



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 553**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01958181 .8**

96 Fecha de presentación : **26.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1305398**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2003**

54 Título: **Procedimiento de lisis celular de procariotas o de eucariotas o de lisis celular simultánea de procariotas o de eucariotas.**

30 Prioridad: **27.07.2000 FR 00 09820**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.11.2011**

73 Titular/es: **BIOMERIEUX S.A.**  
**chemin de l'Orme**  
**69280 Marcy l'Etoile, FR**

72 Inventor/es: **Cleuziat, Philippe;**  
**Incardona, Sandra y**  
**Jay, Corinne**

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

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 de lisis celular de procariotas o de eucariotas o de lisis celular simultánea de procariotas o de eucariotas

El presente invento se refiere a unos procedimientos de lisis universal adaptados a la lisis simultánea de procariotas, para el vórtice mecánico.

El vórtice mecánico ya ha sido descrito en una solicitud de patente anterior de la parte solicitante. Se trata de la solicitud WO-A-99/15621 que trata de un procedimiento para lisar una muestra biológica que comprende al menos un microorganismo bien de tipo bacteria, o de tipo levadura. Los procedimientos de lisis difieren en el diámetro de las bolas, que está comprendido entre 90 y 150  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 100  $\mu\text{m}$ , para las bacterias, y que es de 500  $\mu\text{m}$  para las levaduras. Hay que tener en cuenta que en esta solicitud de patente se han utilizado mezclas de bolas de zirconio de 100  $\mu\text{m}$  y de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una relación del 50% para cada tipo de bolas (véanse las figuras 1 y 2 del protocolo G) con el fin de lisar las bacterias de *Staphylococcus epidermidis*.

Los resultados obtenidos con las relaciones de bolas de diferentes diámetros, sin ser malos, son inferiores a:

- los obtenidos con bolas de vidrio de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro (protocolo D), o
- los obtenidos con bolas de zirconio de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro (protocolo E).

No obstante, la parte solicitante ha continuado sus trabajos en este campo de la técnica y ha puesto de manifiesto protocolos de lisis independiente de la clase de microorganismos ya se trate de procariotas (bacterias) o de eucariotas (levaduras) o de una mezcla de eucariotas y de procariotas. Estos protocolos, denominados universales, permiten una eficacia tan importante como la de las lisis asociadas únicamente a las bacterias o únicamente a las levaduras, tales como han sido desarrolladas en el estado de la técnica anteriormente expuesto. De manera sorprendente y en ciertos casos, se comprueba que estos protocolos universales son a menudo más eficaces que las lisis del estado de la técnica.

A tal fin, el presente invento se refiere a un procedimiento de lisis celular de procariotas o de eucariotas o de lisis celular simultánea de procariotas y de eucariotas, por vórtice mecánico, que consiste en adaptar al menos tres de los parámetros siguientes:

- un porcentaje en masa de bolas activas de pequeño diámetro con respecto a la masa de las bolas activas de gran diámetro inferior o igual al 50%, y/o
- una masa total de bolas lisantes, que comprende una mezcla o sin bolas de pequeño diámetro y/o de bolas de gran diámetro, comprendido entre el 50 y el 100% con respecto a la masa total de la muestra biológica tratada, y/o
- una duración de la lisis comprendida entre 10 y 20 min, y/o
- un número de bolas de vidrio no lisantes pero de arrastre de las bolas lisantes inferior a siete (7), y/o
- un número de bolas de hierro no lisantes pero de arrastre de las bolas lisantes comprendido entre cinco (5) y quince (15).

Según una variante preferible de realización, las bolas lisantes son de vidrio.

Las bolas lisantes de pequeño diámetro tienen un diámetro comprendido entre 90 y 150  $\mu\text{m}$  y preferiblemente de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , y las bolas lisantes de gran diámetro tienen un diámetro comprendido entre 400 y 600  $\mu\text{m}$  y de forma preferida de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ .

