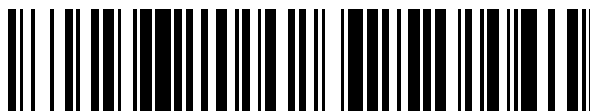


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 764**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2011** **E 11703046 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2529025**

54 Título: **Medio de cultivo para la detección de microorganismos por fluorescencia asociando un sustrato fluorogénico y un fluoróforo sensible al pH**

30 Prioridad:

27.01.2010 FR 1050529

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

28.09.2015

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US

72 Inventor/es:

MARC, FRÉDÉRIC

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 546 764 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

Medio de cultivo para la detección de microorganismos por fluorescencia asociando un sustrato fluorogénico y un fluoróforo sensible al pH

5 La presente solicitud se refiere a un método y medios para ensayar la esterilidad de fluidos acuosos o gaseosos usados, en particular, en la fabricación de productos y dispositivos farmacéuticos.

En particular, se refiere a un medio de cultivo que combina un sustrato fluorogénico y un fluoróforo sensible al pH que es de uso para la detección de microorganismos por fluorescencia, en particular acoplado las medidas de fluorescencia relacionadas con los fluoróforos sensibles al pH y las medidas de fluorescencia relacionadas con la activación del (de los) sustrato(s) fluorogénico(s) por los microorganismos.

10 La industria farmacéutica es uno de los sectores donde las restricciones de esterilidad son muy grandes, obligando a un seguimiento constante de la calidad de los productos y de todas las actividades que rodean a estos productos.

En términos de contaminación por microorganismos, el ensayo se lleva a cabo usando métodos microbiológicos según las normativas y estándares estipulados en la farmacopea.

15 La farmacopea europea o estadounidense define varios niveles de calidad microbiológica de las preparaciones farmacéuticas.

Los productos que se requiere que sean estériles, tales como preparaciones parenterales (productos inyectables, preparaciones para perfusiones, etc.) y productos oftálmicos, se caracterizan por una total ausencia de microorganismos capaces de reproducirse bien por sí mismos o bien en un organismo huésped.

20 Los productos que no se requiere que sean estériles pueden contener un cierto número de microorganismos, a condición de que la contaminación microbiana esté contenida por debajo de un cierto umbral definido según los criterios de la farmacopea. La presencia de estos microorganismos no representa ningún peligro al paciente, dado que esto implica, por ejemplo, medicamentos administrados por vía oral o rectal. La flora microbiana y el pH ácido del estómago impiden el desarrollo de los microorganismos, a condición, sin embargo, de que el número de los mismos no exceda los criterios recomendados por dicha farmacopea. Se definen en la farmacopea diversas categorías de productos no estériles, teniendo cada uno sus propios requisitos en términos de ensayo microbiológico según su propósito final.

25 Los productos a ser ensayados están, además, en diversas formas sólidas o líquidas y también en diversos volúmenes y envasados. A este respecto, se puede hacer una distinción entre productos filtrables, cuyo ensayo microbiológico puede ser llevado a cabo por medio de filtración a través de una membrana, y productos no filtrables, para los que la farmacopea recomienda la técnica de inoculación directa del objeto ensayado en un medio de cultivo.

30 Las preparaciones que pueden ser ensayadas por inoculación directa del medio de cultivo son generalmente sólidas, pero también pueden tener una consistencia fluida, por ejemplo líquidos oleosos, a los que se añade un medio suplementado con 10 g/l de polisorbato 80, y pomadas y cremas, a las que se añaden diluyentes o emulsionantes adecuados. Es habitual que el volumen del objeto no exceda de 10% del volumen del medio de cultivo.

35 Dependiendo de los requisitos regulatorios, se pueden llevar a cabo diversos tipos de ensayo de la calidad microbiológica, que van desde el ensayo de esterilidad estricta hasta el recuento específico de los principales microorganismos aeróbicos y anaeróbico, e incluyendo la detección enfocada a microorganismos específicos.

40 En general, cuando se desea tener una idea muy precisa del tipo de microorganismos encontrados, los microbiólogos prefieren cultivos en medio de cultivo de agar, que hacen posible hacer un hallazgo visual de la presencia de los microorganismos, que forman microcolonias dentro de o sobre el agar. Esta estrategia hace posible, si se requiere, tomar muestras de los microorganismos que forman estas colonias, y realizar análisis adicionales para verificación. Así, cuando los microorganismos son de naturaleza diferente, es posible determinar, hasta cierto punto, la proporción relativa de los diversos tipos de microorganismos encontrados.

45 Dicho esto, los cultivos en medio de cultivo de agar requieren tiempo y mano de obra. Así, el tiempo de división de microorganismos de crecimiento lento, por ejemplo *Methylobacter* sp. en un medio de cultivo, tal como medio R2A, pensado para causar el crecimiento de microorganismos estresados por un tratamiento con cloro, puede ser de 48 a 72 h [(Gallego V., García M.T. y Ventosa A. (2006), *Methylobacterium adhaesivum* sp., nov., a methylophilic bacterium isolated from drinking water. *Int. J. Syst. Evol Microbiol* 56, 339-342)]. Estudios muestran, además, que es necesario un periodo de incubación mínimo de 14 días para validar realmente la ausencia de microorganismos en una muestra [Bathgate, H. et al. (1993) *Journal of Parenteral Science and Technology* 47(5): 254-257].

50 En el contexto de los ensayos de inspección llevados a cabo en una cadena de producción industrial, este periodo es demasiado largo para poder tratar rápidamente una contaminación. Esto es porque, si la contaminación es establecida varios días después de la fabricación de un producto, la retirada de este producto para verificación puede causar grandes pérdidas financieras. El problema puede ser también uno de salud pública, con respecto al

ensayo de la calidad del agua potable, que es distribuida rápidamente después del tratamiento.

Los cultivos en medio líquido, por su parte, hacen posible, hasta cierto punto, reducir la mano de obra y el tiempo para cultivar los microorganismos. Sin embargo, los riesgos de falsos positivos relacionados con el manejo de membranas de filtro y/o de las placas de agar son más altos.

- 5 Las unidades de preparación estériles transparentes, por ejemplo las desarrolladas por el solicitante (Steritest EZ, Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA), para llevar a cabo un ensayo de esterilidad después de la filtración de una muestra líquida o gaseosa, existen desde hace varios años. El principio es retener, en la superficie de la membrana, los posibles contaminantes contenidos en la muestra que es filtrada, y después, una vez que la filtración de la muestra ha sido llevada a cabo, incubar la membrana de filtro dentro de la unidad de filtro llenada con medio de crecimiento estéril.

En el caso de que estén presentes uno o más contaminantes, el medio, que es transparente, se vuelve turbio debido al desarrollo de las células. La presencia de microorganismos en la unidad de filtro es establecida entonces visualmente.

- 15 La detección en medio líquido requiere generalmente un poco más de tiempo que en medio de cultivo de agar, dado que se necesita alcanzar una concentración suficiente de células en el medio de cultivo para que este último se vuelva turbio. Los cultivos en medio líquido son, sin embargo, generalmente más favorables para el crecimiento de microorganismos aeróbicos o anaeróbicos.

- 20 Los ensayos en medios líquidos tienen, por otra parte, ciertas limitaciones, entre las cuales está, en particular, el hecho de que es imposible estimar el número, la naturaleza y la proporción de los contaminantes inicialmente presentes en la muestra ensayada.

A este respecto, los ensayos llevados a cabo en un medio de cultivo líquido sólo hacen posible proporcionar un mensaje de advertencia, pero sin proporcionar información en cuanto a la naturaleza de los microorganismos implicados.

- 25 Por estas diversas razones, sería deseable poder tener ensayos disponibles en medio líquido que fueran más rápidos y capaces de dar una primera indicación en cuanto a la naturaleza de los microorganismos identificados.

Como mínimo, la información sobre los tipos de microorganismos encontrados (una o más especies, aeróbicos o anaeróbicos, de crecimiento lento o de crecimiento rápido, gram + o gram -, etc.), obtenida en una fase temprana, sería ventajosa para que un técnico pudiera conocer el grado de contaminación y determinar su origen.

- 30 A fin de detectar contaminaciones más rápidamente, algunos métodos usan sustratos fluorogénicos que son incorporados en los medios de cultivo.

- 35 Los sustratos fluorogénicos son moléculas complejas que, en contacto con enzimas sintetizadas por los microorganismos, son escindidas y se vuelven fluorescentes. La fluorescencia emitida es fácilmente detectable con un espectrofotómetro iluminando el medio de cultivo usando radiación en el espectro UV o visible, antes de que la densidad de las células sea suficiente para hacer turbio al medio de cultivo. Por lo tanto permiten una detección más rápida de contaminaciones.

Existen varias familias de sustratos fluorogénicos.

No obstante, estas familias de sustratos tienen inconvenientes que son particulares a ellos y que limitan su uso en el contexto de ensayos de esterilidad.

- 40 Los derivados de la fluoresceína (CFA, CFDA) son, por ejemplo, sustratos fluorogénicos que son activados por un amplio intervalo de microorganismos; la CFDA es así reconocida habitualmente por ser un marcador de viabilidad para células procarióticas o eucarióticas. Estos sustratos son sensibles a la actividad esterasa de enzimas presentes en la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, esta actividad esterasa es expresada residualmente en muchos medios de cultivo estipulados por la farmacopea, en particular los que comprenden extractos de levadura o extractos de proteína. Como resultado, estos sustratos sufren a menudo hidrólisis abiótica no despreciable [Clarke, J.M. et al., 2001, *Journal of Microbiological Methods*, 46:261-267] y no son, por consiguiente, muy adecuados para el uso en ensayos de detección en medio líquido. Además, la fuerza de la fluorescencia emitida por estos sustratos es sensible a ciertos parámetros físicos del medio de cultivo, en particular el pH, lo que puede tener una influencia sobre la fiabilidad de la detección.

- 50 Los derivados de la metilumbeliferona (metilumbeliferilo), con la excepción de algunos de sus derivados de acetato o butirato, son sustratos que son mucho menos sensibles a la hidrólisis abiótica que los derivados de la fluoresceína, pero tienen un espectro mucho más estrecho. Sin embargo, hay una variedad relativamente amplia de sustratos diferentes [Manafi, M., Kneifel, W. y Bascomb, S. (1991) Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 55(3): 335-348] adecuados para la detección específica de un cierto número de cepas bacterianas comunes.

No obstante, los espectros de emisión fluorescente de estos diversos sustratos de metilumbeliferilo tienden a superponerse unos sobre otros, lo que limita su uso concomitante para el fin de distinguir entre diversos tipos de microorganismos presentes simultáneamente en el mismo medio de cultivo.

- 5 Sin embargo, Bauters et al. [(2003) Enzymatic differentiation of *Candida parapsolisis* from other *Candida* sp. in a membrane filtration test, *Journal of Microbiological Methods* 53: 11-15] describe el uso de diferentes derivados de 4-MU que tienen diferente especificidad para la detección de un intervalo de especies de levadura (principalmente *Candida* sp.).

Otra familia de sustratos fluorogénicos, desarrollados más recientemente por la compañía Biosynth, son los AldolesTM.

- 10 Estos sustratos tienen características similares a los de los derivados de metilumbeliferona.

En particular, los aldoles tienen un espectro de emisión de fluorescencia muy cercano al de los compuestos de metilumbeliferilo. Por consiguiente, tampoco hacen posible distinguir entre los microorganismos presentes en el mismo medio de cultivo, ni determinar la proporción relativa de los mismos.

- 15 Con el objetivo de mejorar la especificidad y la rapidez de ensayos de esterilidad llevados a cabo en medio líquido, los presentes inventores tuvieron la idea de aprovechar la ventaja de las especificidades de las diversas familias de sustratos mencionados anteriormente, y de combinarlos para conseguir ensayos de esterilidad que son más rápidos y hacen posible obtener información sobre el tipo de microorganismo detectado.

- 20 Para ese fin, los inventores han seleccionado y usado simultáneamente sustratos fluorogénicos de Aldol, que son estables en los medios de cultivo usuales, y los han combinado con sustratos cuya fluorescencia es, por el contrario, sensible a variaciones en el pH del medio de cultivo, tales como los derivados de la fluoresceína o el HPTS.

Sorprendentemente, los inventores han advertido que las medidas de fluorescencia emitida, por una parte, por los sustratos fluorogénicos (derivados de aldol) y, por otra parte, por los fluoróforos sensibles al pH (fluoresceína o HPTS) hacen posible detectar pronto una contaminación y evaluar, hasta cierto punto, el tipo de microorganismos implicados en la contaminación.

- 25 En su principio general, la invención comprende por lo tanto el uso simultáneo de fluoróforos sensibles al pH e insensibles al pH, con el objetivo de obtener una detección universal temprana de microorganismos, y el acoplamiento de las medidas de fluorescencia obtenidas, respectivamente, para el fluoróforo sensible al pH y el fluoróforo activado por las células vivas hace posible obtener una firma característica de los microorganismos encontrados.

- 30 Figura 1: Resultados experimentales preliminares a la invención. Los diversos gráficos representan los resultados de medidas de fluorescencia relacionadas con los diversos fluoróforos sensibles al pH, llevadas a cabo durante cultivos de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, llevados a cabo durante 24 horas usando diversas concentraciones para cada molécula. 1A: HPTS. 1B: Naftofluoresceína. 1C: Fluoresceína. 1D: Carboxinaftofluoresceína.

- 35 Figura 2: Resultados experimentales preliminares a la invención. El gráfico reporta la fluorescencia emitida por HPTS en presencia de diversos microorganismos durante cultivos de 24 horas.

Figura 3: Tabla que recapitula los diversos ensayos de cultivo llevados a cabo según la invención para obtener los datos experimentales representados en los gráficos de las Figuras 4 a 7.

- 40 Figuras 4 a 7: Los gráficos de las Figuras 4 a 7 representan los resultados de las medidas de fluorescencia con el tiempo, relacionadas con las diversas combinaciones de compuestos fluorescentes usados, a saber, respectivamente:

- 4 - combinación 4MU - HPTS;
- 5 - combinación 4MI - CF;
- 6 - combinación Aldol - HPTS;
- 7 - combinación Aldol - CF.

- 45 Las medidas reportadas en estos gráficos son tales que:

Lm1 corresponde a la fluorescencia emitida por los Aldoles

Lm2 corresponde a la fluorescencia emitida por el HPTS

Lm3 corresponde a la fluorescencia emitida por el 4-MU

Lm4 corresponde a la fluorescencia emitida por la carboxifluoresceína (CF).

Cada gráfico A a F corresponden al cultivo de un microorganismo como se indica a continuación:

A - *E. coli*

B - *P. aeruginosa*

C - *B. subtilis*

5 D - *S. aureus*

E - *A. brasiliensis*

F - *C. albicans*

El gráfico G corresponde a las medidas de control (medio de cultivo no contaminado que comprende las combinaciones mencionadas anteriormente).

10 Figura 4: Comparación del crecimiento de los diversos microorganismos en presencia de la mezcla de derivados de metilumbeliferilo (fosfato de 4-MU, beta-glucopiranosido de 4-MU, alfa-glucopiranosido de 4-MU, beta-galactopiranosido de 4-MU) y de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico.

(combinación 4-MU - HPTS).

15 Figura 5: Comparación del crecimiento de los diversos microorganismos en presencia de la mezcla de derivados de metilumbeliferilo (fosfato de 4-MU, beta-glucopiranosido de 4-MU, alfa-glucopiranosido de 4-MU, beta-galactopiranosido de 4-MU) y de 5,6-carboxifluoresceína.

(combinación 4MU - CF).

20 Figura 6: Comparación del crecimiento de los diversos microorganismos en presencia de la mezcla de los derivados de Aldol (fosfato de Aldol 470, acetato de Aldol 470, beta-glucopiranosido de Aldol 455, beta-galactopiranosido de Aldol 455) y de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico.

(combinación Aldol - HPTS).

Figura 7: Comparación del crecimiento de los diversos microorganismos en presencia de la mezcla de los derivados de Aldol (fosfato de Aldol 470, acetato de Aldol 470, beta-glucopiranosido de Aldol 455, beta-galactopiranosido de Aldol 455) y de 5,6-carboxifluoresceína.

25 (combinación Aldol - CF).

La presente invención comprende por lo tanto un método para detectar microorganismos que es de uso, en particular, para llevar a cabo un ensayo de esterilidad en medio de cultivo líquido, caracterizado por que comprende cultivar, en un medio adecuado, una muestra para la que se busca determinar si está contaminada con un microorganismo vivo.

30 Este método se aplica a cualquier forma de muestra filtrable o no filtrable, en particular por inoculación directa de dicha muestra en un medio de cultivo previamente estéril.

A este respecto, es posible filtrar una muestra líquida, tal como agua, o un gas, tal como aire, usando una membrana. Esta membrana es inoculada después en un medio de cultivo líquido, como si formara una muestra sólida.

35 Según la invención, el método de detección comprende una o más de las siguientes etapas:

(i) colocar una muestra como se define anteriormente en un medio de cultivo que comprende:

- al menos un sustrato fluorogénico, en donde el al menos un sustrato fluorogénico es una mezcla de los siguientes compuestos:

-1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-glucopiranosido;

40 -1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-galactopiranosido;

acetato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo; y

fosfato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo,

que pueden ser activados por al menos una enzima de un microorganismo, y

- al menos un fluoróforo, cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo,

en condiciones que permiten el crecimiento de los microorganismos que se buscan;

(ii) analizar dicho medio de cultivo con respecto a la fluorescencia a fin de determinar la fluorescencia relacionada con la activación del sustrato fluorogénico contenido en el medio de cultivo por dicho microorganismo, y determinar la fluorescencia indicativa del pH del medio de cultivo, emitida por el fluoróforo;

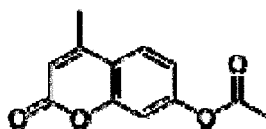
- 5 (iii) analizar las medidas de fluorescencia determinadas para el fluoróforo cuya fluorescencia es indicativa del pH, así como para el sustrato fluorogénico, para determinar la presencia o ausencia del tipo o tipos de microorganismos que se buscan en el medio de cultivo.

10 El término "sustrato fluorogénico" denota una molécula que comprende un grupo fluoróforo capaz de absorber energía de la luz y de liberar todo o parte de esta energía en la forma de un espectro de emisión de fluorescencia, y que también comprende un grupo "inactivador" que enmascara la fluorescencia de dicho grupo fluoróforo.

