dos aislamientos independientes el valor de la varianza combinada (VC %) que caracteriza pureza es bajo, 7,5-8,5 % en el caso de 10^6 U.F.C./ml de colonia bacteriana. La especificidad del aislamiento es del 95 %, la fiabilidad de la reproducibilidad es del 85 %. El intervalo dinámico del procedimiento de aislamiento de ADN de cadena doble es 10^4 - 10^8 U.F.C./ml (muestra de 100 mg) de colonia bacteriana.

- 35 Otra ventaja técnica de nuestra intención es su sensibilidad: la demanda celular mínima de aislamiento de ADN que es el valor absoluto del límite inferior de la aplicabilidad de los procedimientos de los autores de la presente invención es 10^4 U.F.C./ml ± 15 %.

La tercera ventaja de la invención de los autores de la presente invención es su velocidad, que quiere decir que siguiendo la eliminación rápida de células no viables, el contenido de ADN total se puede aislar en el plazo de aproximadamente media hora.

- 40 Entre las ventajas económicas de la invención de los autores de la presente invención ante todo se menciona de nuevo la rapidez. Después de la eliminación rápida de las células no viables, el aislamiento de ADN que dura aproximadamente media hora proporciona un resultado rápido en aplicaciones aguas abajo de monitorización de higiene de salud pública. tal como en análisis de PCR, cuando, si es necesario, induce una intervención oportunamente en compañías que operan de acuerdo con un sistema de control de calidad (sistemas hidráulicos, plantas de procesamiento de comida). Como un resultado de esto, no se pierde ningún tiempo debido a la cortedad del tiempo requerido para temas de producto y pruebas de control, o para la retirada necesaria de un producto.
- 45

Los usuarios y áreas de aplicación de nuestro procedimiento para el aislamiento de contenido en ADN total de gérmenes bacterianos son agua potable, agua residual, laboratorios de pruebas bacteriológicas de salud pública y de sistemas hidráulicos, estaciones de pruebas de comida, laboratorios de pruebas de industria alimentaria, laboratorios bacteriológicos generales, laboratorios de higiene del lugar de trabajo e industrial y laboratorios de salud pública.

- 50 Una versión posible del ejemplo de construcción comercial del KIT para la realización práctica de procedimiento de

aislamiento de ADN de acuerdo con la invención se puede ver en la figura 5. En la figura se puede ver un sistema de aislamiento integral complejo para aislamientos de ADN microbiano. El KIT contiene las soluciones usadas en las etapas procedimentales que siguen a la retirada de células no viables (tampón de lisis, matriz de unión, tampón de lavado de eliminación de sales, eluyente), así como los tubos de destrucción descritos en el ejemplo de uso.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento específico de contenido en ADN total de gérmenes bacterianos de muestras, en el curso del cual se lisan las células, el contenido en ADN del lisado se une selectivamente, se lava y después el ácido nucleico de polímeros lineales desalinizados se eluye a partir de la superficie de unión en una solución acuosa,
5 **caracterizado porque** de forma preliminar las células bacterianas no viables se separan de las células viables en base a sus características físicoquímicas de superficie celular diferentes como resultado de lo cual exclusivamente el ADN de cadena doble que deriva del lisado de células viables está unido sobre una $-\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ -matriz que contiene grupos $-\text{OH}$ y dodecilamina químicamente activados.
2. Procedimiento como en la reivindicación 1, **caracterizado porque** las células bacterianas no viables son separadas de las células viables en base a su permeabilidad y afinidad iónica de superficie celular diferentes, usando una
10 solución de lavado que penetra diferencialmente que contiene detergente, electrolito, favorablemente una mezcla tamponada de Tritón X-100, ácido etilendiaminatetraacético, KCl o NaCl, ácido cítrico-1-hidrato y se cambia la fuerza de campo de centrifugación que influye en la sedimentación de células.
3. Procedimiento como en la reivindicación 2, **caracterizado porque** la lisis de las células bacterianas viables es
15 llevada a cabo con alteración mecánica respaldada con el uso de dispositivos de mesa o alteración mecánica y enzimática combinadas, favorablemente digestión de lisozima, en tubos de destrucción preparados individualmente.
4. Procedimiento como en la reivindicación 3, **caracterizado porque** el contenido de ADN de doble cadena de al menos muestra bacteriana de 10^4 U.F.C./ml es aislado con un tampón de lisis que contiene un componente redox,
20 agente quelante y detergentes, favorablemente ditioneitol (DTT), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), Tritón X-100 y dodecilsulfato sódico (SDS) y que agentes colorantes posibles que derivan de las células bacterianas viables e inhibidores de PCR (porfirinas, compuestos de hemo, materiales poliaromáticos) se separan durante la sedimentación del lisado bacteriano y la unión selectiva libre de degradación de los ADN de cadena doble que derivan del lisado de células bacterianas viables se lleva a cabo en una $-\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ -matriz, que contiene grupos $-\text{OH}$ y dodecilamina
25 activados y se ha reticulado preliminarmente con engarces de dodecilamina y en el que vínculos secundarios no específicos de matriz, prácticamente los vínculos a ARN, proteínas y otras macromoléculas, son bloqueados añadiendo trehalosa o dextrano y BSA.
5. Procedimiento como en la reivindicación 4, **caracterizado porque** la cantidad y pureza del ADN de cadena doble aislado se comprueba con un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 260 nm y la cantidad y pureza del ADN
30 de cadena doble aislado se comprueba también con un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 280 nm y se comparan los valores de extinción de D.O._{260} y D.O._{280} .
6. Uso de un KIT adecuado para aislar contenido de ADN total de gérmenes bacterianos, para la realización de la reivindicación 1, **caracterizado porque** ello contiene una $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ -matriz que contiene grupos $-\text{OH}$ y dodecilamina químicamente activados para analizar agua, comida, superficies comunales diferentes y muestras de salud pública.