Más particularmente, el procedimiento consiste en efectuar una lisis por vórtice mecánico según los parámetros siguientes:

- una duración de la lisis de 11 a 20 min, preferiblemente de 15 a 20 min, e incluso más preferiblemente de 20 min,
- un porcentaje de bolas de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro inferior al 50%, preferiblemente inferior al 30%, e incluso más preferiblemente del 20%,
- una masa total de bolas lisantes superior al 60%, preferiblemente superior al 80%, %, e incluso más preferiblemente del 100% de la masa total de la muestra biológica, y
- un número de bolas de vidrio inferior a siete (7), preferiblemente igual a uno (1).

Las figuras que se adjuntan son dadas a título de ejemplo explicativo y no tienen carácter limitativo alguno. Ellas permitirán comprender mejor el invento.

La Figura 1 representa un ejemplo de curvas de isorrespuestas en el marco de un enfoque MRE.

La Figura 2 represente curvas de isorrespuestas en el marco de la lisis por vórtice mecánico de levaduras.

Finalmente, la Figura 3 representa curvas de isorrespuestas en el marco de la lisis por vórtice mecánico de bacterias.

## I. Material y métodos

Como se ha expuesto anteriormente, en el estado de la técnica se conocen tres protocolos. Se trata de la sonicación del vórtice mecánico y del vórtice magnético. Cada uno de ellos ha sido definido para las bacterias y para las levaduras de forma independiente. Los parámetros así definidos, que se presentan en el cuadro 1, están en relación con parámetros considerados correctos del estado de la técnica. Hay que tener en cuenta que el volumen de las muestras biológicas tratadas, independientemente de los protocolos de referencia o de los protocolos según el presente invento, es de 600 µl.

| Protocolo                                   | Sonicación |           | Vórtice mecánico |           | Vórtice magnético |           |
|---------------------------------------------|------------|-----------|------------------|-----------|-------------------|-----------|
| Factores                                    | Bacterias  | Levaduras | Bacterias        | Levaduras | Bacterias         | Levaduras |
| Diámetros (µm) y cantidad de bolas activas  | 100 y 0,4  | 500 y 0,3 | 100 y 0,6        | 500 y 0,5 | 100 y 0,6         | 500 y 0,5 |
| Número de bolas de vidrio (3mm de diámetro) | -          | -         | 6                |           | -                 | -         |
| Número de bolas de hierro (2mm de diámetro) | -          | -         | 10               |           | 10                |           |
| Duración de la lisis                        | 15 min     |           | 2 min            | 12 min    | 10 min            | 12 min    |

**Cuadro 1:** Protocolos de la lisis según el estado de la técnica, llamados protocolos de referencia

Las bolas activas denominadas "lisantes" están constituidas por bolas que permiten la lisis de los microorganismos. Se trata de bolas de pequeños diámetros (100 o 500 µm). Conviene advertir que las bolas de vidrio de 100 µm de diámetro han sido obtenidas de Masteau et Lamarié, Paris, Francia, con la referencia Via 1, y que las bolas de vidrio de 500 µm de diámetro proceden de la sociedad Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, con la referencia 8772.

Por el contrario, las otras bolas de vidrio (3 mm de diámetro) y de hierro (2 mm de diámetro), utilizadas para los vórtices mecánico y magnético, tiene como objeto poner en movimiento las bolas activas después de una agitación. Se denominan bolas pasivas o indirectamente activas, mediante las bolas lisantes anteriormente definidas. Las bolas de vidrio de 3 mm de diámetro han sido compradas a Prolabo (Fontenay-sous-Bois), Francia) con la referencia 00680032, y es Bennk Elektronik (Norderstadt, Alemania) la que ha suministrado las bolas de hierro de 2 mm de diámetro, con la referencia 050-330.

Hay que tener en cuenta que es posible utilizar bolas de hierro recubiertas con un material biológicamente inerte, tal como plástico o vidrio, con objeto de aislar el hierro e impedir su precipitación por medio de sales, que es a menudo incompatible con las operaciones de amplificación posteriores de los ácidos nucleicos liberados por la lisis.

Los resultados obtenidos con los procedimientos según el invento se compararán a continuación con los resultados obtenidos por medio de los procedimientos de referencia antes descritos.