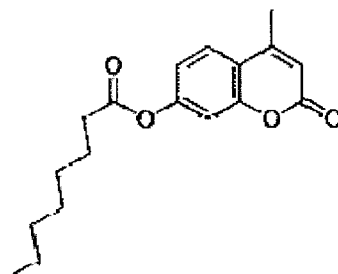
En contacto con enzimas específicas de los microorganismos, el sustrato fluorogénico adopta una forma diferente, permitiendo que el fluoróforo emita fluorescencia. Esta activación da como resultado bien un cambio en la conformación de la molécula que forma el sustrato o bien la escisión de dicha molécula formando residuos fluorescentes.

- 15 Se pueden concebir diversos sustratos fluorogénicos según la invención. Sustratos fluorogénicos que no son parte de la invención, pero son útiles para la comprensión de la invención dan como resultado, después de la activación enzimática, compuestos de 4-metilumbeliferona, cuya emisión de fluorescencia es alrededor de 460 ± 10 nm para una longitud de onda de excitación de aproximadamente 360 ± 10 nm. Tales sustratos fluorogénicos son, por ejemplo, derivados de metilumbeliferilo (4-MU):

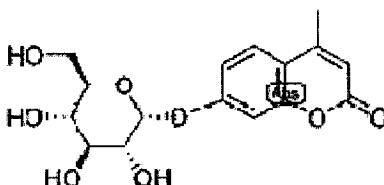
- 20 - acetato de 4-metilumbeliferilo (CAS: 2747-05-9).



- caprilato de 4-metilumbeliferilo (CAS: 2067-66-3)

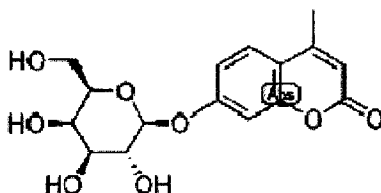


- α -D-glucopiranosido de 4-metilumbeliferilo (CAS: 17833-43-1)

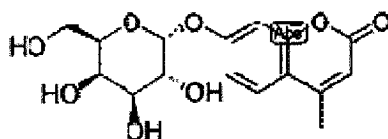


25

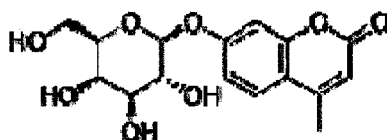
- β -D-glucopiranosido de 4-metilumbeliferilo (CAS: 18997-57-4)



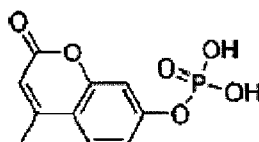
- α -D-galactopiranosido de 4-metilumbeliferilo (CAS: 38597-12-5)



- β -D-galactopiranosido de 4-metilumbeliferilo (CAS: 6160-78-7)



5 - fosfato de 4-metilumbeliferilo (CAS: 3368-04-5)



Debe entenderse que el término "microorganismo" denota cualquier célula viva capaz de multiplicarse de manera autónoma. El término "célula" quiere decir un citoplasma delimitado por una membrana, que comprende genes.

10 Los compuestos comercializados bajo el nombre AldolTM (Biosynth AG, Rietlisstrasse 4, 9422 Staad, Suiza) son sustratos preferidos según la invención, en particular los compuestos Aldol 470 (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo) y Aldol 455 (1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-ilo), y también los derivados de los mismos, en particular los derivados de acetato, fosfato, beta-galactósido y beta-glucósido de dichos compuestos. Estos compuestos se describen en la solicitud de patente europea presentada bajo el N° 09159639. Estos compuestos tienen la ventaja de ser activables en condiciones aeróbicas, al igual que en condiciones anaeróbicas, sin producir ninguna toxicidad con respecto a los microorganismos.

15 Para los fines de la presente invención, "un fluoróforo cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo" denota una molécula cuya fuerza de emisión de fluorescencia varía según el cambio en el pH en el medio de cultivo, o cuya longitud de onda de emisión varía según este mismo cambio en pH para una longitud de onda de excitación constante, permaneciendo la concentración de dicha molécula en el medio sustancialmente constante. 20 Preferiblemente, dichas variaciones en fluorescencia se observan en un intervalo de pH de entre 3 y 10, preferiblemente entre 5 y 9, más preferentemente entre 6 y 8. Los mecanismos moleculares que explican estas variaciones en fluorescencia en función del pH han sido descritos, por ejemplo, para ciertos derivados de cianina [Briggs M.S. et al. (2000) *Chem. Commun.* 2323-2324].

25 El término "variación en fluorescencia" quiere decir una variación en la RFU (unidad de fluorescencia relativa, por sus siglas en inglés) de al menos 10%, preferiblemente de al menos 20%, y más preferentemente de al menos 30%, para una variación de una unidad de pH.

30 Los fluoróforos cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo, preferidos según la invención, se seleccionan de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico o una sal del mismo, los compuestos de cianina o un derivado de los mismos, en particular pentametincianina, o un compuesto que comprende fluoresceína o un derivado, sal o éster de la misma.

Entre los compuestos que comprenden fluoresceína, se prefiere la carboxifluoresceína, en particular la 5(6)-carboxifluoresceína (CAS 72088-94-9).

Un fluoróforo preferido de la invención es también la sal trisódica del ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS) (CAS 27928-00-3).

35 Como se desprende de los ejemplos experimentales presentados más adelante en la presente solicitud, las variaciones respectivas, con el tiempo, de la fluorescencia relacionada con uno u otro de los compuestos fluorescentes son diferentes para cada tipo de microorganismo, y esto forma una firma única para cada uno de ellos, que puede ser detectada en cualquier fase temprana del método para detectar microorganismos.

40 Las combinaciones, según la invención, de uno o más compuestos de Aldol y de carboxifluoresceína, también se han encontrado relevantes para detectar y obtener una firma específica a los microorganismos. Los perfiles obtenidos pueden ser explicados al menos en parte por diferencias en metabolismo entre las diversas especies de

microorganismos (influencia sobre el pH del medio, velocidad de crecimiento, fuerza de la activación del sustrato fluorescente, etc.).

En uno de sus aspectos fundamentales, la invención se refiere al acoplamiento de las medidas de fluorescencia que se originan respectivamente de la activación del sustrato fluorogénico y del fluoróforo sensible al pH, en el mismo medio de cultivo, con el objetivo de identificar el tipo de microorganismo presente en este medio de cultivo. El término "acoplamiento" quiere decir determinar la relación entre la medida de fluorescencia que responde a la activación del sustrato fluorogénico con la otra medida de fluorescencia que responde a la variación en pH del medio de cultivo. Preferiblemente, esta relación se establece según una variable de tiempo (t), mediante cálculo o en la forma de una representación gráfica. Según un aspecto preferido de la invención, el acoplamiento de estos datos hace posible obtener una descripción del cambio en el medio de cultivo particular a los diversos tipos de microorganismos, integrando las variables de pH, tiempo y actividad enzimática microbiana.

Por tanto, el método para detectar microorganismos según la invención puede incluir, en la etapa ii) descrita anteriormente, el hecho de que la fluorescencia se mide a intervalos regulares para obtener una variación en fluorescencia en función del tiempo. Preferiblemente, la fluorescencia se mide cada 30 segundos, más preferiblemente cada minuto, incluso más preferiblemente cada dos minutos. De manera similar, en la etapa iii), las medidas de fluorescencia pueden ser comparadas con medidas estándar referenciadas en una base de datos, haciendo posible distinguir más claramente los diversos tipos de microorganismos.

En uno de sus aspectos, la invención se refiere a un medio de cultivo para implementar de manera más particular el método según la invención, que está constituido por un soporte nutritivo líquido o sólido, en el que al menos un sustrato fluorogénico, en donde el al menos un sustrato fluorogénico es una mezcla de los siguientes compuestos:

-1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-glucopiranosido;

-1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-galactopiranosido;

acetato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo; y

fosfato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo, y al menos un fluoróforo, cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo, como se definieron antes respectivamente, están solubilizados uniformemente.

El soporte nutritivo es lo más habitualmente un medio convencional ya descrito que no incluye agentes fluorescentes.

La fluorescencia particular al soporte nutritivo es, además, preferiblemente insensible a las variaciones en pH del medio de cultivo, y también a la introducción de dichos microorganismos en el medio de cultivo. En otras palabras, se debe tener cuidado preferentemente de que el propio medio de cultivo no experimente variaciones en fluorescencia capaces de interferir con la fluorescencia emitida por los fluoróforos.

Las condiciones para cultivar los microorganismos son sustancialmente las mismas que las descritas en la bibliografía, en particular en la farmacopea, para un medio convencional.

Aunque inicialmente diseñada para cultivos en medio líquido, no hay nada que impida que la invención sea implementada con medios de cultivo de agar usando dispositivos adecuados para medir la fluorescencia (por ejemplo un citómetro de barrido), que son conocidos por el experto en la técnica.

Un medio de cultivo según la invención comprende preferiblemente, como sustrato(s) fluorogénico(s) y fluoróforo(s), los compuestos o combinaciones de compuestos detallados anteriormente.

Según un aspecto preferido de la invención, el método el método para detectar microorganismos puede comprender una etapa i) en la que el (los) microorganismo(s) es (son) filtrados de antemano en una membrana antes de ser puestos en cultivo.

La invención también está dirigida a un kit para detectar microorganismos, caracterizado por que comprende un medio de cultivo según la invención, alternativamente en la forma de un envase independiente con vistas a ser mezclados:

- un medio de cultivo convencional para microorganismos;

- al menos un sustrato fluorogénico, en donde el al menos un sustrato fluorogénico es una mezcla de los siguientes compuestos:

-1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-glucopiranosido;

-1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-galactopiranosido;

acetato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo; y

fosfato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo, solubles en dicho medio de cultivo; y

- al menos un fluoróforo, soluble en dicho medio de cultivo, cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo.

5 El medio de cultivo puede ser envasado en forma deshidratada para las necesidades de almacenamiento o conveniencia.

10 Tal kit de detección puede comprender además una membrana para llevar a cabo un ensayo de esterilidad precedido por una etapa de filtración. Tal membrana de filtro puede ser monocapa o multicapa. Está constituida en general por uno o más materiales elegidos de politetrafluoroetileno, poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), policarbonato, poliamida, poliéster, poliétersulfona, acetilcelulosa y nitrocelulosa. Un ejemplo de este tipo de membrana es comercializado por el solicitante bajo la referencia HAWG Milliflex, Millipore.

Un kit según la invención puede comprender además una unidad de filtro, botella o bolsa, que son preferiblemente estériles, destinadas a recibir el medio de cultivo para llevar a cabo un ensayo de esterilidad.

Los siguientes ejemplos pretenden suplementar la descripción de la invención sin introducir ninguna limitación a la misma.

15 Ejemplo

El ejemplo incluye los usos de compuestos de 4-MU que no son presentados como realizaciones de la invención sino como ejemplos que son útiles para la comprensión de la invención.

1) Preparación de los medios de cultivo

20 Se prepararon 100 ml de medio TSB (Biomérieux) líquido y se esterizaron según las recomendaciones del fabricante. Después, según las diversas combinaciones definidas a continuación, se añadieron las siguientes disoluciones de fluoróforo sensible al pH y sustratos fluorogénicos en condiciones estériles al medio TSB.

Fluoróforos sensibles al pH:

HPTS:

- 30 µl de una disolución patrón estéril a 10 mM de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico, o

25 CF:

- 20 µl de una disolución patrón estéril a 100 mM de 5,6-carboxifluoresceína;

Sustratos fluorogénicos:

Aldoles:

30 - 200 µl de la mezcla estéril de derivados de Aldol (fosfato de Aldol 470, acetato de Aldol 470, beta-D-glucopiranosido de aldol 455, beta-D-galactopiranosido de aldol 455), donde la concentración patrón de cada derivado es 25 mg/ml; o

4-MU:

35 - 200 µl de la mezcla estéril de derivados de 4-metilumbeliferilo (fosfato de 4-MU, beta-D-glucopiranosido de 4-MU, alfa-D-glucopiranosido de 4-MU, beta-D-galactopiranosido de 4-MU) (4-MU), donde la concentración patrón de cada derivado es 50 mg/ml.

Las disoluciones de fluoróforos y sustratos fluorogénicos fueron esterilizadas de antemano usando una unidad de filtro Stericup que tenía una membrana de filtro con poros de 0,22 µm antes de ser incorporadas para formar los medios de cultivo ensayados.

Referencias de los productos usados (nº de referencia de catálogo):

TSB	: Biomérieux # 41146
HPTS	: Fluka # 56360
5,6-carboxifluoresceína	: Sigma # 21877
fosfato de Aldol 470	: Biosynth # A-4678
acetato de Aldol 470	: Biosynth # A-4680

beta-D-glucopiranosido de Aldol 455	: Biosynth # A-4689
beta-D-galactopiranosido de Aldol 455	: Biosynth # A-4684
fosfato de 4-MU	: Glycosynth # 44093
beta-D-glucopiranosido de 4-MU	: Glycosynth # 44059
alfa-D-glucopiranosido de 4-MU	: Glycosynth # 44051
beta-D-galactopiranosido de 4-MU	: Glycosynth # 44045

2) Preparación de las suspensiones de microorganismos

Los ensayos se llevaron a cabo con los siguientes microorganismos:

A	<i>E. coli</i>	ATCC 8739
B	<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 9027
C	<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633
D	<i>S. aureus</i>	ATCC 6538
E	<i>A. brasiliensis</i>	ATCC 16404
F	<i>C. albicans</i>	DSMZ 1386

Cada cepa de microorganismo fue diluida para alcanzar una concentración inicial que variaba entre 10^3 y 10^4 células/ml (10^2 células/ml para *A. brasiliensis*).

5 3) Preparación de los cultivos en una placa con 96 pocillos

Se usó para los ensayos una placa Greiner Bio-One µClear Plate con 96 pocillos que tenía la referencia 655090.

Los inóculos para cada cepa fueron introducidos en la primera columna de cada serie de medios de cultivo, y después se diluyeron a $1/10^9$ en serie.

10 La Figura 3 recapitula los diferentes ensayos de cultivo llevados a cabo, que se realizan usando los medios de cultivo indicados a continuación.

Para la combinación 4MU - HPTS:

- TBS

- Mezcla de derivados de metilumbeliferilo (fosfato de 4-MU, beta-glucopiranosido de 4-MU, alfa-glucopiranosido de 4-MU, beta-galactopiranosido de 4-MU) y

15 - ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico.

Para la combinación 4MU - CF:

- TSB

- Mezcla de derivados de metilumbeliferilo (fosfato de 4-MU, beta-glucopiranosido de 4-MU, alfa-glucopiranosido de 4-MU, beta-galactopiranosido de 4-MU) y

20 - 5,6-carboxifluoresceína (CF).

Para la combinación Aldol - HPTS:

- TBS

- Mezcla de los derivados de Aldol (fosfato de Aldol 470, acetato de Aldol 470, beta-glucopiranosido de aldol 455, beta-galactopiranosido de aldol 455) y

25 - ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS).

Para la combinación Aldol - CF:

- TBS

- Mezcla de los derivados de Aldol (fosfato de Aldol 470, acetato de Aldol 470, beta-glucopiranosido de aldol 455, beta-galactopiranosido de aldol 455) y

- 5,6-carboxifluoresceína (CF).

5 Cada uno de los medios anteriores es ensayado para cada uno de los microorganismos con tres diluciones diferentes.

El lector de placas de 96 pocillos de marca registrada Gemini fue programado para realizar una adquisición cada 30 minutos a lo largo de 72 h, es decir, 145 puntos de medida.

La adquisición para los valores de fluorescencia se llevó a cabo mediante un lector óptico desde el fondo de los pocillos.

10 Cada pocillo es el sujeto de 10 medidas, y se registra el valor medio.

Para cada pocillo, se llevan a cabo cuatro tipos de medida:

1 - Lm1 : Exc : 355 nm Em : 555 nm corte : 530 nm

2 - Lm2 : Exc : 403 nm Em : 451 nm corte : 435 nm

3 - Lm3 : Exc : 360 nm Em : 455 nm corte : 435 nm

15 4 - Lm4 : Exc : 485 nm Em : 525 nm corte : 595 nm

La adquisición en el canal Lm1 permite medir la fluorescencia de los aldoles.

La adquisición en el canal Lm2 permite medir la fluorescencia del HPTS.

La adquisición en el canal Lm3 permite medir la fluorescencia de los 4-MU.

La adquisición en el canal Lm4 permite medir la fluorescencia de la CF.

20 La cinética de adquisición fue producida usando el programa informático softmax Pro.

4) Análisis de los resultados obtenidos

Los resultados de las medidas de fluorescencia se muestran en la forma de gráficos en las Figuras 4 a 7. Las Figuras 4 y 5 se presentan no como realizaciones de la invención sino como ejemplos que son útiles para la comprensión de la invención.

25 Las Figuras 4A a 4G se refieren a la combinación 4-MU + HPTS.

Las Figuras 5A a 5G se refieren a la combinación 4-MU + CF.

Las Figuras 6A a 6G se refieren a la combinación Aldol + HPTS.

Las Figuras 7A a 7G se refieren a la combinación Aldol + CF.

Los gráficos denotados como G corresponden al control negativo no contaminado.

30 En todos los casos se obtiene un perfil característico para los microorganismos en el canal que permite medir una bajada en el pH (HPTS o CF), así como en el que permite medir la actividad metabólica (4-MU o Aldol). En particular, se obtienen perfiles muy atípicos en el caso de *P. aeruginosa*, la señal relacionada con el uso de HPTS aumenta, mientras que el pH baja (Fig. 4B y 6B).

35 De una manera similar para *S. aureus*, la señal relacionada con el uso de 4-MU forma un pico, después aumenta de manera prácticamente lineal (Fig. 4D y 5D).

Se pueden advertir perfiles de bajada del pH que varían según las cepas (Fig. 5 y 7) con respecto al uso de carboxifluoresceína (CF).