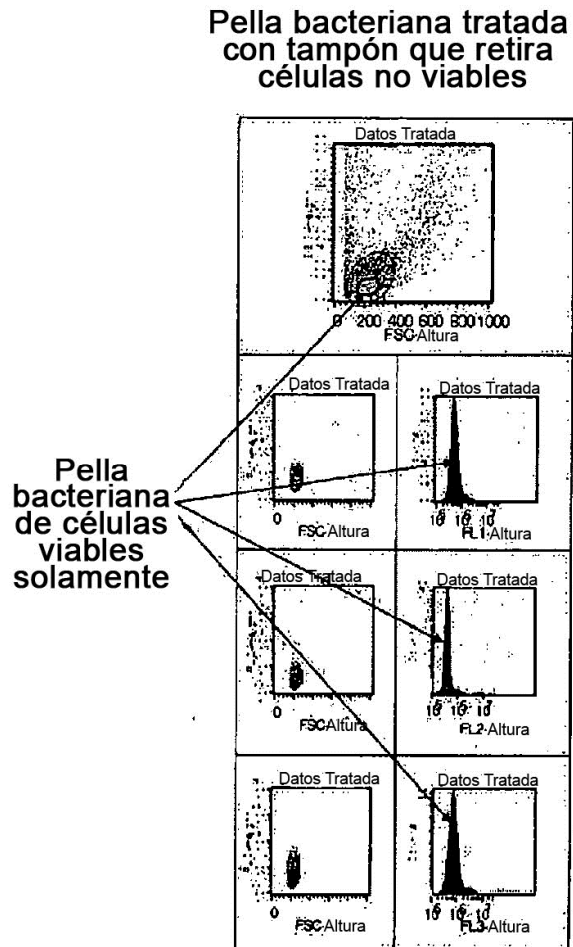


Figura 1a.

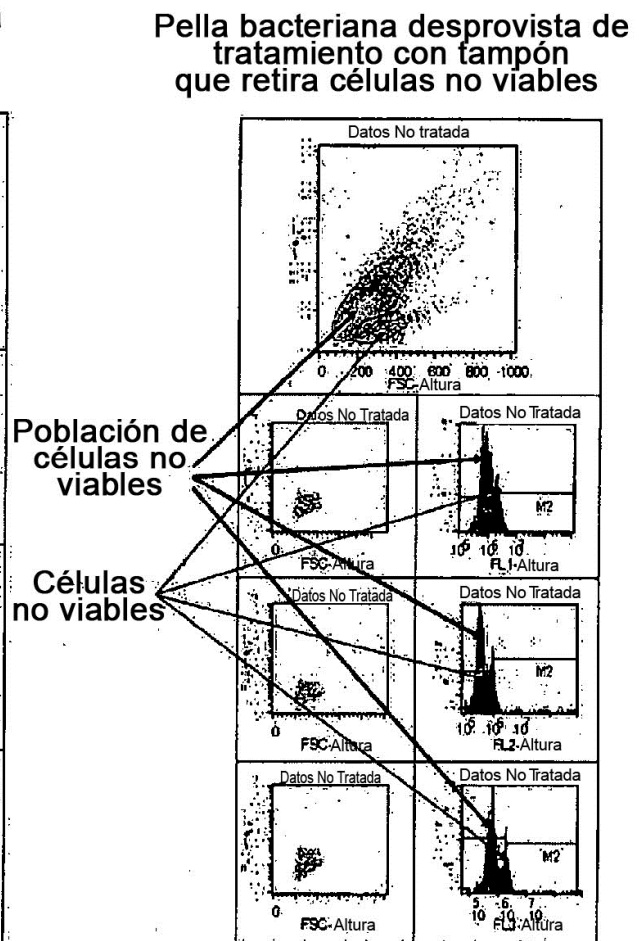


Figura 1b.