El objeto de un protocolo universal de lisis es permitir la detección, después de la lisis, de microorganismos responsables de infecciones de fluidos biológicos estériles (líquido ceforraquídeo, orina y sangre) sin saber a priori si se trata de microorganismos procariotas (bacterias) o eucariotas (levaduras).

### A) Metodología de la investigación experimental

Un enfoque para la Metodología de la Investigación Experimental (MRE) ha sido utilizado para el vórtice mecánico.

El estudio MRE consta de dos etapas. En una primera, y para diferentes factores, se han definido una zona óptima propia de las levaduras y una zona óptima propia de las bacterias. Esta zona óptima se define como la que proporciona una eficacia de lisis equivalente o superior a la obtenida con el protocolo de referencia.

En una segunda etapa, y si es posible, se define una zona denominada de compromiso, que corresponde a la intersección de la zona óptima de bacterias con la zona óptima de levaduras.

El MRE es un estudio matemático que consiste en establecer un modelo de un fenómeno biológico, en caso de producirse la lisis, mediante una ecuación matemática (a menudo una ecuación matemática polinómica de segundo grado) del tipo:

$$R = aX + bY + cX^2 + dY^2 + eXY + F,$$

en donde

- R es la respuesta experimental que representa la eficacia de la lisis,
- X e Y son factores que influyen en la lisis tales como la duración de la misma como el tamaño de las bolas, y
- a, b, c, d, e y f son coeficientes.

Esta ecuación puede representarse en forma de curvas denominadas isorrespuestas que permiten ver cómo varía la respuesta en función de los valores tomados por los diferentes factores. La Figura 1 ofrece un ejemplo de curvas de isorrespuestas.

Según esta Figura 1 se estudian dos factores. Se trata del peso total (X1) de las bolas lisantes de 100 y de 500 µm de diámetro y el porcentaje en masa de bolas de 100 de diámetro con respecto al total de las bolas lisantes de 100 y de 500 µm de diámetro (X2); la respuesta estudiada corresponde a un número de unidades de fluorescencia RLU, es decir Relative Light Unit. Las representadas unen los puntos del campo experimental que dan una respuesta idéntica. Se ve en este gráfico que la respuesta máxima obtenida en el campo experimental es de 900.000 unidades de fluorescencia, y para obtener esta respuesta es preciso que X1 esté comprendida entre 0,2 y 0,4, y que X2 esté próxima a 20.

La obtención del modelo matemático necesita la realización de varias experiencias definidas por matrices denominadas "matrices compuestas", bien descritas en los siguientes documentos:

- Box and Wilson (1951) "On the experimental attainment of optimal conditions" Journal of the Royal Statistical Society; B, 13, p. 1-45.
- Feneuille; Mathieu; Phan-Tan-Lun (1978) "Metodología de la Investigación Experimental, Introducción, instrumentos matemáticos, estudios de las superficies de respuesta, matrices de mezclas; métodos simplex; Universidad de Aix-Marsella – Publicación del LMRE.

#### B) Respuesta estudiada

La eficacia de la lisis se cuantifica midiendo la cantidad de ARN 16S y 23S (para las bacterias) y de ARN ribosómico para las levaduras) liberada por hibridación con una sonda quimioluminiscente. Se trata de una medida HPA (Hybridization Protection Assay). Se trata de una técnica de la sociedad Gen-Probe ya descrita en el artículo de Norman C. Nelson, Mark A. Reynolds y Lyle J. Arnold Jr: "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence", Nonisotropic probing, Blotting and Sequencing (1995) 391-428. Informaciones sobre esta técnica pueden también encontrarse en la patente US-A-6.004.745.

Se han utilizado dos sondas, una desarrollada por Gen Probe y comercializada con el nombre de Mycoplasma Tissue Culture NI (MTC-NI), véanse sus publicaciones: 104574 Reivindicación A. Como se ha precisado en la página 3 en el capítulo "Performance Characteristics" esta sonda puede detectar una gran variedad de microorganismos en Gram negativo y en Gram positivo, sin no obstante solaparse con blancos de eucariotas.