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo para detectar la presencia de microorganismos, caracterizado por que comprende un soporte nutritivo líquido, en el que están solubilizados uniformemente:
 - al menos un sustrato fluorogénico que puede ser activado por al menos una enzima de un microorganismo, en donde el al menos un sustrato fluorogénico es una mezcla de los siguientes compuestos:
 - 1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-glucopiranosido;
 - 1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-galactopiranosido;
 - acetato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo; y
 - fosfato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo
- 5 y
- al menos un fluoróforo, cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo, siendo preferiblemente la fluorescencia del propio soporte nutritivo líquido insensible a las variaciones en pH del medio de cultivo y a la introducción de dichos microorganismos en el medio de cultivo.
2. Un medio de cultivo según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho fluoróforo, cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo, se selecciona de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS), un compuesto de cianina o uno de sus derivados, o un compuesto de fluoresceína o uno de sus derivados, sales o ésteres.
3. Un medio de cultivo según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho fluoróforo, cuya fluorescencia varía dependiendo del pH del medio de cultivo, es carboxifluoresceína o una de sus sales o ésteres.
4. Un método para detectar microorganismos en una muestra, caracterizado por que comprende cultivar dicha muestra, para la que se busca determinar si está contaminada por un microorganismo vivo, en un medio de cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un método para detectar microorganismos según la reivindicación 4, caracterizado por que la muestra ensayada es un filtro o una membrana que sirvió de antemano para filtrar un volumen de agua o gas.
6. Un método para detectar uno o varios microorganismos en una muestra, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - (i) colocar dicha muestra en un medio de cultivo que comprende:
 - al menos un sustrato fluorogénico que puede ser activado por al menos una enzima de un microorganismo, en donde el al menos un sustrato fluorogénico es una mezcla de los siguientes compuestos:
 - 1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-glucopiranosido;
 - 1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-galactopiranosido;
 - acetato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo; y
 - fosfato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo
 - y
 - al menos un fluoróforo, cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo, en condiciones que permiten el crecimiento de los microorganismos que se buscan;
 - (ii) analizar dicho medio de cultivo con respecto a la fluorescencia a fin de determinar la fluorescencia relacionada con la activación del sustrato fluorogénico contenido en el medio de cultivo por dicho microorganismo, y determinar la fluorescencia emitida por el fluoróforo cuya fluorescencia es indicativa del pH del medio de cultivo,
 - (iii) analizar las medidas de fluorescencia determinadas para el fluoróforo cuya fluorescencia es indicativa del pH, así como para el sustrato fluorogénico, para determinar la presencia o ausencia del tipo o tipos de microorganismo(s) buscado(s) en el medio de cultivo.
7. Un método según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho medio de cultivo es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. Un método para detectar microorganismos según la reivindicación 6 o 7, caracterizado por que en la etapa i),

dicho microorganismo es filtrado de antemano en una membrana antes de ser puesto en cultivo.

9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que en la etapa ii) la fluorescencia se mide a intervalos regulares para obtener una variación en fluorescencia en función del tiempo.

5 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que en la etapa iii) las medidas de fluorescencia se comparan con medidas estándar referenciadas en una base de datos.

11. Un kit para detectar microorganismos, caracterizado por que comprende:

- un medio de cultivo para microorganismos;

- al menos un sustrato fluorogénico soluble en dicho medio de cultivo, en donde el al menos un sustrato fluorogénico es una mezcla de los siguientes compuestos:

10 -1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-glucopiranosido;

-1-(2-benzoilfenil)-6-cloro-1H-indol-3-il-beta-galactopiranosido;

acetato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo; y

fosfato de (1-[2-(2,4-dimetoxibenzoil)fenil]-1H-indol-3-ilo,

15 - al menos un fluoróforo, soluble en dicho medio de cultivo, cuya fluorescencia es indicativa del pH de dicho medio de cultivo.

12. Un kit de detección según la reivindicación 11, caracterizado por que el medio de cultivo está envasado en forma deshidratada.

Fig. 1A

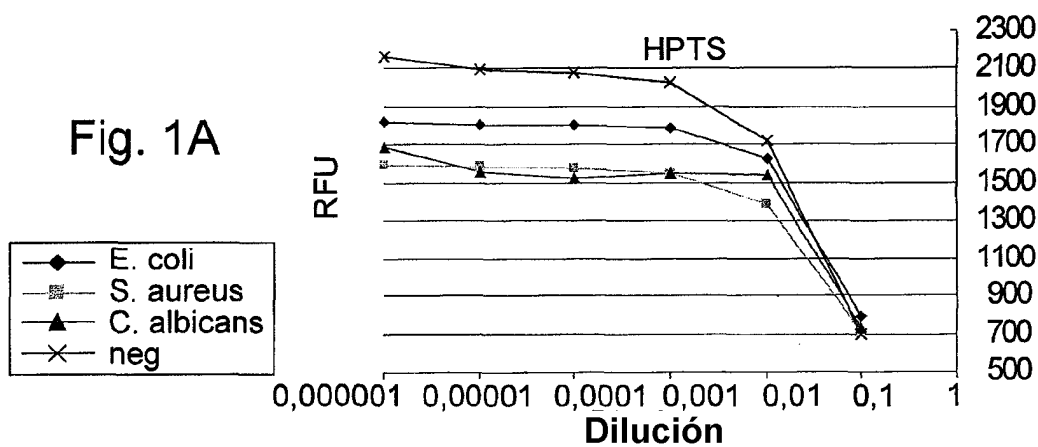


Fig. 1B

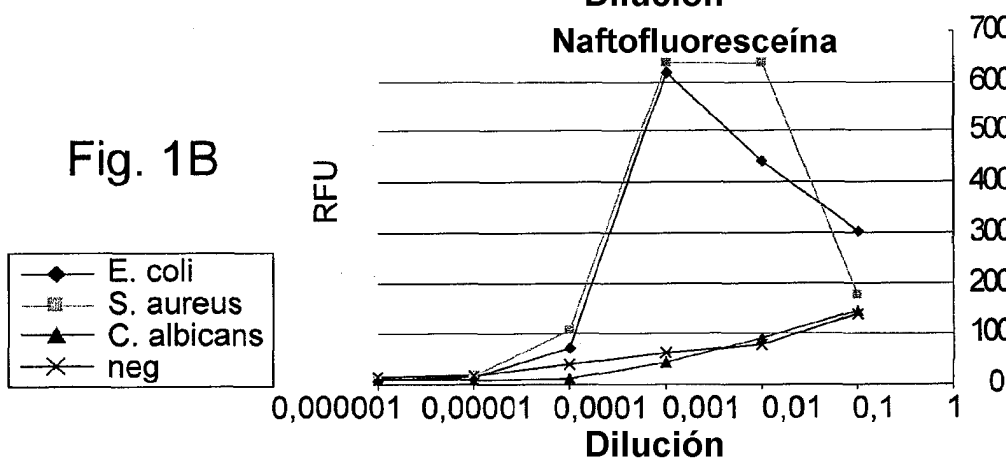


Fig. 1C

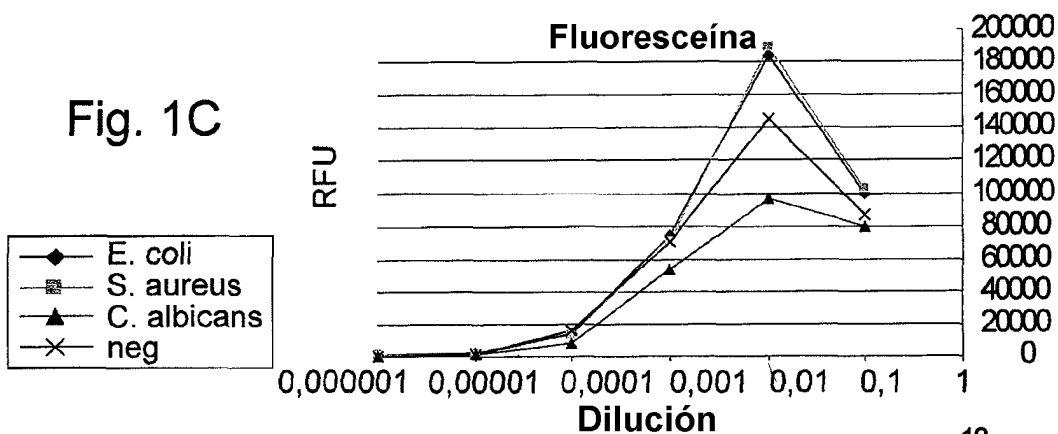


Fig. 1D

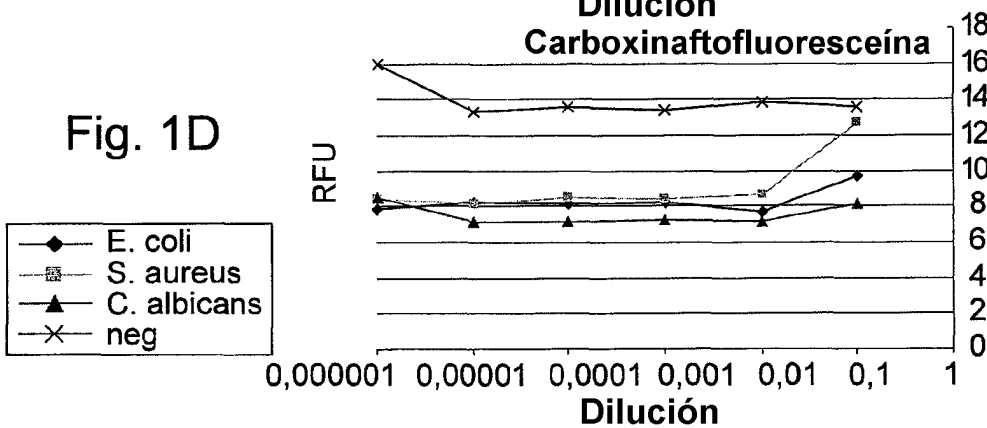
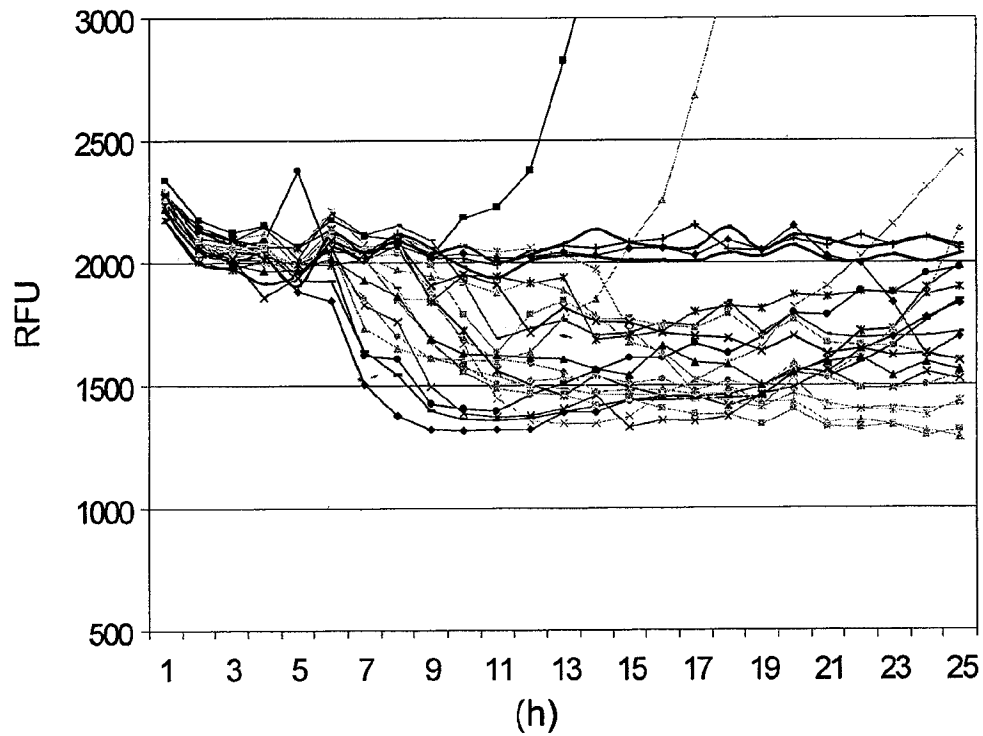


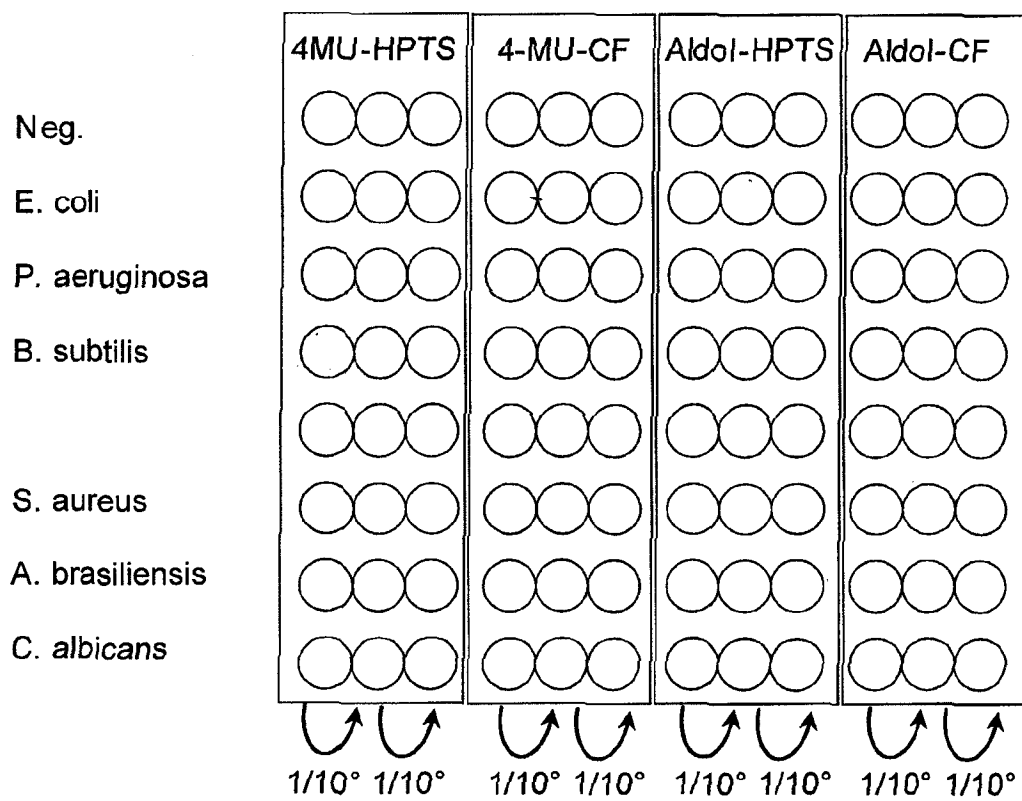
Fig. 2

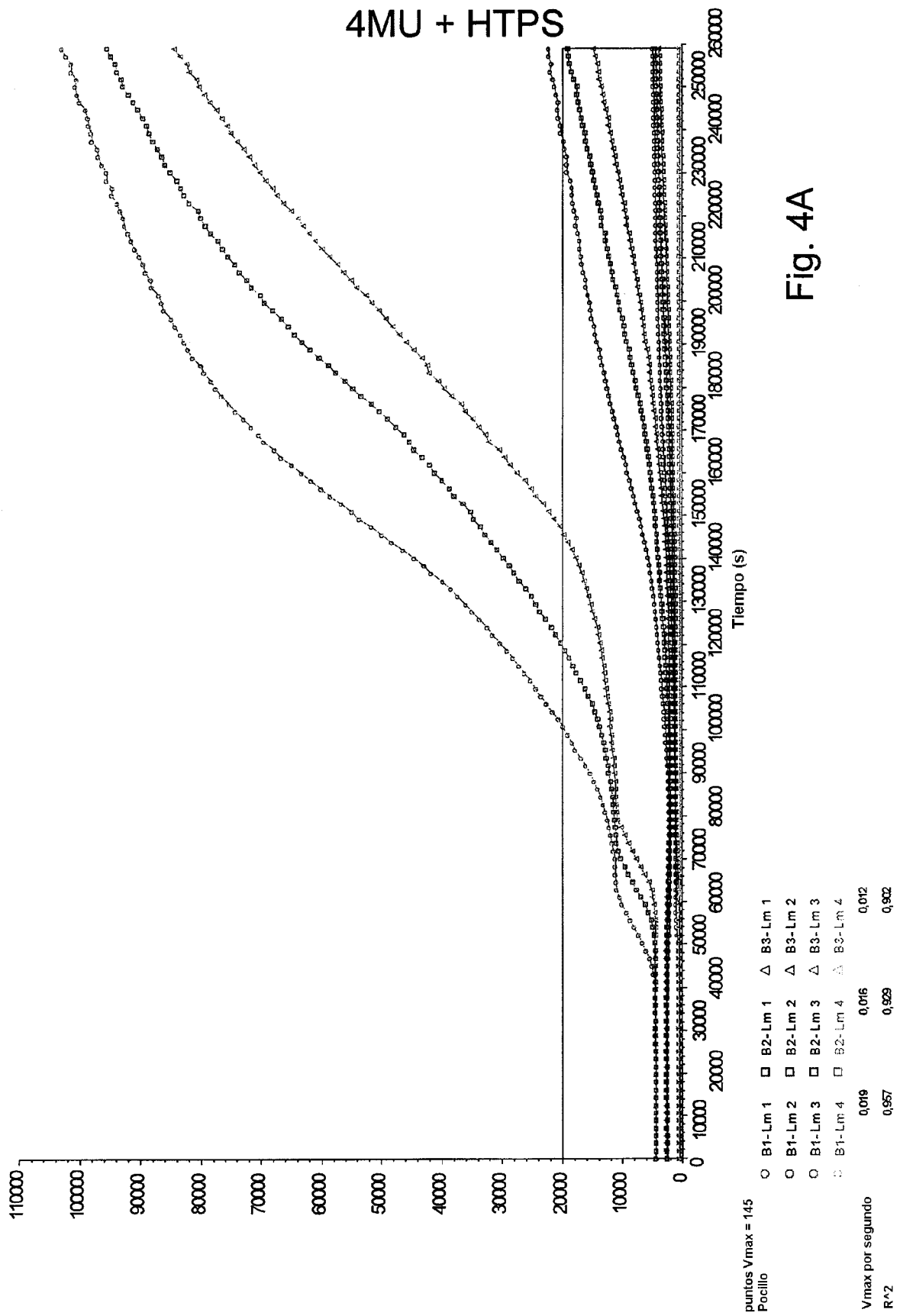
HPTS



- ◆ E. coli
- P. aeruginosa
- △ S. enterica
- × B. oepacia
- * Y. enterocolitica
- P. mirabilis
- + A. lwoffii
- M. luteus
- ◇ B. subtilis
- S. aureus
- ▲ S. epidermidis
- ✕ S. agalactiae
- ✱ E. faecium
- B. thuringensis
- neg
- C. albicans
- R. minuta
- ◆ C. neoformans
- ◇ C. dudosporoides
- ▲ Cryptococcus wt
- ✕ Candida wt
- * S. cerevisiae