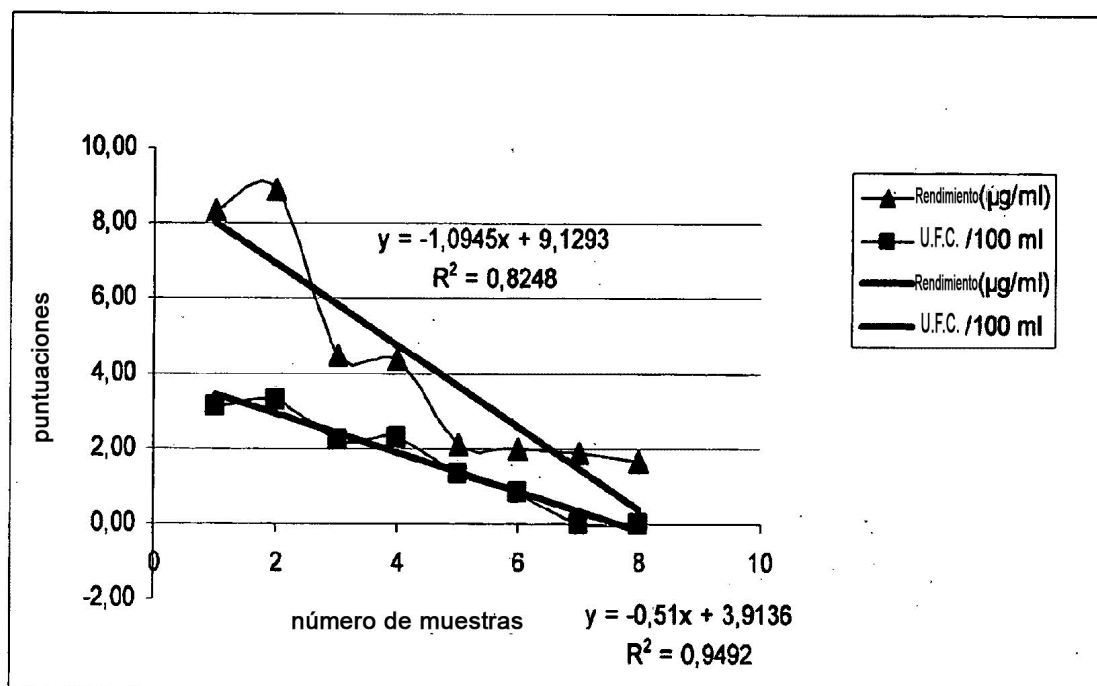


Figura 2

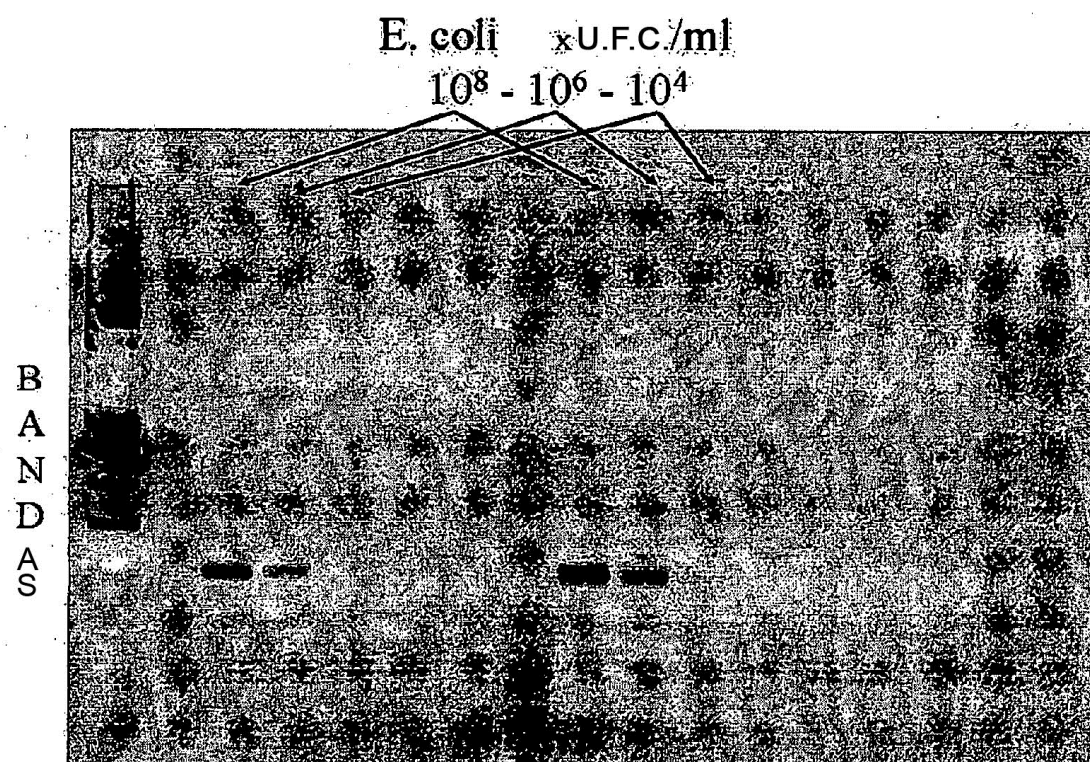


Figura 3

Tabla 1

TAMPÓN QUE RETIRA CÉLULAS NO VIABLES			
Componente	Límite inferior	Límite superior	Unidad
Tris-HCl	95	120	mM
pH	6,5	8,0	-
Tritón X-100	0,05	0,15	m/m %
EDTA	10	20	mM
KCl o NaCl	10	50	mM
ácido cítrico-1-hidrato	2	10	mM

Tabla 2

TAMPÓN DE LISIS			
Componente	Límite inferior	Límite superior	Unidad
DTT	1	4	mM
Tris-HCl	95	120	mM
pH	6,5	8,0	-
SDS	0,3	0,6	m/m %
EDTA	1	4	mM
Tritón X-100	0,3	0,6	v/v %
NaCl	40	60	mM

Figura 4

Tabla 3

MATRIZ DE UNIÓN A ADN			