Se ha utilizado una segunda sonda para las levaduras. De este modo es posible utilizar una sonda tal como las descritas por:

- J. F. Hindler, S. Kozen, D. A. Bruckner en su artículo: "Application of an rRNA Probe matrix for Rapid Identification of Bacteria and Fungi in Routine Blood Cultures" N° 1557, y
- D. D. Fuller, T. E. Davis en el artículo: "Comparison of RNA Probe Matrix to Conventional Methods for Rapid Identification of Clinically Significant Bacteria and Fungi Recovered from Blood Cultures Specimens" N° 1558, de la sesión 154.D, página 221, Laboratory Tests for Diagnosing Infections; Methods for susceptibility testing.
- Abstracts book, ICAAC – Sept. 26-29, 1999 – San Francisco – USA – Dos cuadros muestran la utilización de una sonda universal que permite la detección del conjunto de las especies de champiñones (mohos y levaduras).

#### C) Factores estudiados

Los factores que se pueden estudiar son:

- el peso total de las bolas activas (en g)
- el porcentaje en masa de las bolas lisantes de 100 µm,
- la duración de la lisis (en min),
- el número de bolas de vidrio de 3 mm adicionales, y
- el número de bolas de hierro de 2 mm adicionales.

D) Cepas de levadura y de bacteria utilizadas:

La cepa de levadura escogida para el estudio es la *Candida krusei* que tiene como número de colección bioMérieux: API nº 9604191. La cepa de bacteria es la *Mycobacterium fortuitum* registrada en el ATCC con el número 49403.

La lisis se realiza en 600 µl de una suspensión a 0,5 Mac Farland (densitómetro bioMérieux).

**II. Resultados preliminares según los procedimientos de referencia:**

A) Resultados que demuestran que las bolas de 100 µm son más eficaces que las bolas de 500 µm para lisar las bacterias:

El cuadro 2 que viene a continuación muestra los resultados obtenidos, en el que todas las unidades están en HPA como en los cuadros que siguen, numerados de 3 a 10.

| Vórtice mecánico | Bolas activas con un diámetro de 100 µm |         | Bolas activas con un diámetro de 500 µm |        |
|------------------|-----------------------------------------|---------|-----------------------------------------|--------|
|                  | Valores brutos                          | Media   | Valores brutos                          | Media  |
|                  | 105.263<br>96.142<br>97.875<br>102.771  | 100.513 | 39.624<br>41.879<br>50.584<br>43.697    | 43.946 |

Cuadro 2: Estudio comparativo entre las bolas de 100 µm y las bolas de 500 µm para la técnica de lisis de las bacterias por vórtice mecánico.

Se ve fácilmente que las bolas de 100 µm son más eficaces que las bolas de 500 µm.

B) Resultados comparativos de la calidad de funcionamiento de las bolas de 500 y las de 100 µm para lisar las levaduras:

El Cuadro 3 que viene a continuación muestra los resultados obtenidos.

| Vórtice mecánico | Bolas activas con un diámetro de 100 µm                       |           | Bolas activas con un diámetro de 500 µm                       |           |
|------------------|---------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------|-----------|
|                  | Valores brutos                                                | Media     | Valores brutos                                                | Media     |
|                  | 1.392.101<br>1.511.603<br>1.493.588<br>1.128.468<br>1.061.514 | 1.317.454 | 2.464.220<br>2.598.929<br>2.234.830<br>2.695.394<br>2.833.394 | 2.565.353 |

Cuadro 3: Estudio comparativo entre las bolas de 100 µm y las bolas de 500 µm para la técnica de la lisis de levaduras por vórtice mecánico.

Las bolas de 500 µm son más eficaces que las bolas de 100 µm para lisar las levaduras. Un protocolo universal requiere una mezcla de bolas de 100 y de 500 µm.

**III. Resultados de la lisis por vórtice mecánico según el presente invento:**

Se utilizan cuatro parámetros, se trata del porcentaje de bolas de 100 µm de diámetro de la masa total de bolas lisantes de 100 y de 500 µm del número de bolas de vidrio de 3 mm adicionales y de la duración de la lisis (en minutos).

