



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 979**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00930821 .4**

96 Fecha de presentación : **19.05.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1185616**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2002**

54

Título: **Procedimiento para detectar y enumerar microorganismos rápidamente en preparaciones de células de mamíferos usando la bioluminiscencia del ATP.**

30

Prioridad: **25.05.1999 US 135910 P**

73

Titular/es: **MILLIPORE CORPORATION**
290 Concord Road
Billerica, Massachusetts 01821, US

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.11.2011

72

Inventor/es: **Presente, Esther;**
Young, Barbara y
Upperman, Susan

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.11.2011

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 979 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 detectar y enumerar microorganismos rápidamente en preparaciones de células de mamíferos usando la bioluminiscencia del ATP

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para reducir el trifosfato de adenosina (ATP) de fondo en una preparación de células de mamífero a partir de un fermentador de células de mamífero, y detectar la presencia o ausencia de microorganismos en la preparación de células usando la bioluminiscencia del ATP.

Antecedentes de la invención

- 10 Los productos biofarmacéuticos basados en proteínas se producen con frecuencia por clonación de los genes deseados en células de cultivo tisular de mamíferos y producción de los productos proteicos a gran escala en una instalación de fermentación de células de mamífero. Sin embargo, la contaminación microbiana de los fermentadores de células de mamífero da como resultado la muerte celular y conduce a pérdidas y retrasos en la producción. Las medidas proactivas, tales como controlar la producción del cultivo celular y detectar la presencia de bajos niveles de contaminación por microorganismos, son útiles para reducir la pérdida de tiempo y de ingresos.
- 15 Los microorganismos contaminantes se detectan normalmente en el cultivo celular mediante filtración por membrana, seguida de cultivo en medios hasta que sean visibles colonias, o mediante ensayo de esterilidad en medios líquidos. El procedimiento de cultivo normalmente no produce resultados durante varios días y el ensayo de esterilidad convencional requiere de una a dos semanas para obtener resultados. Aunque se conocen otros procedimientos de detección, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa, para detectar organismos
- 20 específicos tales como Mycoplasma, y procedimientos para detectar una contaminación microbiana general en el mercado de los ensayos de sangre, tales como BacT/Alert® de Organon Tecknika y Bactec™ de Becton Dickinson, estos procedimientos no usan la bioluminiscencia del ATP y no tienen la sensibilidad o la velocidad de un sistema de detección de ATP.

Sumario de la invención

- 25 Por lo tanto, un objeto principal de la presente invención es proporcionar un procedimiento para detectar y enumerar con exactitud los microorganismos en preparaciones de células de mamífero a partir de un fermentador de células de mamífero usando la bioluminiscencia del ATP.

30 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento altamente sensible para detectar y enumerar de manera competente bajos niveles de microorganismos en una preparación de células de mamífero a partir de un fermentador de células de mamífero.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento conveniente para preparar muestras para detectar y enumerar microorganismos en preparaciones de células de mamífero a partir de un fermentador de células de mamífero.

- 35 Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento para detectar y enumerar microorganismos que cuantifique los organismos microbianos y registre y documente automáticamente los resultados.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento para detectar y enumerar microorganismos en preparaciones de células de mamífero en menos de 24 horas.

Se exponen características esenciales y opcionales de la presente invención en las reivindicaciones principales y reivindicaciones dependientes, respectivamente, adjuntas.