Fig. 3





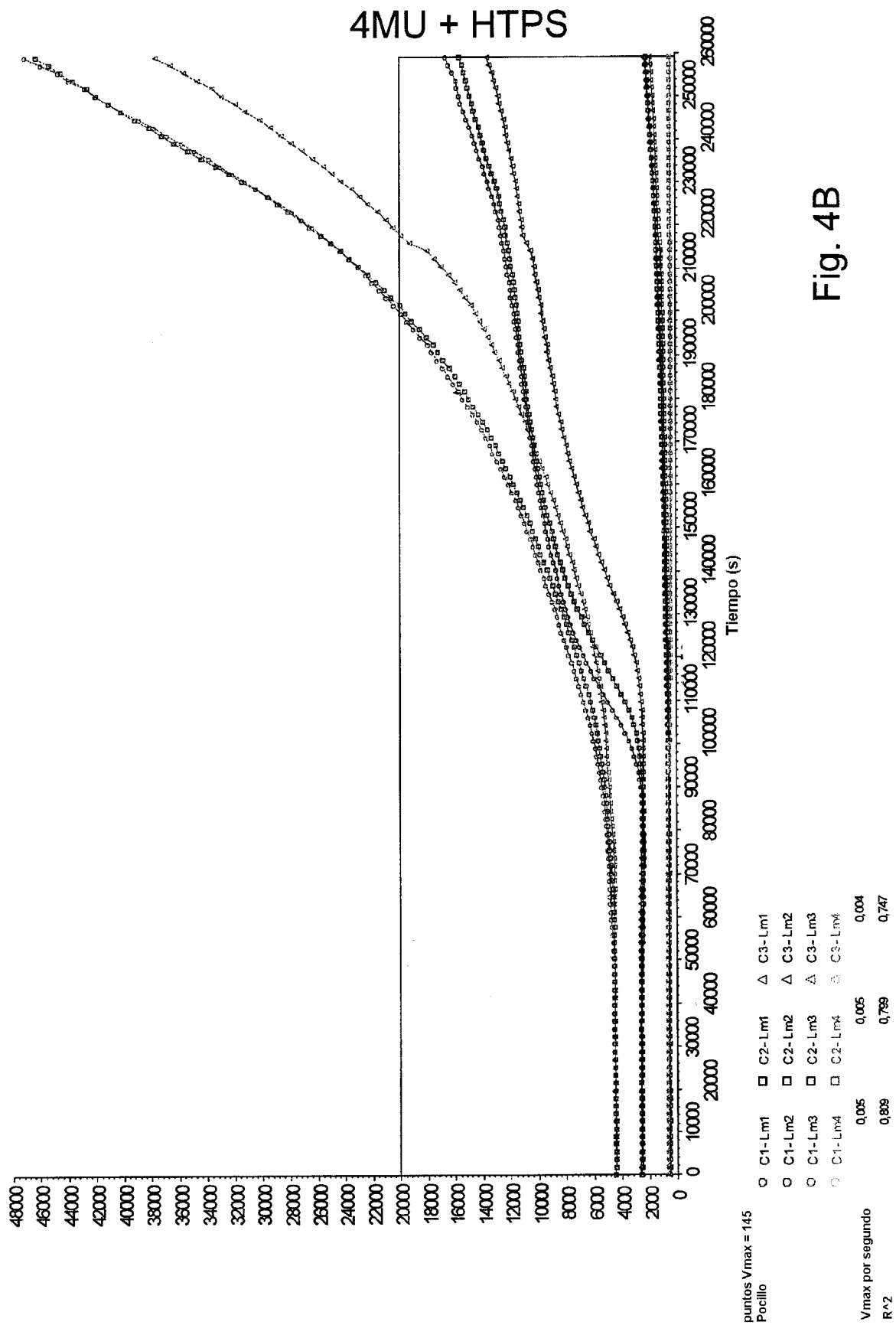


Fig. 4B

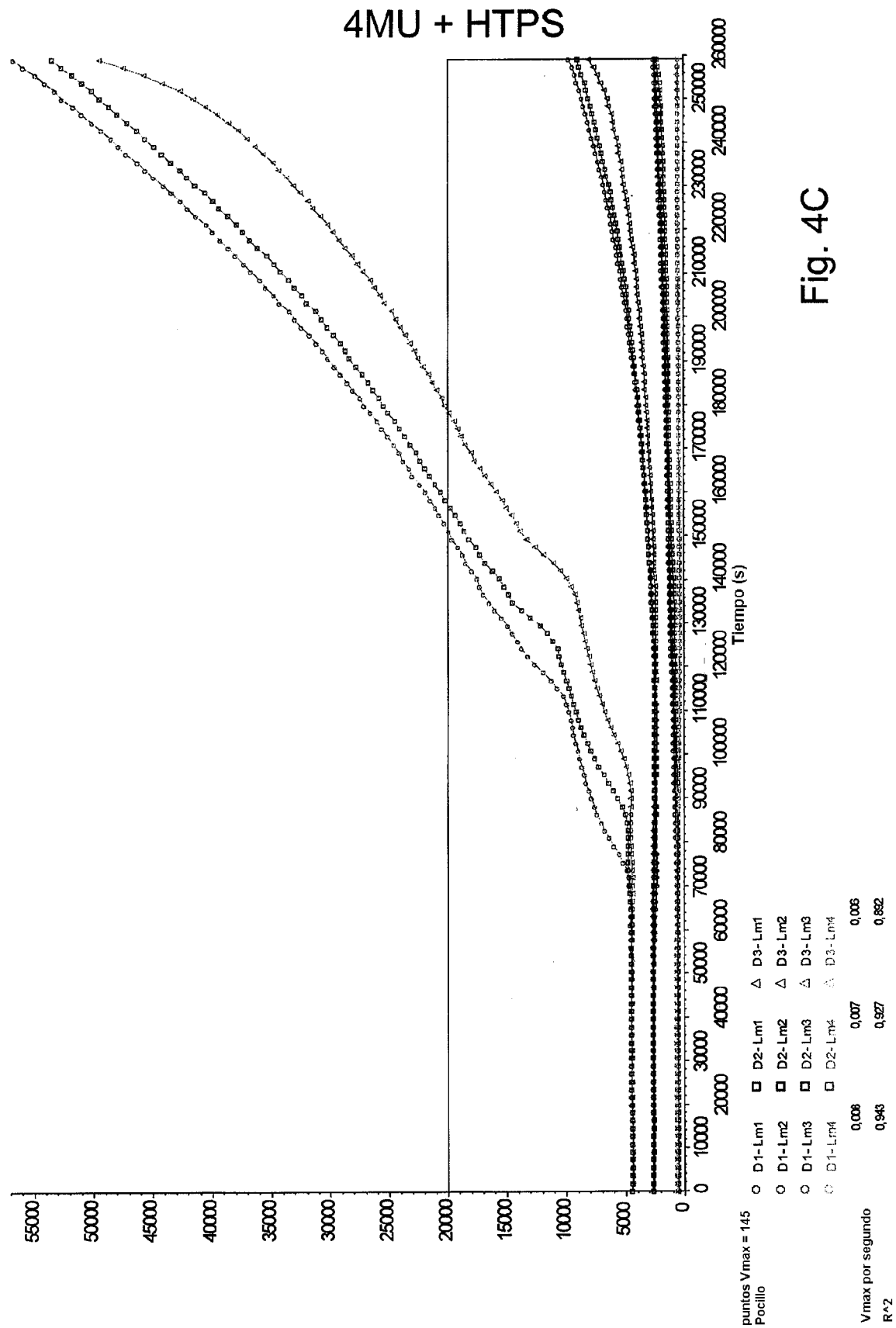


Fig. 4C

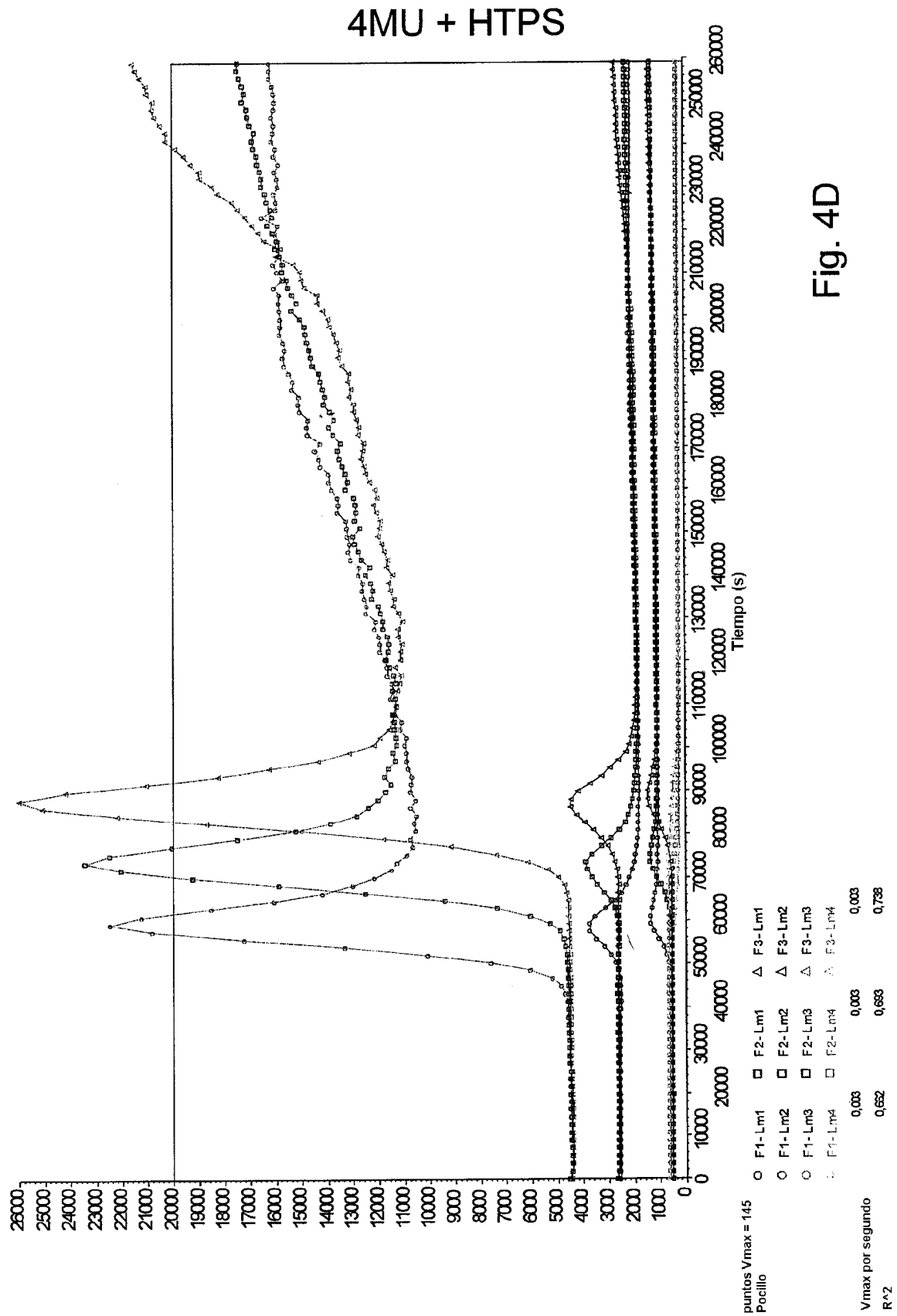
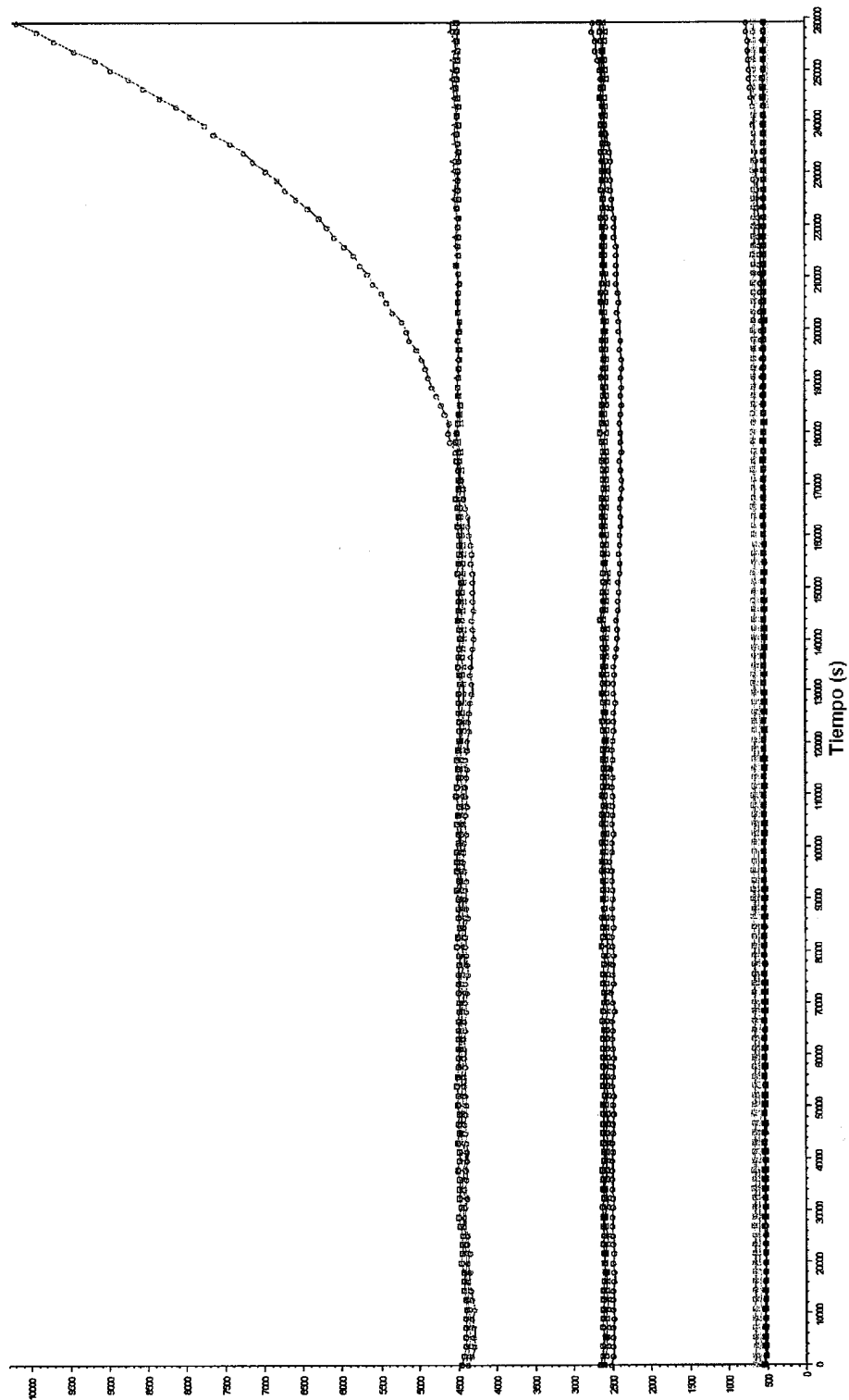


Fig. 4D

4MU + HTPS



puntos Vmax = 145
 Pocillo

○ G1-Lm1	□ G2-Lm1	△ G3-Lm1
○ G1-Lm2	□ G2-Lm2	△ G3-Lm2
○ G1-Lm3	□ G2-Lm3	△ G3-Lm3
○ G1-Lm4	□ G2-Lm4	△ G3-Lm4