A) Vórtice mecánico y levaduras:

El protocolo de referencia utiliza una masa total de bolas lisantes de 0,3 g, un porcentaje del 0% de bolas de 100 µm de diámetro, 6 bolas de vidrio y 10 bolas de hierro, así como un espacio de tiempo de lisis de 12 minutos. Los valores HPA obtenidos son de 1.944.115, 2.213.485 y 2.158.958, o sea una media de 2.105.519.

El cuadro 4 expone los resultados obtenidos.

| Porcentaje de bolas    |                           |                      | 20%                                 |           | 50%                                 |                  | 80%                                 |           |
|------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------|
| Masa de bolas lisantes | Número de bolas de vidrio | Duración de la lisis | Valores brutos                      | Media     | Valores brutos                      | Media            | Valores brutos                      | Media     |
| 0,1 g                  | 1                         | 2 min                | 173.382<br>198.469<br>191.565       | 187.805   |                                     | NT = no ensayado | 53.771<br>55.591<br>51.464          | 53.609    |
|                        | 13                        | 2 min                | 383.782<br>875.488<br>647.615       | 636.628   |                                     | NT               | 566.150<br>631.271<br>479.612       | 559.011   |
|                        | 1                         | 20 min               | 1.499.619<br>696.373<br>262.854     | 819.615   |                                     | NT               | 569.050<br>590.737<br>679.410       | 613.066   |
|                        | 13                        | 20 min               | 1.009.588<br>1.472.753<br>1.101.463 | 1.194.601 |                                     | NT               | 852.141<br>1.041.371<br>1.217.872   | 1.037.128 |
|                        | 7                         | 11 min               |                                     |           | 731.593<br>643.160<br>718.173       | 664.309          |                                     | NT        |
| 0,35 g                 | 7                         | 11 min               | 1.722.021<br>1.817.222<br>1.878.805 | 1.822.683 |                                     | NT               | 1.342.768<br>1.740.035<br>1.391.889 | 1.491.564 |
|                        | 1                         | 11 min               |                                     | NT        | 896.736<br>1.329.122<br>975.083     | 1.066.980        |                                     | NT        |
|                        | 13                        | 11 min               |                                     | NT        | 1.429.173<br>1.439.611<br>1.588.337 | 1.485.707        |                                     | NT        |
|                        | 7                         | 2 min                |                                     | NT        | 323.207<br>271.399<br>388.199       | 327.602          |                                     | NT        |
|                        | 7                         | 20 min               |                                     | NT        | 2.655.347<br>2.620.069<br>2.321.318 | 2.532.245        |                                     | NT        |
|                        | 7                         | 11 min               |                                     | NT        | 1.519.280<br>1.503.048<br>1.375.956 | 1.466.095        |                                     | NT        |
| 0,6 g                  | 1                         | 2 min                | 509.952<br>278.641<br>349.239       | 379.277   |                                     | NT               | 60.273<br>105.730<br>76.940         | 80.981    |
|                        | 13                        | 2 min                | 1.070.276<br>794.021<br>725.931     | 863.409   |                                     | NT               | 234.974<br>467.140<br>260.342       | 320.819   |
|                        | 1                         | 20 min               | 2.856.141<br>3.176.777<br>2.825.049 | 2.952.656 |                                     | NT               | 1.767.239<br>1.412.744<br>1.682.354 | 1.620.779 |
|                        | 13                        | 20 min               | 1.826.409<br>2.156.630<br>2.017.243 | 2.000.094 |                                     | NT               | 1.500.483<br>816.002<br>372.200     | 896.418   |
|                        | 7                         | 11 min               |                                     | NT        | 2.257.042<br>1.868.266<br>2.104.986 | 2.076.765        |                                     | NT        |

**Cuadro 4:** Estudio comparativo entre la técnica de referencia y las técnicas que pueden responder a los criterios del presente invento para la lisis por vórtice mecánico de las levaduras

5

La Figura 2 muestra las curvas de isorrespuestas así obtenidas. El análisis de las curvas muestra que el factor que más influye en la respuesta es la duración. Con objeto de maximizar la lisis se precisa una duración de lisis de 20 min, un porcentaje de bolas de 100 µm con un diámetro inferior al 50% de una masa total de bolas lisantes superior a 0,35 g y un número de bolas de vidrio inferior a siete (7).