- 40 Un procedimiento preferido de la invención para detectar y enumerar microorganismos, que tienen un nivel de ATP microbiano, en mamíferos a partir de preparaciones de células de fermentadores de células de mamífero, comprende las etapas de: proporcionar una preparación de células de mamífero a partir de un fermentador de células de mamífero, que comprende células de mamífero que tienen un nivel de ATP de mamífero; reducir el nivel de ATP de mamífero en la preparación de células lisando de forma diferencial las células de mamífero con un
- 45 choque osmótico, por ejemplo, usando agua Milli-Q y uno o más detergentes para extraer el ATP de mamífero, tratando el ATP de mamífero extraído con una o más enzimas hidrolizantes de ATP, tales como adenosina trifosfatasa (ATPasa); inmovilizar los microorganismos y eliminar por lavado el detergente y la ATPasa por filtración de la preparación de células de mamífero a través de una membrana hidrófila/hidrófoba microdividida; extraer el ATP microbiano usando un reactivo de extracción; aplicar un reactivo bioluminiscente sobre la membrana; y detectar y
- 50 enumerar los microorganismos. El procedimiento puede comprender además, después de la etapa de extracción, la etapa de secar la membrana a temperaturas de entre aproximadamente la temperatura ambiente y 40 °C.

El procedimiento, después de la etapa de hidrolizar el ATP de mamífero, comprende la etapa de incubar la preparación de células durante 15 minutos a temperatura ambiente conservando al mismo tiempo la viabilidad de los microorganismos; y después de la etapa de filtrar la preparación de células, puede comprender además la etapa de

incubar la preparación de células durante 8-24 horas a 25-35 °C.

Los detergentes comprenden preferentemente uno o más detergentes seleccionados de un grupo que consiste en Tween 80 al 2 %, Tween 80 al 13 % y Triton X-100 al 0,005 % con o sin SDS al 10⁻⁵ %, y el reactivo bioluminiscente comprende preferentemente un reactivo de luciferina-luciferasa. El reactivo de extracción de ATP microbiano comprende preferentemente metanol o etanol mezclado con del 0,1 al 5 % en peso de hidróxido de amonio.

El reactivo bioluminiscente comprende preferentemente un reactivo de luciferina/luciferasa y el reactivo de extracción de ATP microbiano comprende preferentemente metanol o etanol mezclado con del 0,1 al 5 % en peso de hidróxido de amonio.

Al experto en la materia se le ocurrirán otros objetos, características y ventajas a partir de la descripción de los procedimientos preferidos siguiente.

Descripción detallada de los procedimientos preferidos

El procedimiento de la invención se basa en la bioluminiscencia del ATP y usa la enzima productora de luz luciferasa, obtenida de luciérnagas, para la detección rápida de microorganismos. El procedimiento puede usarse con cualquier tipo de células de tejido de un paciente, incluyendo, pero sin limitación, células madre. Se espera que el procedimiento sea útil para otros productos biomédicos tales como vacunas de células.

El trifosfato de adenosina (ATP), un almacén de energía que sirve de combustible en las reacciones metabólicas, está contenido dentro de todos los organismos vivos. Como las luciérnagas, el procedimiento de la invención usa la luciferasa para hidrolizar el ATP en monofosfato de adenosina (AMP), liberando de este modo energía en forma de luz. La cantidad de luz emitida por cada unidad formadora de colonias microbianas se detecta usando un sistema de detección rápida Microstar™ de Millipore Corporation.

Para detectar la presencia o la ausencia de ATP microbiano en una preparación de células, debe reducirse el ATP de mamífero de fondo. El procedimiento de la invención logra generalmente la reducción del ATP de fondo usando una lisis diferencial por pretratamiento primero de las células de mamífero con un choque osmótico y un detergente o un cóctel de detergentes, seguido de tratamiento controlado con una enzima hidrolizante de ATP, la adenosina trifosfatasa (ATPasa). La preparación de células se filtra después a través de una membrana microporosa dividida para inmovilizar las células microbianas y eliminar por lavado el detergente y la enzima hidrolizante de ATP. Después de la filtración, la membrana se incuba en medios durante 8-24 horas. Después de lo cual se aplican reactivos de bioluminiscencia de ATP y se detecta cualquier señal de luz microbiana resultante.