Vmax por segundo	0,001	0,000	0,000
R ²	0,537	0,253	0,487

Fig. 4E

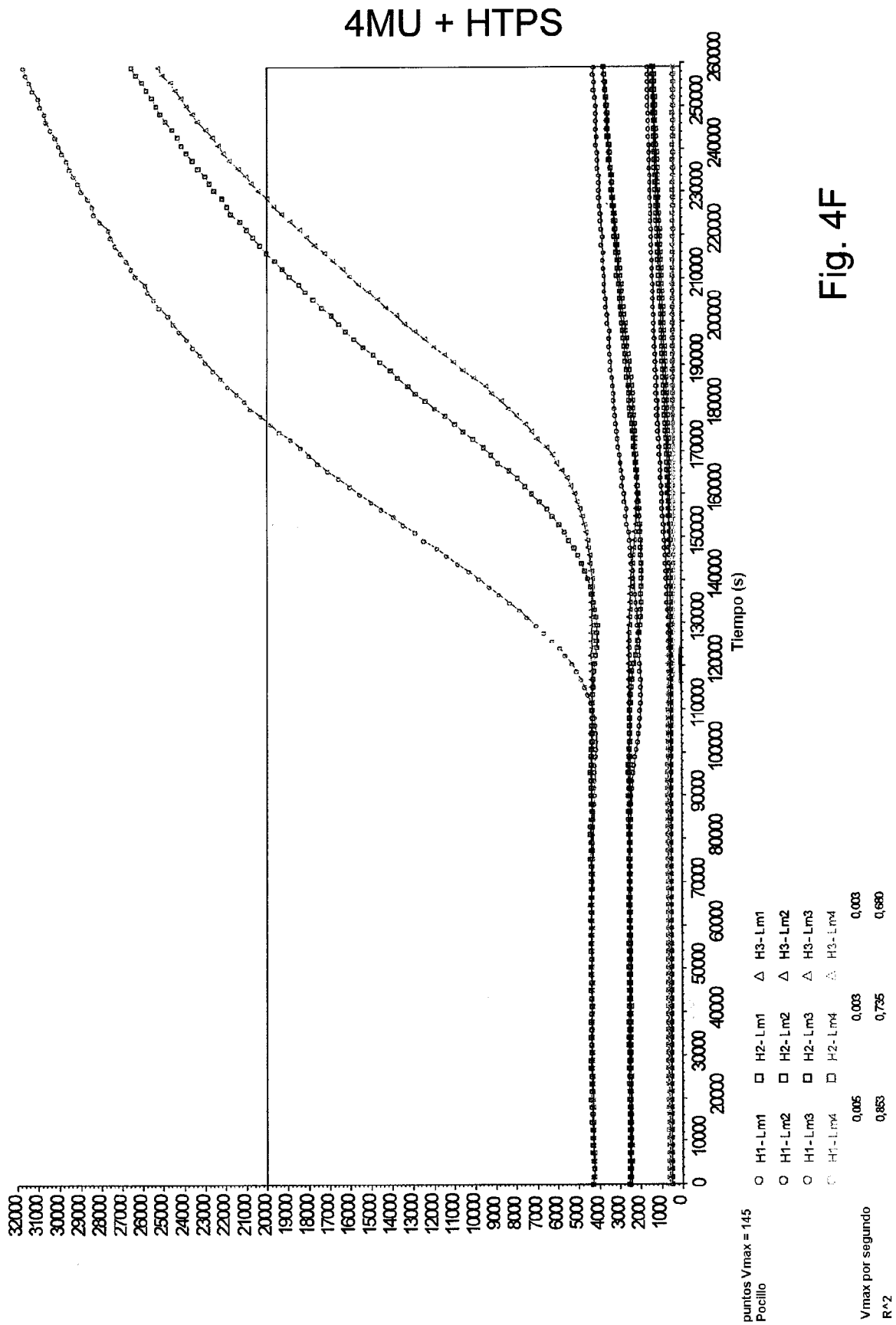


Fig. 4F

4MU + HTPS

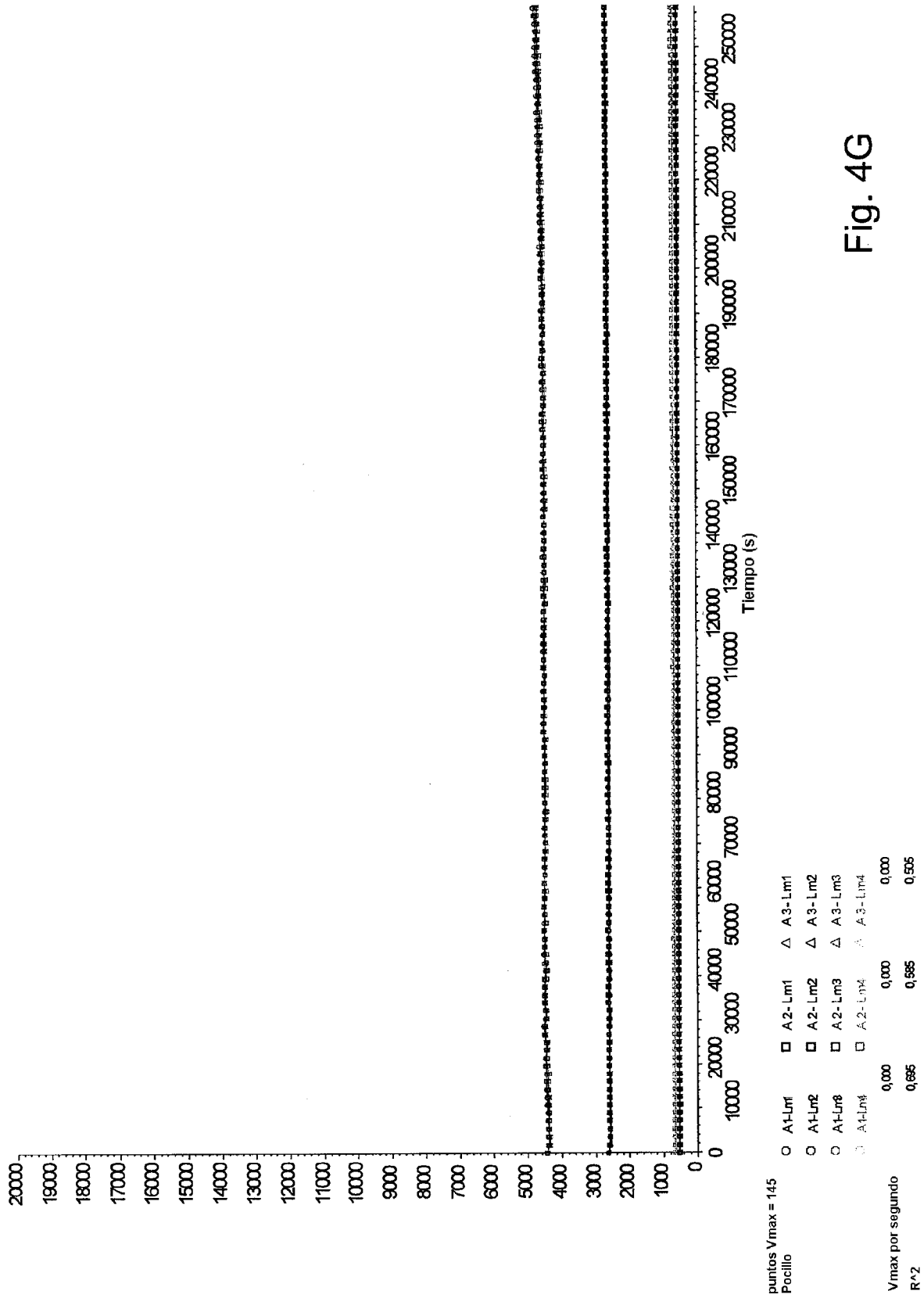
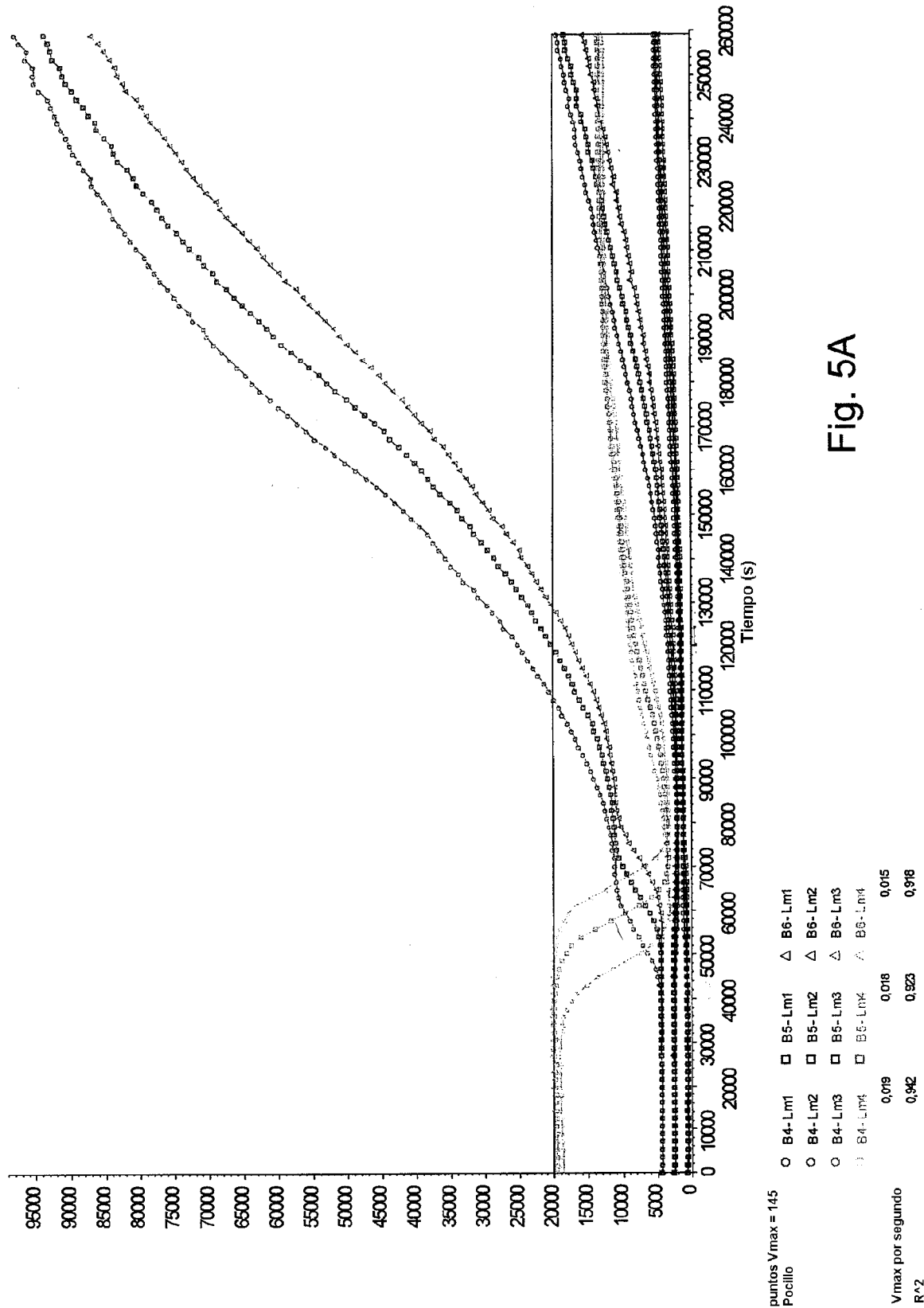