Un ejemplo de curvas de isorrespuestas está dado para un peso total de 0,5 g y un porcentaje de bolas de 100 µm de diámetro del 20%.

- 5 Se demuestra que para aumentar la respuesta se requiere una duración de lisis superior a 11 min, un porcentaje de bolas de 100 µm de diámetro inferior al 50%, una masa total de bolas lisantes superior a 0,35 g y un número de bolas de vidrio inferior a 7.

B) Vórtice mecánico y bacterias:

- 10 El protocolo de referencia utiliza una masa total de bolas lisantes de 0,6 g, un porcentaje del 100% de bolas de 100 µm de diámetro, 6 bolas de vidrio y 10 bolas de hierro, y con un espacio de tiempo de lisis de 2 minutos. Los valores HPA obtenidos son de 107.406, 124.609 y 138.405, o sea una media de 123.473.

- 15 El cuadro 5 expone los resultados obtenidos.

| Porcentaje de bolas    |                           |                      | 20%                           |         | 50%                           |         | 80%                           |         |
|------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------|
| Masa de bolas lisantes | Número de bolas de vidrio | Duración de la lisis | Valores brutos                | Media   | Valores brutos                | Media   | Valores brutos                | Media   |
| 0,1 g                  | 1                         | 2 min                | 52.553<br>74.120<br>70.675    | 65.783  |                               | NT      | 63.184<br>58.656<br>58.185    | 60.008  |
|                        | 13                        | 2 min                | 14.521<br>119.746<br>39.993   | 58.087  |                               | NT      | 41.586<br>54.066<br>40.387    | 45.346  |
|                        | 1                         | 20 min               | 342.532<br>192.353<br>422.974 | 319.286 |                               | NT      | 143.231<br>141.178<br>141.240 | 141.883 |
|                        | 13                        | 20 min               | 180.946<br>152.548            | 166.747 |                               | NT      | 62.916<br>33.591<br>89.886    | 62.131  |
|                        | 7                         | 11 min               | NT                            | NT      | 95.433<br>89.768<br>81.290    | 88.830  |                               | NT      |
| 0,35 g                 | 7                         | 11 min               | 96.363<br>82.168<br>138.530   | 105.687 |                               | NT      | 164.967<br>133.405<br>146.659 | 148.344 |
|                        | 1                         | 11 min               |                               | NT      | 182.124<br>134.177<br>97.015  | 137.772 |                               | NT      |
|                        | 13                        | 11 min               |                               | NT      | 79.136<br>58.570<br>71.041    | 69.582  |                               | NT      |
|                        | 7                         | 2 min                |                               | NT      | 68.180<br>55.805<br>42.366    | 55.450  |                               | NT      |
|                        | 7                         | 20 min               |                               | NT      | 326.925<br>229.725<br>142.933 | 233.194 |                               | NT      |
|                        | 7                         | 11 min               |                               | NT      | 103.348<br>90.163<br>96.770   | 96.760  |                               | NT      |
| 0,6 g                  | 1                         | 2 min                | 54.466<br>49.842              | 52.154  |                               | NT      | 108.236<br>82.578<br>130.014  | 106.943 |
|                        | 13                        | 2 min                | 80.796<br>63.431              | 72.113  |                               | NT      | 102.979<br>162.136<br>104.830 | 123.315 |

|  |    |        |                               |         |                               |         |                               |         |
|--|----|--------|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------|
|  | 1  | 20 min | 275.653<br>153.372<br>249.164 | 226.063 |                               | NT      | 255.286<br>265.434<br>223.440 | 248.053 |
|  | 13 | 20 min | 189.947<br>107.754<br>112.081 | 136.594 |                               | NT      | 176.619<br>183.820<br>185.692 | 182.044 |
|  | 7  | 11 min |                               | NT      | 131.318<br>121.488<br>153.508 | 135.438 |                               | NT      |

Cuadro 5: Estudio comparativo entre la técnica de referencia y las técnicas que pueden responder a los criterios del presente invento para la lisis por vórtice mecánico de las bacterias.