Como se indica, después de obtener las células de tejido a partir de un fermentador de células de mamífero, las células de tejido se tratan previamente por lisis diferencial con un choque osmótico y un detergente o cóctel de detergentes. Diversas condiciones de lisis diferencial son eficaces para reducir sustancialmente los niveles de ATP de mamífero, conservando al mismo tiempo la viabilidad de las células microbianas. Estas condiciones de lisis diferencial incluyen, pero no necesariamente se limitan a, agua Milli-Q y/o Triton-X 100 al 0,005 % con o sin SDS al 10⁻⁵ %. En todas las condiciones, hay preferentemente aproximadamente 10⁶ células de cultivo tisular en 10 ml. Las células de cultivo tisular se incuban después durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pueden añadirse diez unidades de ATPasa antes o después de la incubación de 15 minutos, pero antes de la filtración.

La filtración se efectúa vertiendo la preparación de células preferentemente a través de una unidad de filtrado Milliflex MicroStar™ que contiene la membrana desvelada en la Patente de Estados Unidos 5.366.867, que comprende un filtro de membrana que comprende una película o lámina de una membrana de filtración hidrófila/hidrófoba unida a un armazón de plástico. La membrana está compuesta por varias secciones de filtro hidrófilas sustancialmente aisladas completamente entre sí con microdivisiones hidrófobas circulares o reticulares.

En el caso de las levaduras, el filtro con las células inmovilizadas capturadas sobre el mismo puede tratarse inmediatamente con un reactivo de bioluminiscencia y ensayarse para determinar la presencia de microbios. En el caso de bacterias, el filtro con las células microbianas inmovilizadas capturadas sobre el mismo se incuba preferentemente en un casete de TSB líquido a 25-35 °C durante 8-24 horas, preferentemente aproximadamente 16 horas.

Después de la incubación, los filtros se secan y después se pulverizan con un reactivo de extracción de ATP que tiene preferentemente un punto de ebullición por debajo de 120 °C. Reactivos de extracción útiles incluyen alcoholes, ésteres y derivados halogenados de metano, etano, metileno o etileno, así como acetonitrilo y trietilamina. Se prefiere metanol y etanol. El reactivo de extracción de ATP microbiano puede potenciarse adicionalmente mezclando del 0,1 al 5 % en peso de ácido clorhídrico, ácidos orgánicos que tengan un punto de ebullición por debajo de 120 °C, o compuestos básicos tales como hidróxido de amonio y aminas orgánicas, aunque se prefiere hidróxido de amonio. Dependiendo de las especies de microbios a ensayar, después de un periodo de entre 5 segundos y 5 minutos, el reactivo de extracción de ATP se elimina posteriormente por evaporación a temperaturas de entre la temperatura ambiente y 40 °C.

Después de la evaporación, un reactivo inductor de luminiscencia de luciferina/luciferasa se pulveriza o se aplica con una pipeta sobre el filtro de membrana. El filtro tratado se expone después a un sistema de detección rápida Microstar™ de Millipore Corporation mediante el que se detecta y se enumera cualquier señal de luz microbiana, y el sistema registra y documenta los resultados. El tiempo total de preparación de la muestra y detección hasta el resultado final es inferior a 24 horas.

Todos de detergente, reactivos de extracción de ATP y reactivos de bioluminiscencia descritos en el presente documento pueden obtenerse a través de Sigma-Aldrich. La Milli-Q es un producto de Millipore Corporation.

A continuación hay cuatro ejemplos adicionales de procedimientos preferidos de la invención.

EJEMPLO A (Ejemplo de referencia)

1. Añadir 9 ml de agua MilliQ estéril a un tubo cónico de 15 ml estéril.
2. Añadir 1 ml de células (aproximadamente 10^6).
3. Añadir 10 U de Apirasa (100 U disueltas en 1 ml de tampón de Butterfields estéril).
4. Agitar en espiral.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
6. Preparar un colector Milliflex con unidades de MicroStar Milliflex que contienen aproximadamente 50 ml de agua MilliQ estéril.
7. Añadir la muestra y filtrar.
8. Aclarar con 10 ml de Tween 80 al 2 % estéril.
9. Aclarar dos veces con 50 ml de agua MilliQ estéril.
10. Ponerlo en un casete de medios líquidos que contiene TSB.
11. Incubar a 30 °C durante 17 horas.
12. Después de la incubación, secar las membranas en una campana de seguridad biológica.
13. Aplicar el agente liberador de ATP.
14. Secar.
15. Aplicar el reactivo de bioluminiscencia.
16. Detectar durante 15 segundos.