Fig. 4G

4MU + CF



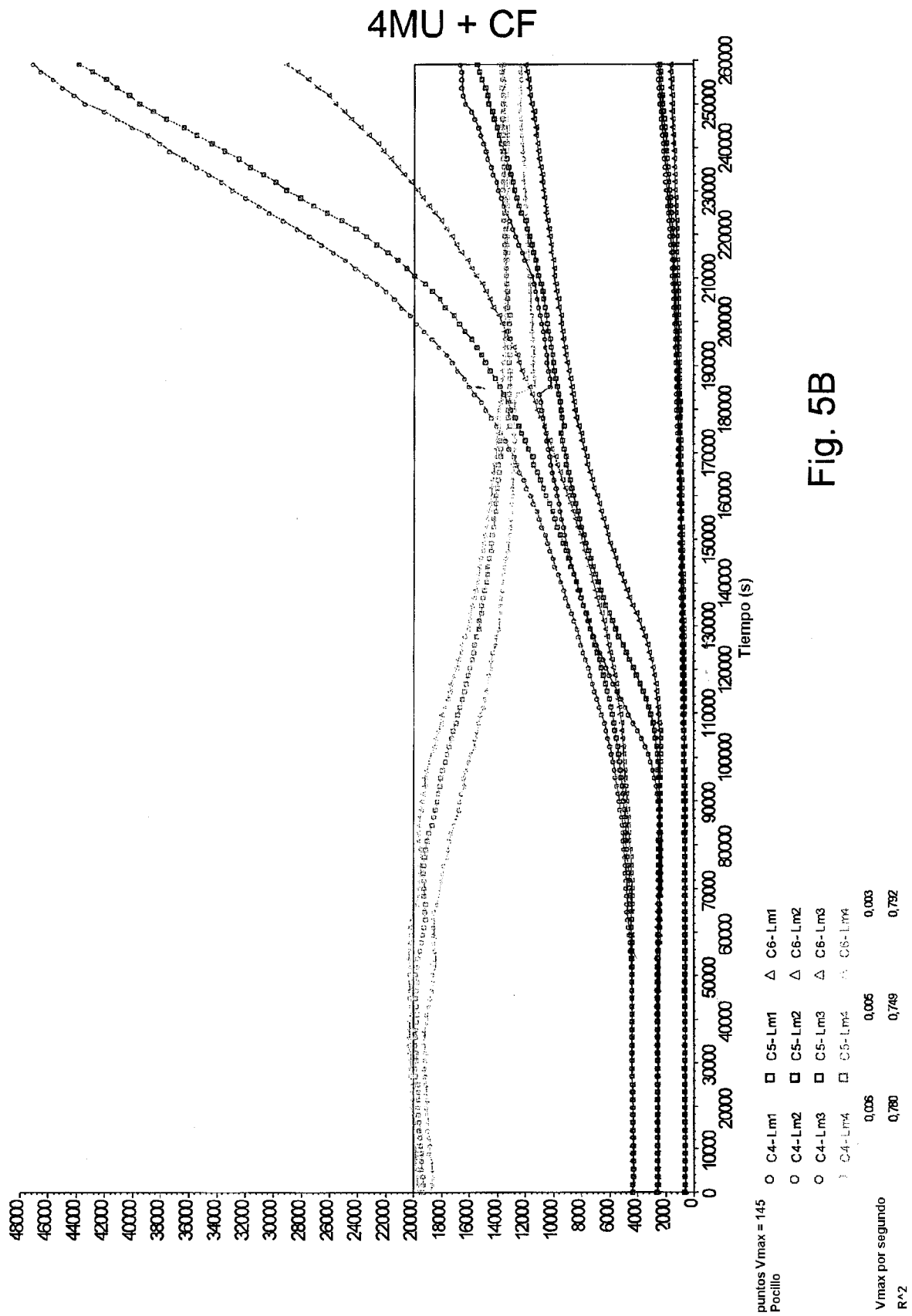


Fig. 5B

4MU + CF

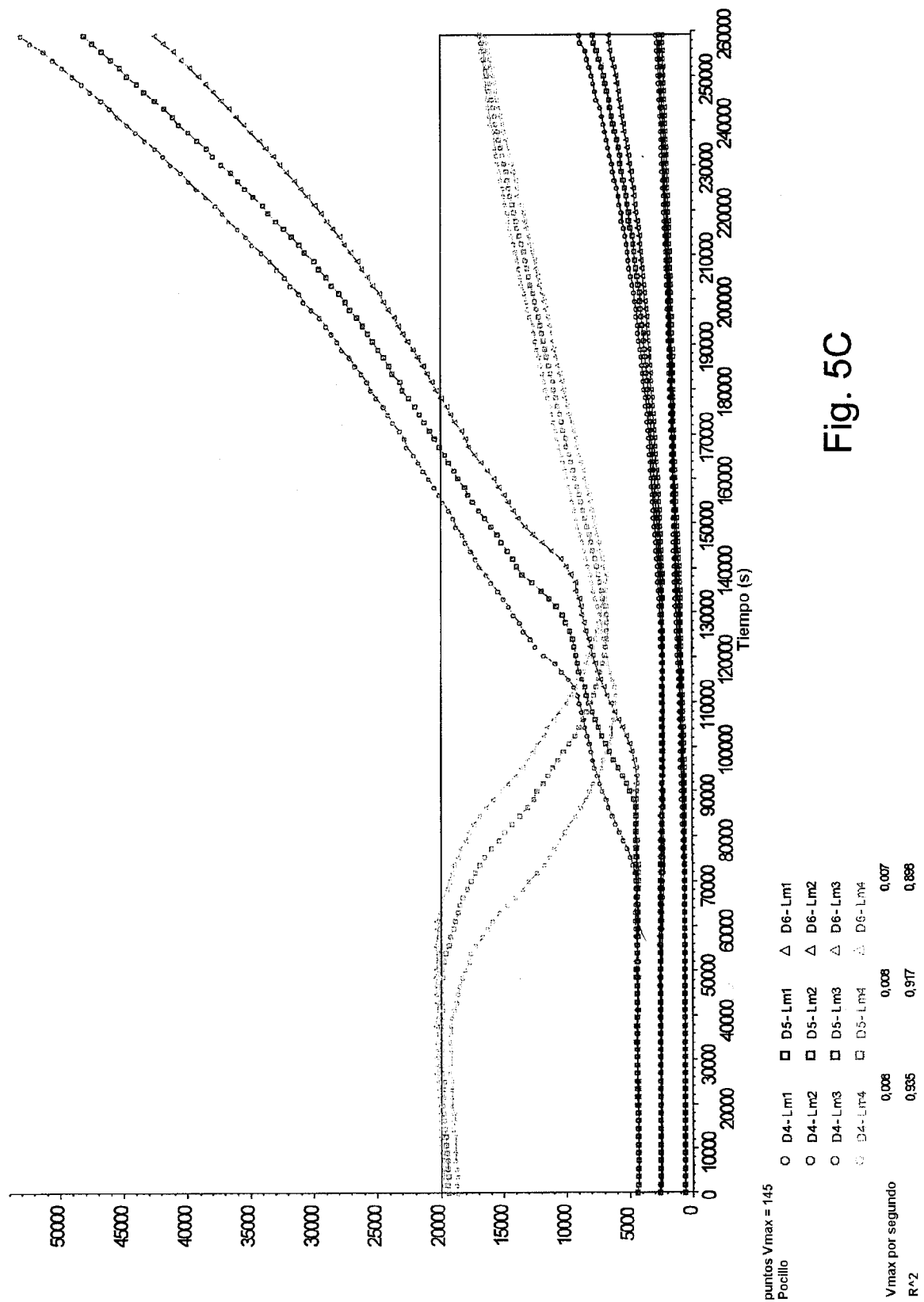


Fig. 5C

4MU + CF

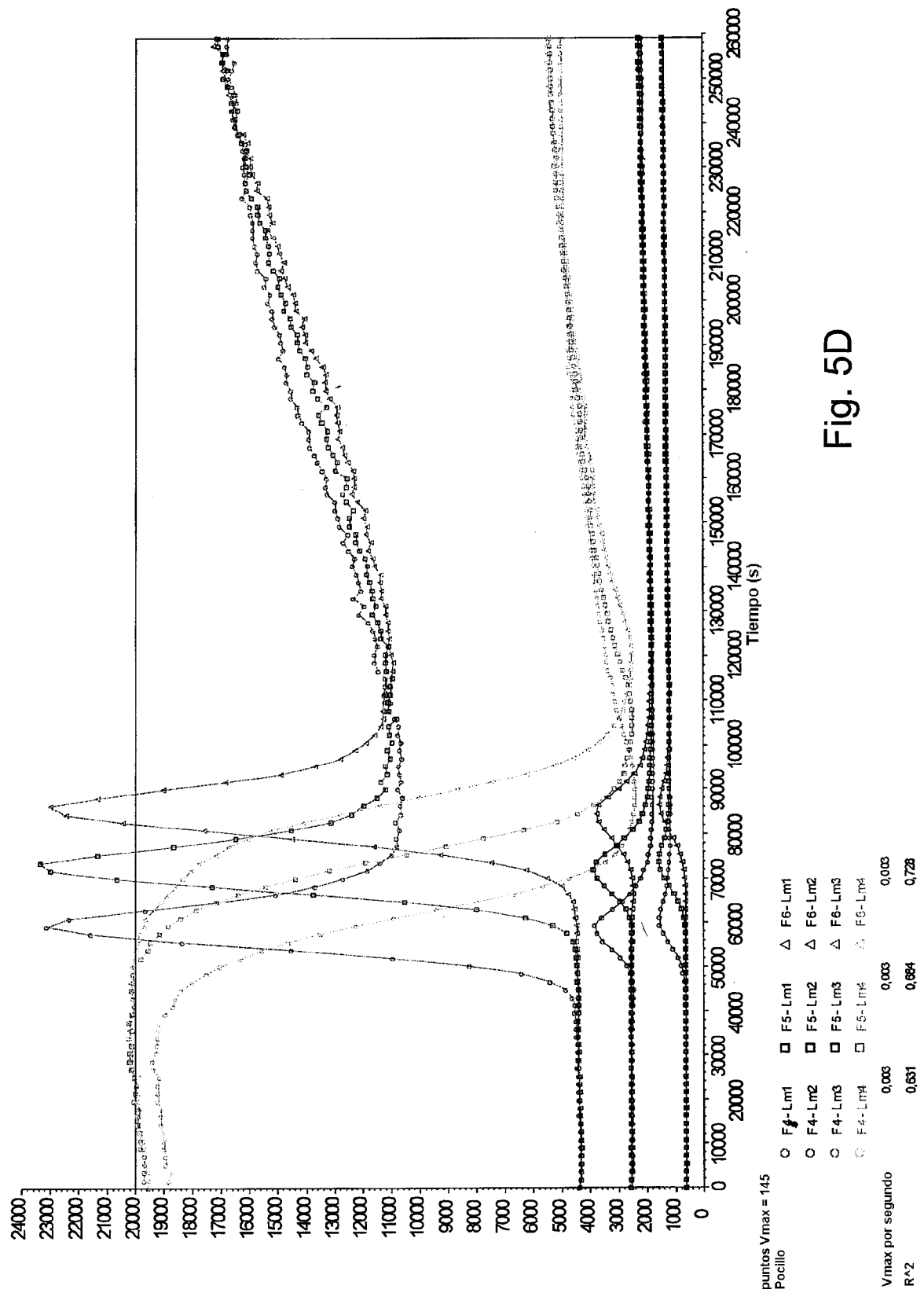
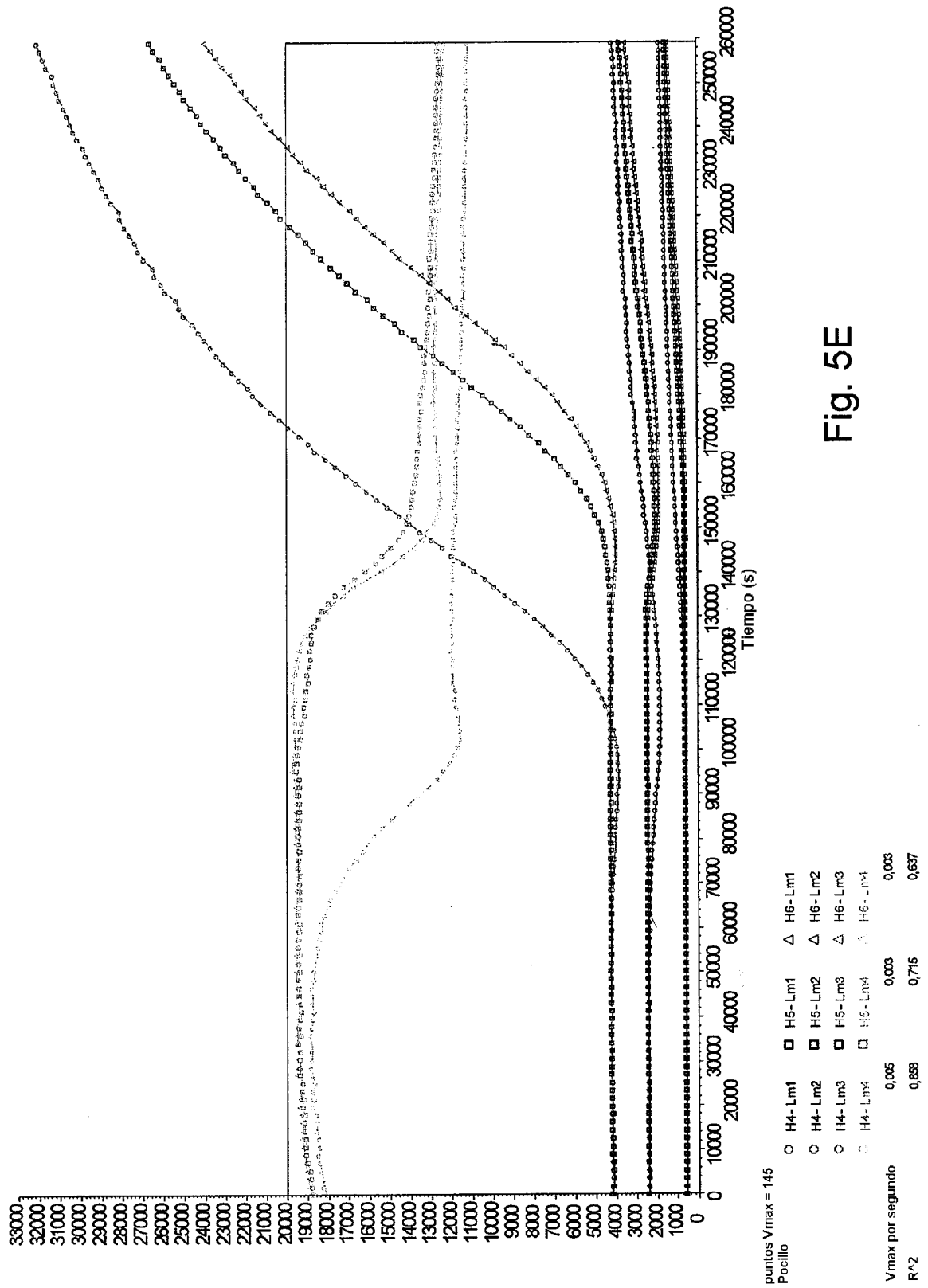
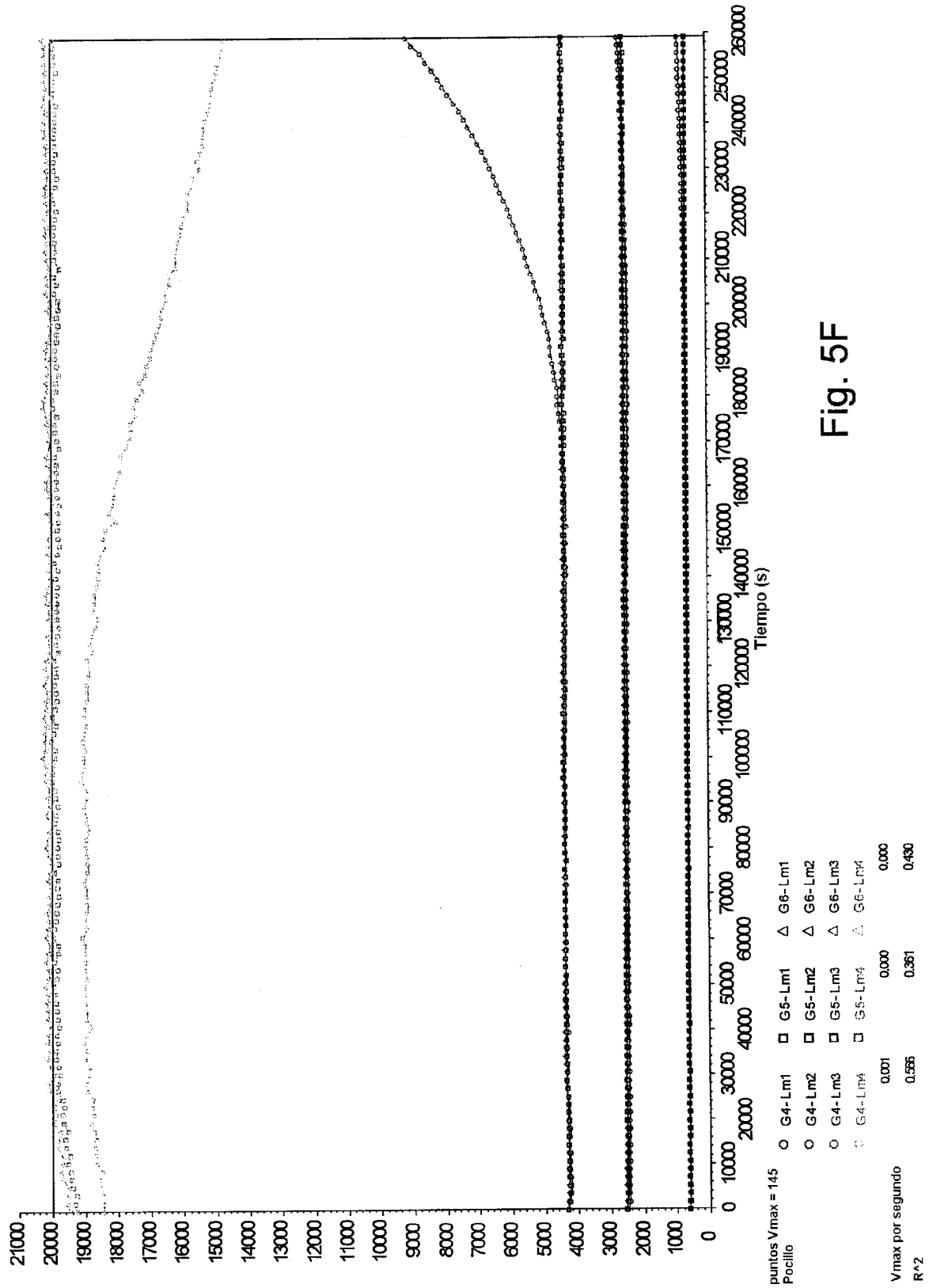