La Figura 3 muestra las curvas de isorrespuestas así obtenidas. El análisis de las curvas muestra que el factor más activo de la lisis es la duración. Para aumentar la respuesta se requiere una duración máxima de lisis de 20 min y un pequeño número de bolas de vidrio. Además, la respuesta es un poco mejor con un porcentaje de bolas de 100 µm de pequeño diámetro, próximo al 20% y una masa total de bolas lisantes próxima a 0,6 g, teniendo estos dos factores muy poca influencia.

Un ejemplo de curvas está dado por una masa total de bolas lisantes fijada en 0,6 g y un porcentaje de bolas de 100 µm con un diámetro fijado en el 20%. Éste es el caso de la Figura 5.

Las curvas muestran que la duración de lisis tiene un efecto importante en la respuesta, estando la respuesta máxima obtenida para una duración de 20 min. El número de bolas de vidrio tiene menos efecto sobre la lisis, siendo suficiente una sola bola.

#### C) Elección de un protocolo universal de lisis por vórtice mecánico:

El protocolo universal está por tanto definido por los siguientes parámetros:

- duración de lisis de 20 min,
- porcentaje de bolas de 100 µm de diámetro = 20%,
- masa total de bolas lisantes = 0,5 g, y
- número de bolas de vidrio igual a uno (1), con un diámetro de sensiblemente 3 mm.

En estas condiciones se obtienen los siguientes resultados:

- la media obtenida para las bacterias es de 226.063, en tanto que es de 123.473 para el protocolo de referencia que utiliza el 100% de bolas de 100 µm,
- la media obtenida para las levaduras es de 2.952.656 en tanto que es de 2.105.519 para el protocolo de referencia que utiliza el 100% de bolas de 500 µm.

El procedimiento asociado a este protocolo de lisis universal consiste por tanto en efectuar un vórtice mecánico según los siguientes parámetros:

- una duración de lisis de 11 a 20 min, preferiblemente de 15 a 20 min e incluso más preferiblemente de 20 min,
- un porcentaje de bolas de 100 µm de diámetro inferior al 50%, preferiblemente inferior al 30%, e incluso más preferiblemente del 20%,
- una masa total de bolas lisantes superior al 60%, preferiblemente superior al 80%, e incluso más preferiblemente del 100% de la masa total de la muestra biológica tratada, y
- un número de bolas de vidrio inferior a siete (7), preferiblemente igual a una (1).

#### IV. Conclusión

Se ha demostrado que para la técnica de vórtice mecánico es posible definir un protocolo universal, es decir capaz de lisar células procariotas y/o eucariotas con una eficacia idéntica y a menudo superior a la obtenida con los protocolos denominados de referencia.

# REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de lisis celular de microorganismos procariotas o eucariotas de lisis celular simultánea de microorganismos procariotas y eucariotas, que consiste en efectuar un vórtice mecánico adoptando los siguientes parámetros:
  - un porcentaje en masa de bolas lisantes de pequeño diámetro con respecto a las bolas lisantes de gran diámetro inferior o igual al 50%,
  - una masa total de bolas lisantes, que comprende una mezcla de bolas de pequeño diámetro y de bolas de gran diámetro, comprendida entre el 50% y el 100% con respecto a la masa total de la muestra biológica tratada,
  - una duración de lisis comprendida entre 10 y 20 min, y
  - un número de bolas de arrastre, de vidrio, inferior a siete (7), y
  - un número de bolas de arrastre de las bolas lisantes, de vidrio, inferior a siete (7), en el que las bolas lisantes de pequeño diámetro tienen un diámetro comprendido entre 90 y 150  $\mu\text{m}$ , y preferiblemente cercano a 100  $\mu\text{m}$ , y estando las bolas lisantes de gran diámetro comprendidas entre 400 y 600  $\mu\text{m}$ , y preferiblemente cercano a 500  $\mu\text{m}$ .
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque las bolas lisantes son de vidrio.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque consiste en efectuar un vórtice mecánico según los siguientes parámetros:
  - una duración de lisis de 11 a 20 min, preferiblemente de 15 a 20 min, e incluso más preferiblemente de 20 min,
  - un porcentaje de bolas de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro inferior al 50%, preferiblemente inferior al 30%, e incluso más preferiblemente del 20%,
  - una masa total de bolas lisantes superior al 60%, preferiblemente superior al 80%, e incluso más preferiblemente del 100% de la masa total de la muestra biológica tratada, y
  - un número de bolas de vidrio inferior a siete (7), preferiblemente igual a uno (1).