Componente	Límite inferior	Límite superior	Unidad
-SiO ₂ -TiO ₂ -OH (-HCl) C12-H ₂₅ -O-NH	6	14	g
Tris-HCl	95	120	mM
pH	5,0	6,0	-
EDTA	15	25	mM
dextrosa o trehalosa	1	5	m/m %
BSA	0,01	0,01	m/m %
NaCl	5,5	6,5	M

Tabla 4

TAMPÓN DE LAVADO DE ELIMINACIÓN DE SALES			
Componente	Límite inferior	Límite superior	Unidad
Tris-HCl	95	120	mM
pH	6,5	8,0	-
EDTA	15	25	mM
NaCl	5,5	6,5	M

5 Tabla 5

ELUYENTE			
Componente	Límite inferior	Límite superior	Unidad
Agua de calidad de PCR	-	-	ml

Figura 5

Componentes de kit para 42 reacciones (kit DIAEXTRAC)

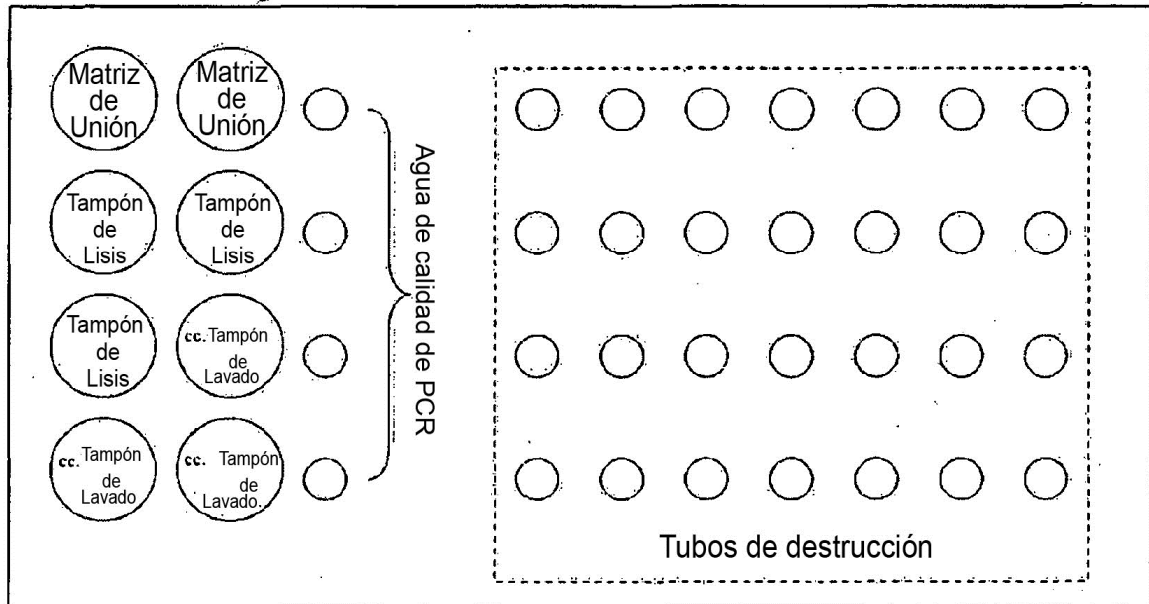


Figura 6