Fig. 5D

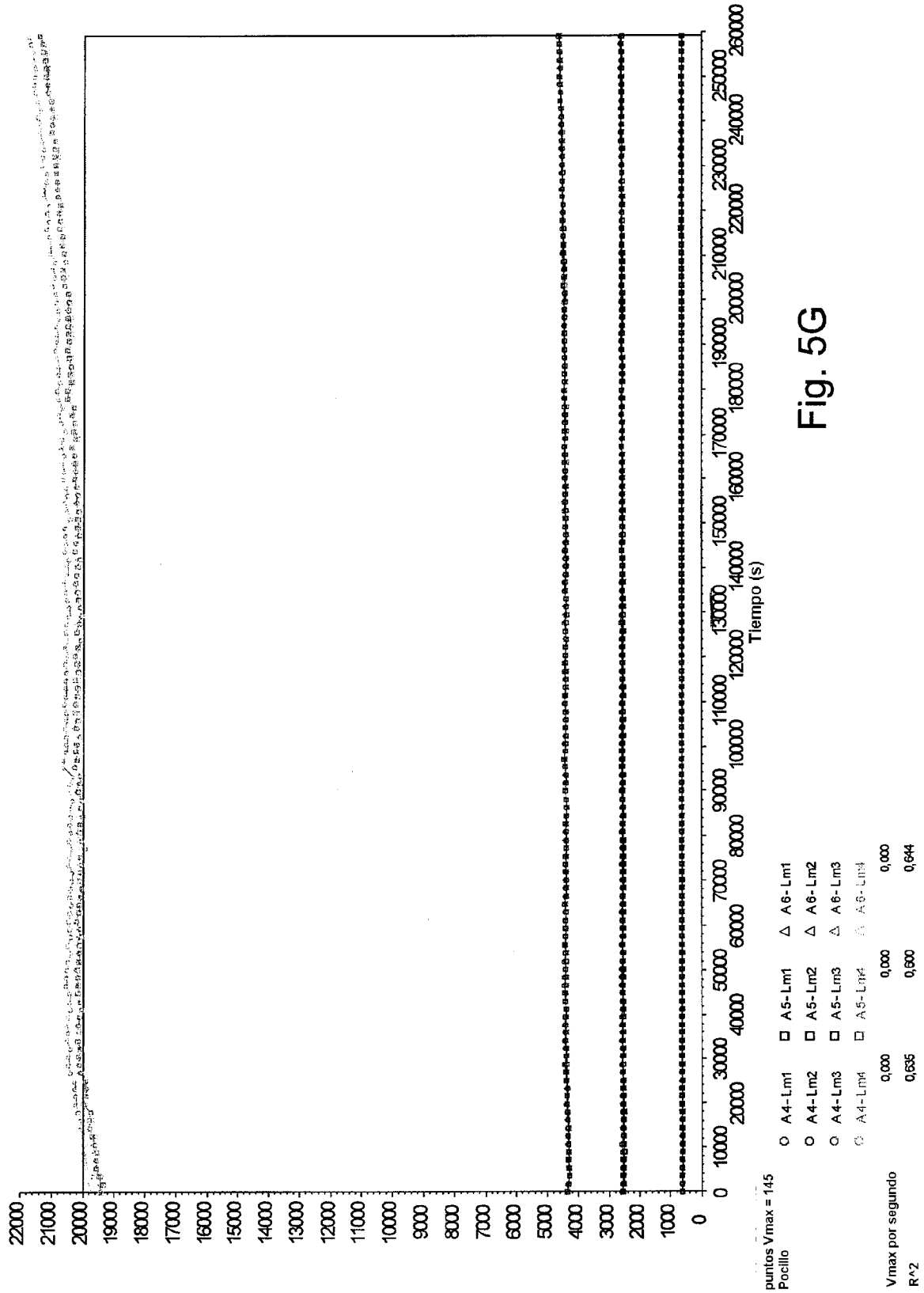
4MU + CF



4MU + CF



4MU + CF



ALDOL + HTPS

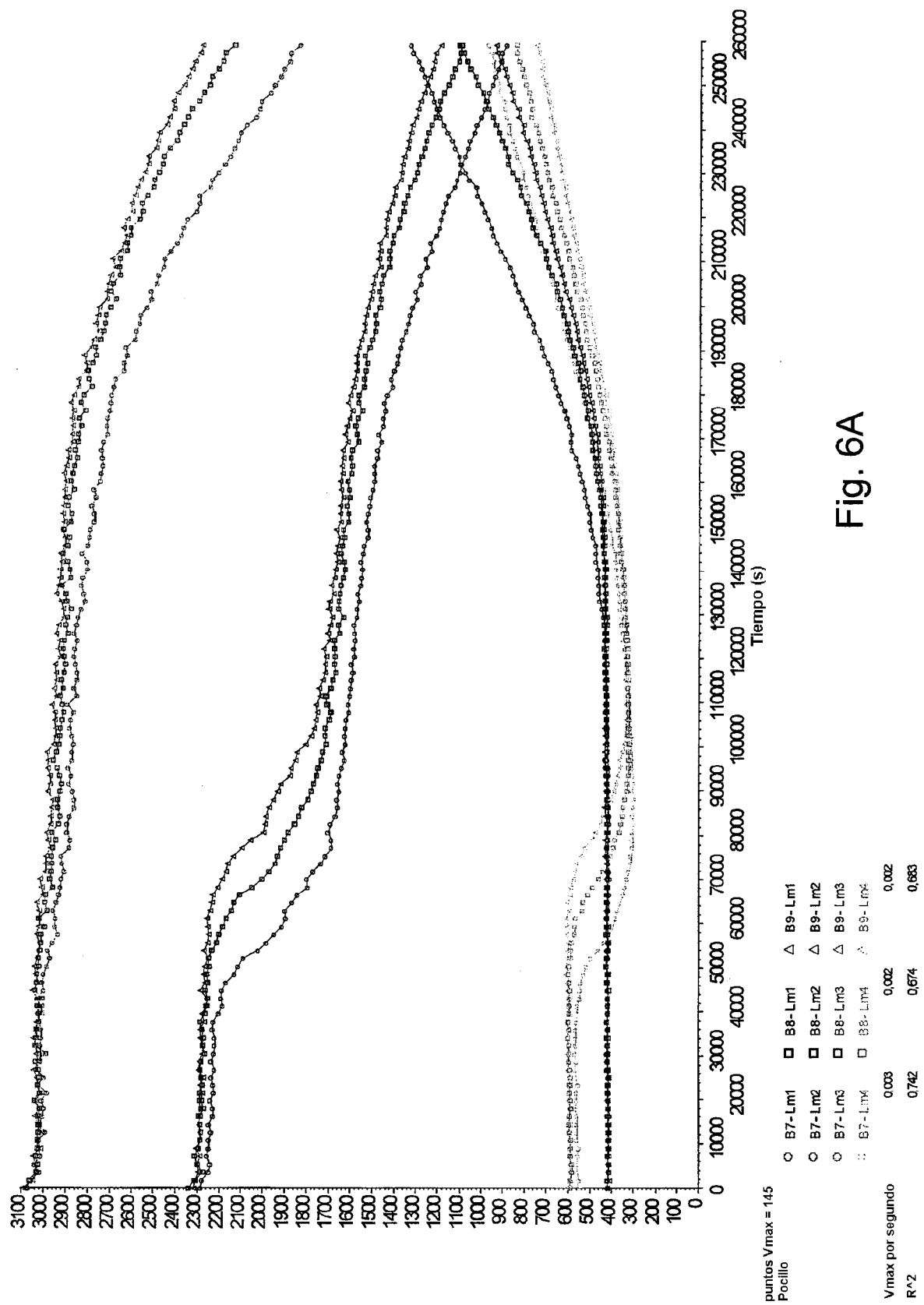
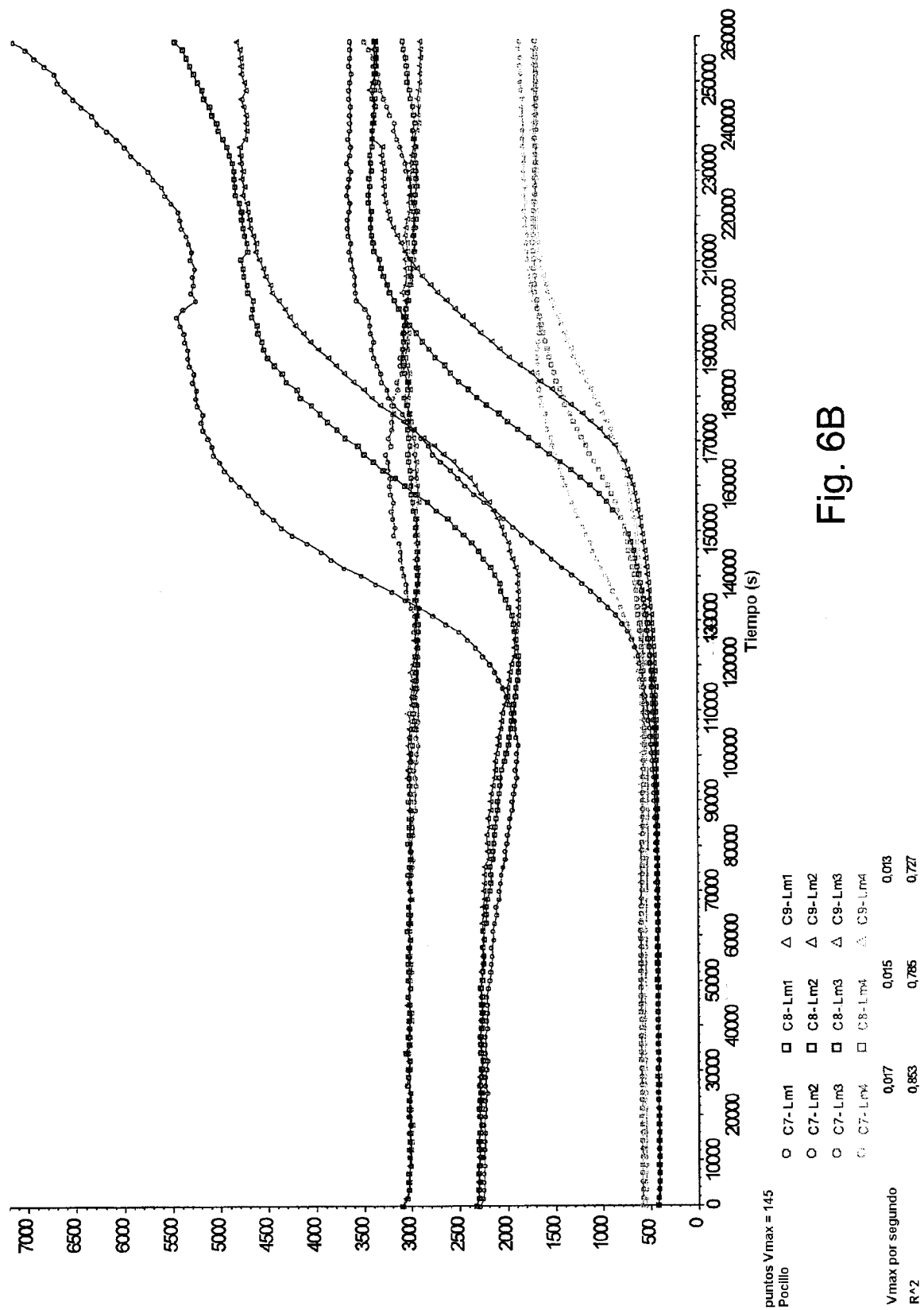
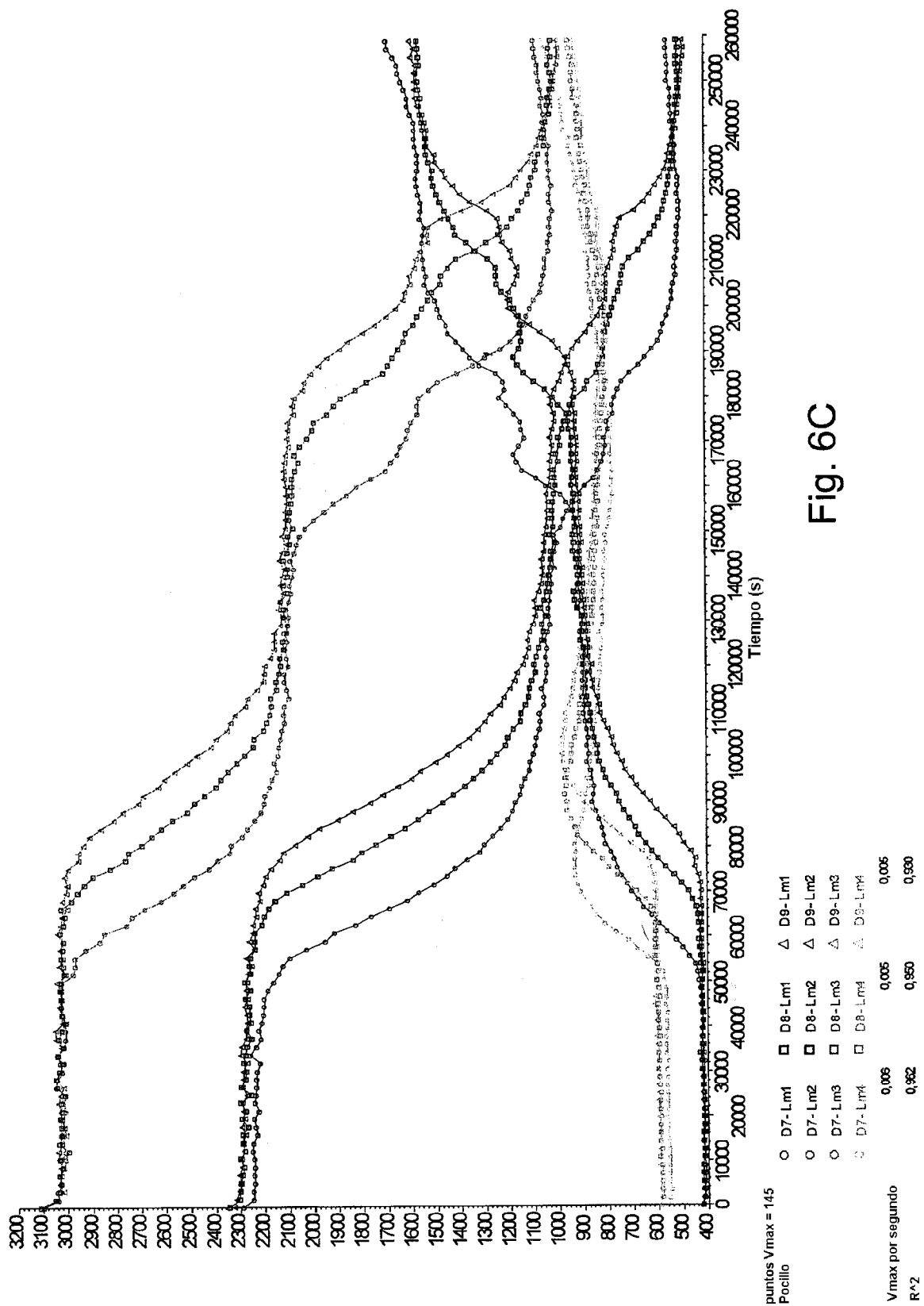


Fig. 6A

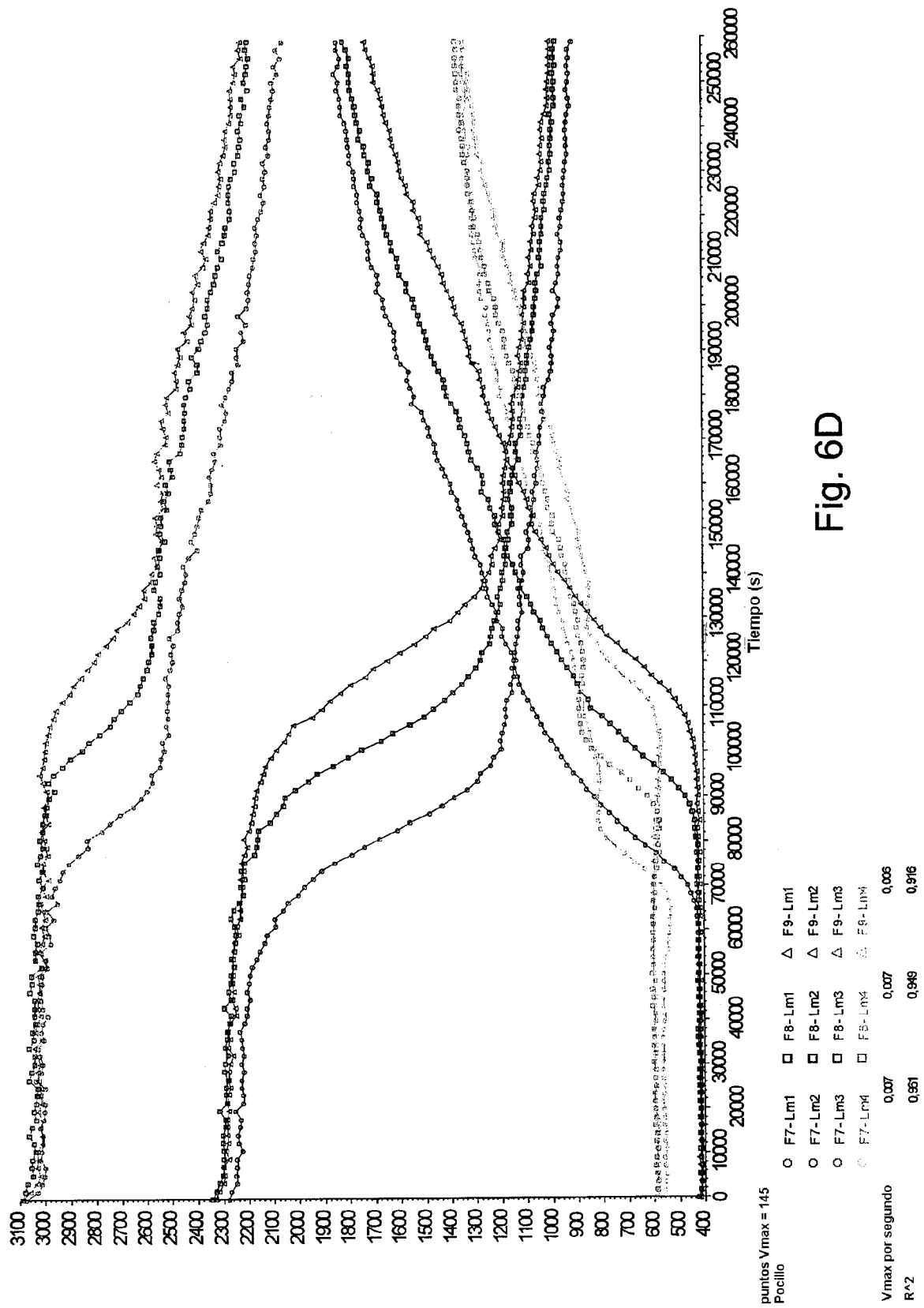
ALDOL + HTPS



ALDOL + HTPS



ALDOL + HTPS



ALDOL + HTPS

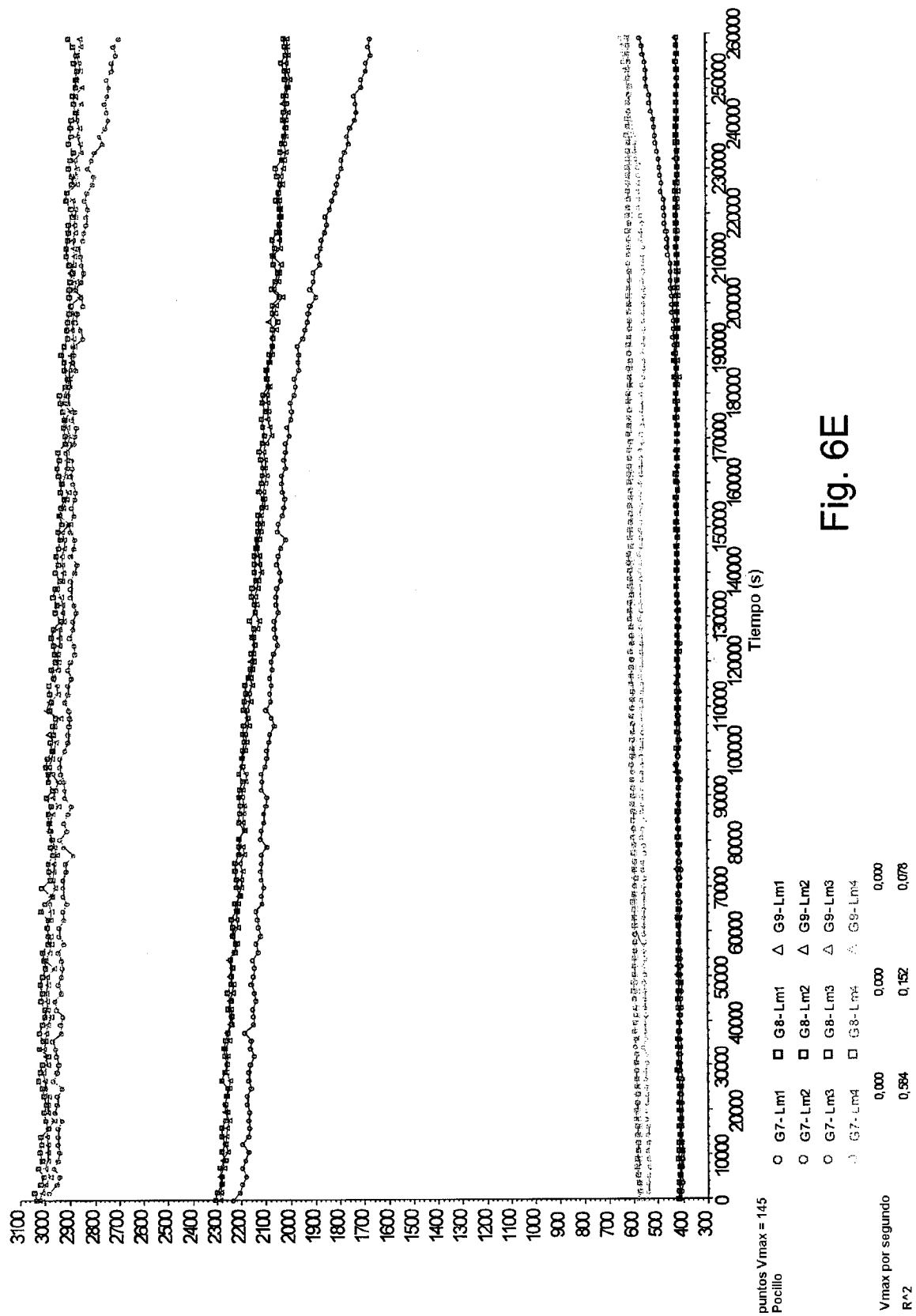
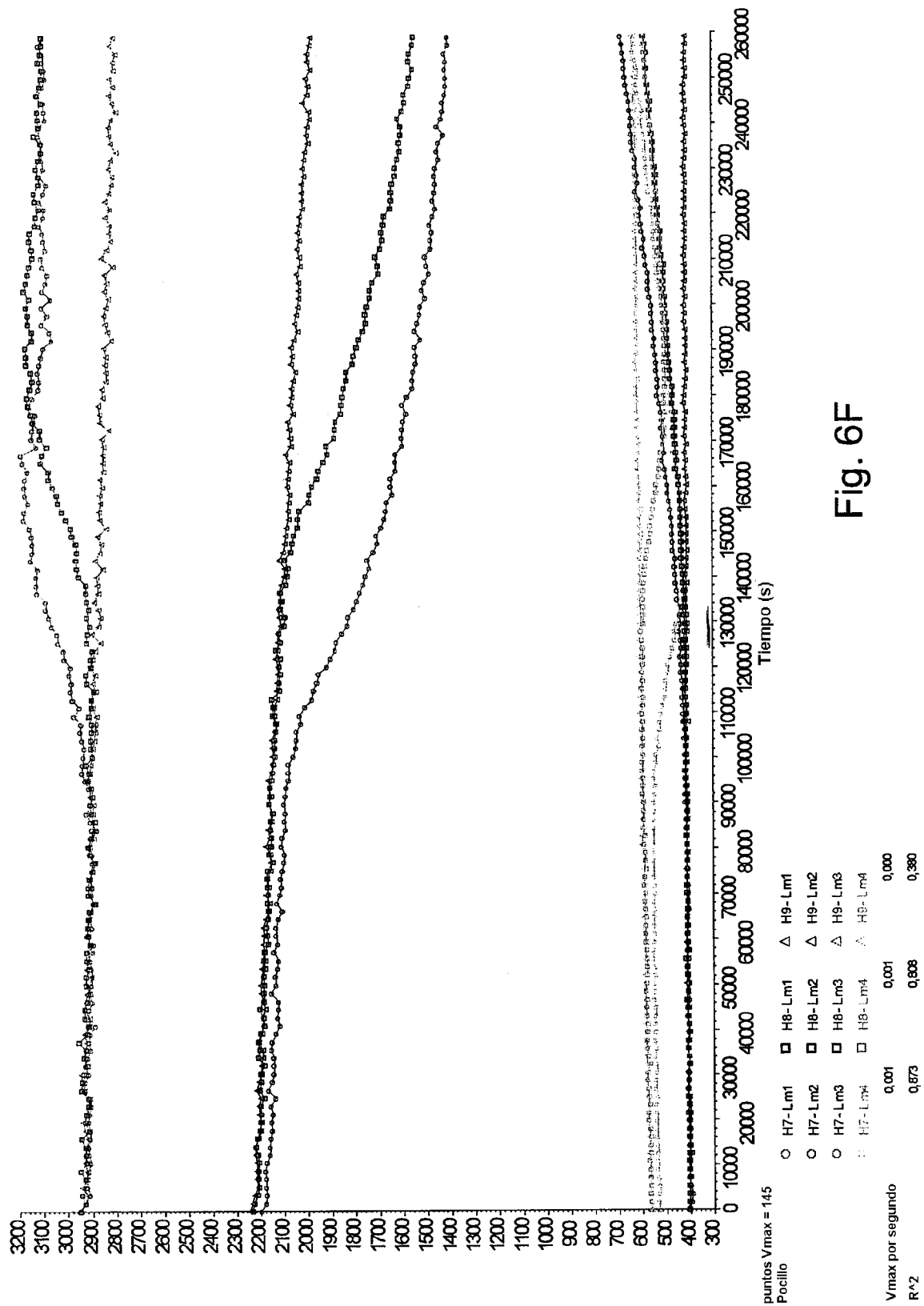