Para incorporar las muestras, seguir las etapas 1-3, después añadir 100 µl de una dilución 10^{-5} de un cultivo de una noche de *B. subtilis*, ATCC N° 6633. Continuar con las etapas 4-16.

EJEMPLO C

1. Añadir 9 ml de agua MilliQ estéril a un tubo cónico de 15 ml estéril.
2. Añadir 50 µl de Triton X-100 estéril al 1 % para conseguir una concentración final del 0,005 %.
3. Seguir las etapas 2-16 del Ejemplo A.

EJEMPLO D

1. Añadir 9 ml de agua MilliQ estéril a un tubo cónico de 15 ml estéril.
2. Añadir 50 µl de Triton X-100 estéril al 1 % para conseguir una concentración final del 0,005 %.
3. Añadir 10 µl de SDS estéril al 0,01 % para conseguir una concentración final del 10^{-5} %.
4. Seguir las etapas 2-16 del Ejemplo A.

Al experto en la materia se le ocurrirán ligeras modificaciones de los procedimientos y se incluyen en las reivindicaciones siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección de microorganismos en una preparación de células de mamífero a partir de un fermentador de células de mamífero, incluyendo la preparación de células de mamífero que tienen un nivel de ATP de mamífero, en el que el procedimiento incluye las etapas secuenciales de:
- 5 reducir el nivel de ATP de mamífero en la preparación de células lisando de forma diferencial las células de mamífero con un choque osmótico y uno o más detergentes para extraer o liberar el ATP de mamífero; tratar el ATP de mamífero extraído con una o más enzimas hidrolizantes de ATP; incubar la preparación de células durante 15 minutos a temperatura ambiente conservando al mismo tiempo la viabilidad de los microorganismos;
- 10 filtrar la preparación de células de mamífero a través de una membrana hidrófila/hidrófoba microdividida compuesta por varias secciones de filtro hidrófilas sustancialmente aisladas completamente entre sí con microdivisiones hidrófobas circulares o reticulares para inmovilizar los microorganismos; eliminar por lavado el detergente y la enzima hidrolizante en dicha membrana;
- 15 extraer el ATP microbiano de los microorganismos inmovilizados usando un agente de extracción; aplicar un reactivo bioluminiscente sobre la membrana; y detectar la luz emitida por el ATP microbiano para indicar la presencia y el número de microorganismos en la preparación de células.
2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho uno o más detergentes comprenden uno o más detergentes seleccionados del grupo que consiste en Tween 80 al 2 %, Tween 80 al 13 %, Triton X-100 al 0,005 % y Triton X-100 al 0,005 % más SDS al 10^{-5} %.
- 20 3. Procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de secar la membrana después de la extracción del ATP microbiano y antes de aplicar el reactivo bioluminiscente sobre la membrana.
4. Procedimiento de la reivindicación 3, en el que la membrana se seca a temperaturas de entre aproximadamente la temperatura ambiente y 40 °C.
- 25 5. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que, después de la etapa de filtración de la preparación de células, la membrana a través de la cual se filtró la preparación de células se incubó durante 8-24 horas a 25-35 °C.
6. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo bioluminiscente comprende un reactivo de luciferina/luciferasa.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo para la extracción de ATP microbiano comprende
- 30 a) metanol mezclado con del 0,1 al 5 % en peso de hidróxido de amonio; o
b) etanol mezclado con del 0,1 al 5 % en peso de hidróxido de amonio.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una o más de las enzimas hidrolizantes de ATP para tratar el ATP de mamífero extraído comprende adenosina trifosfatasa (ATPasa).