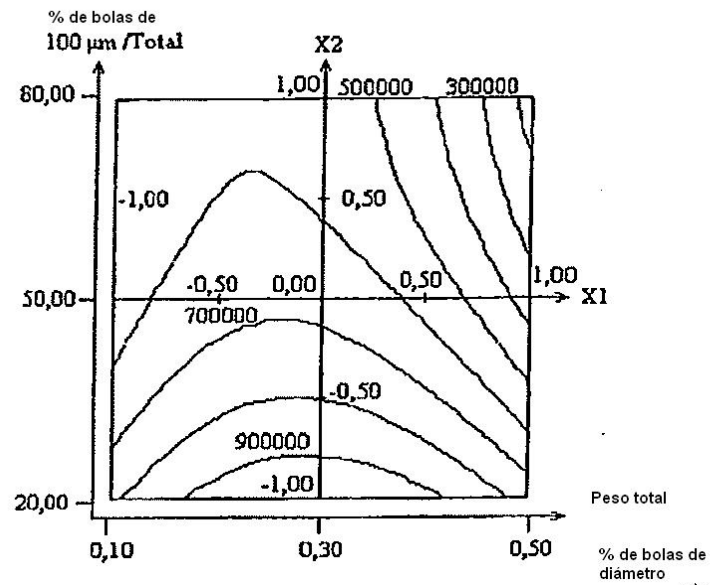


Fig 1

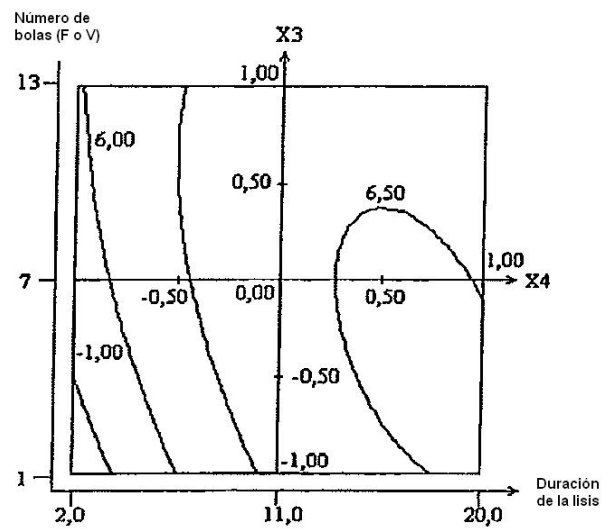


Fig. 2

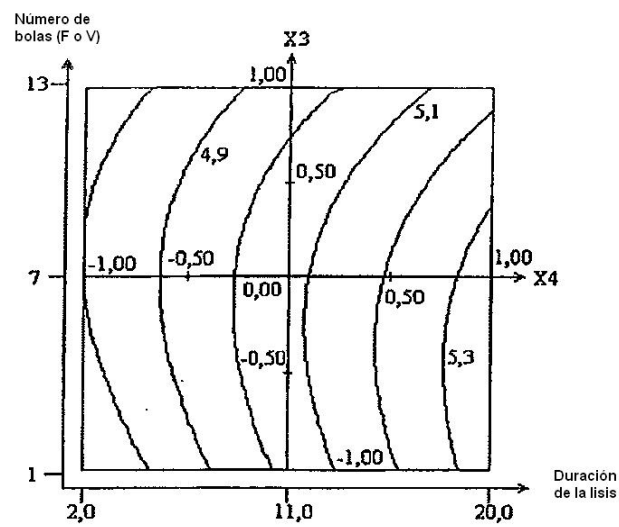


Fig. 3