Fig. 6E

ALDOL + HTPS



ALDOL + HTPS

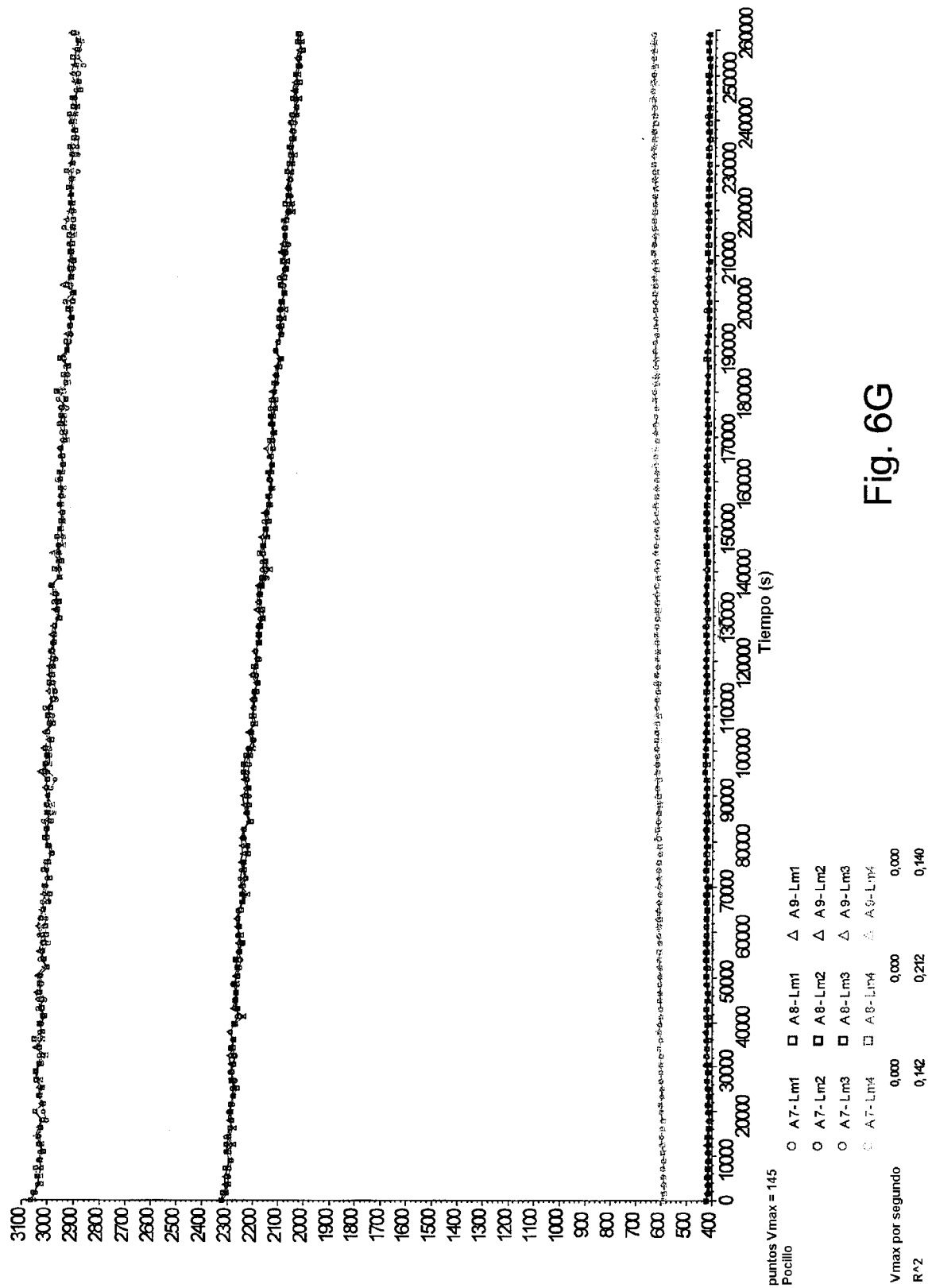


Fig. 6G

ALDOL + CF

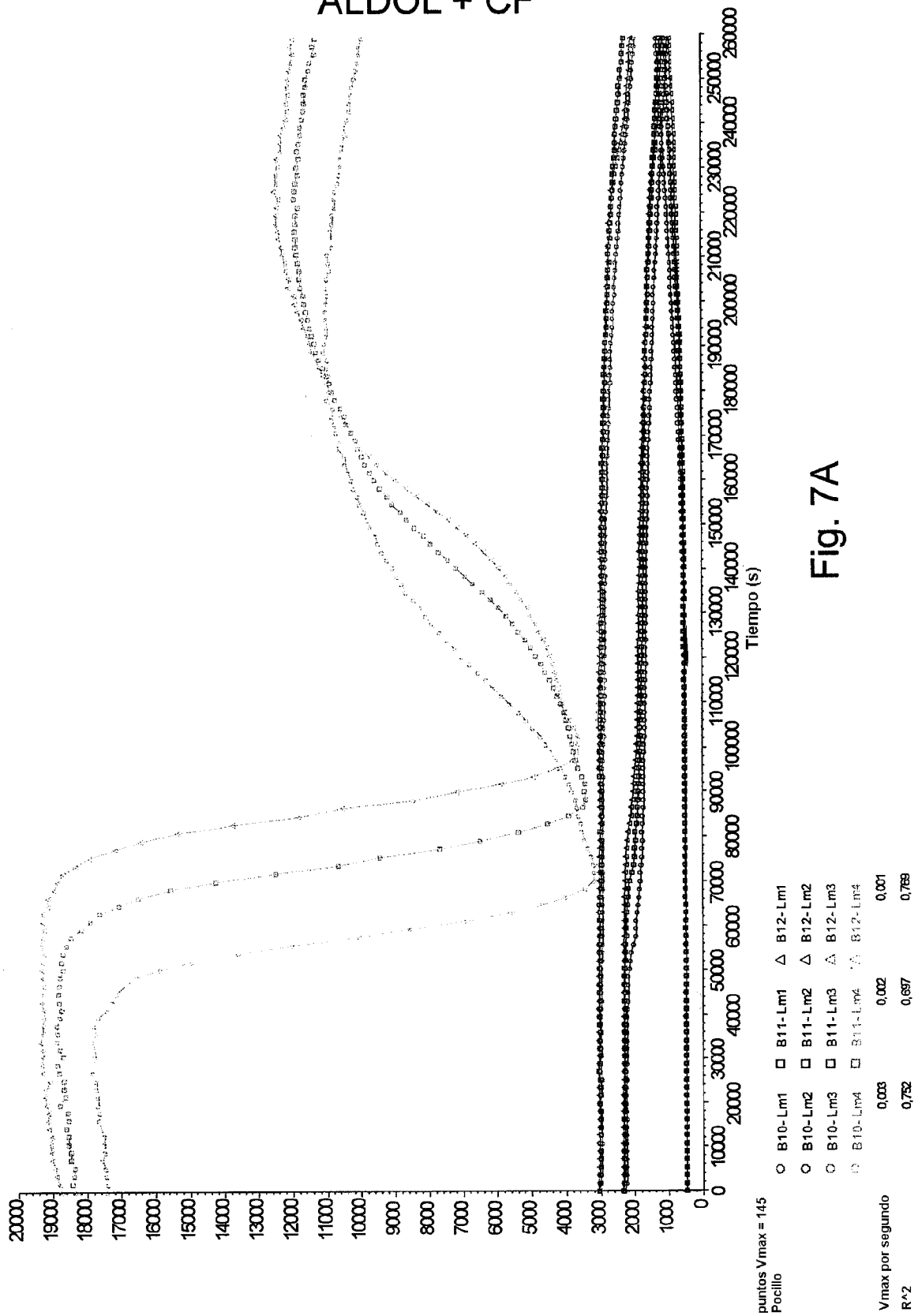
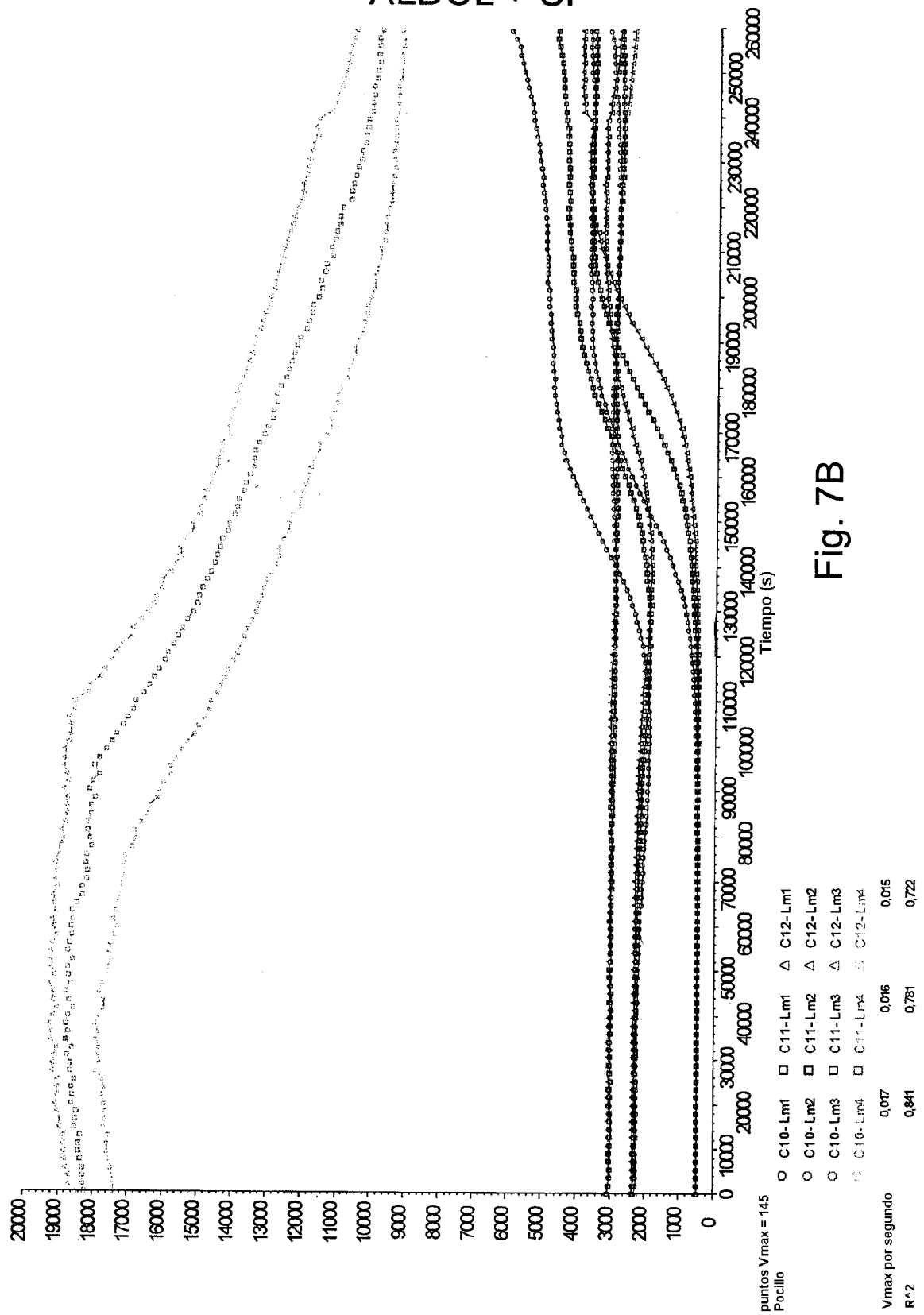


Fig. 7A

ALDOL + CF



ALDOL + CF

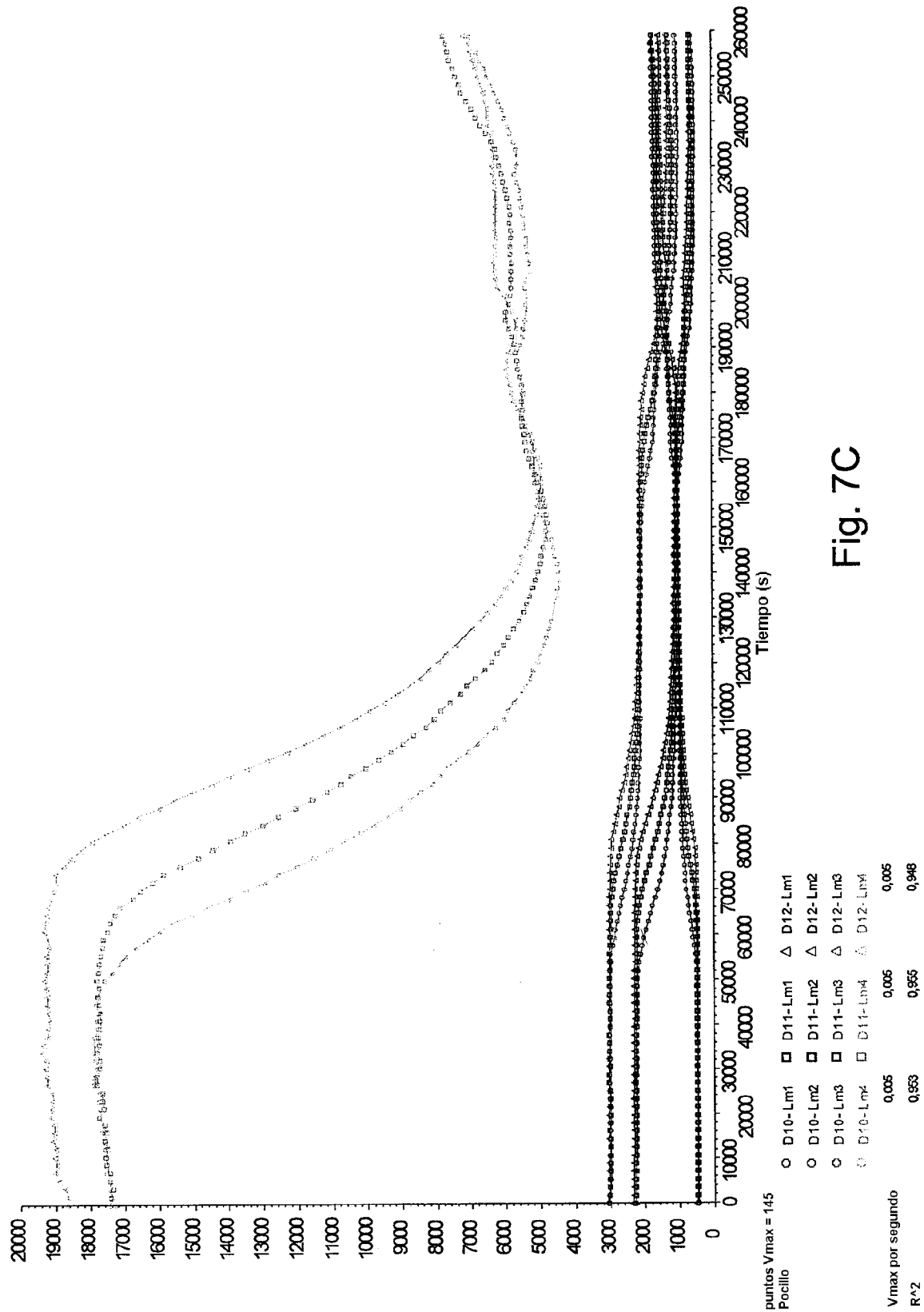


Fig. 7C

ALDOL + CF

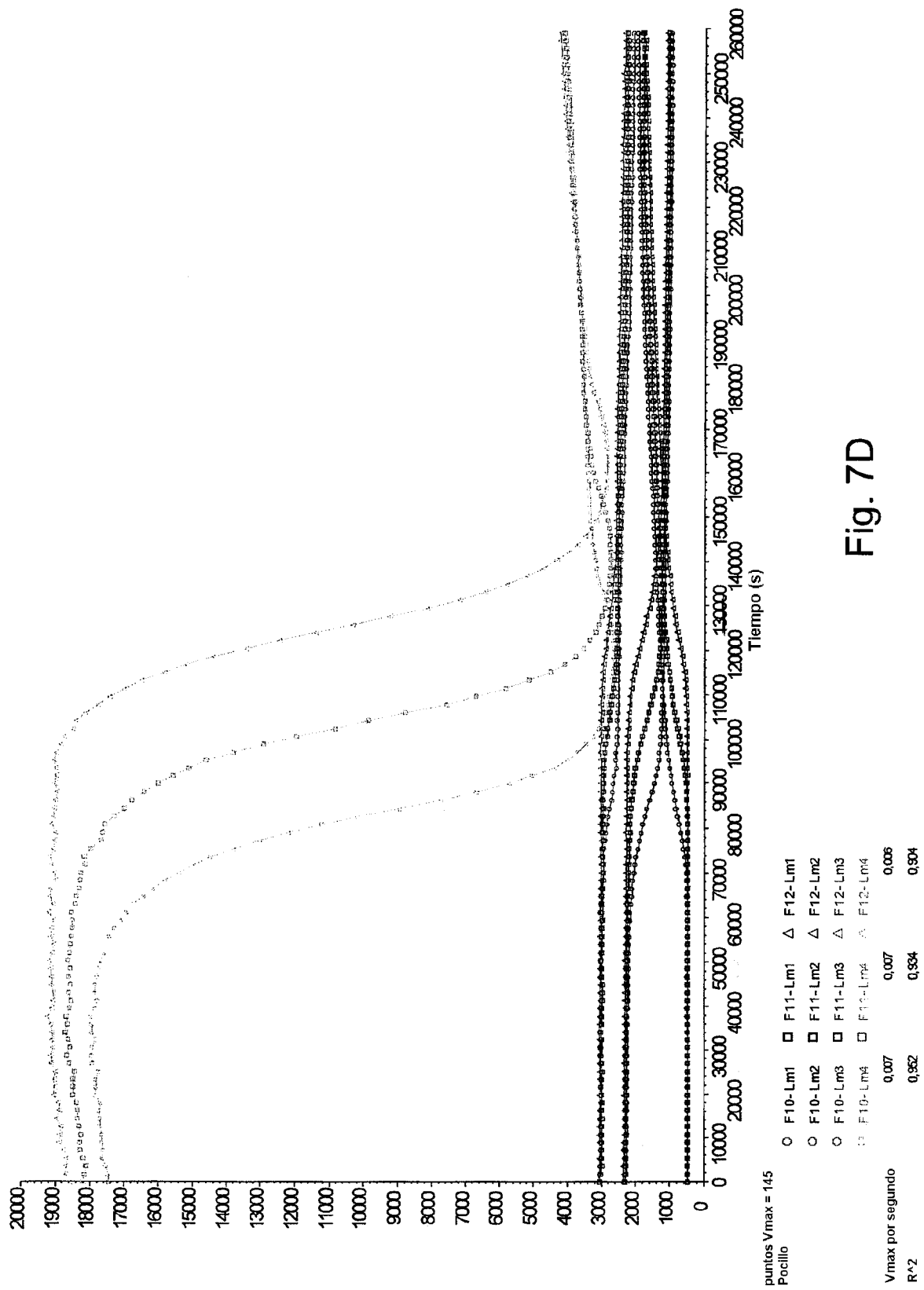


Fig. 7D

ALDOL + CF

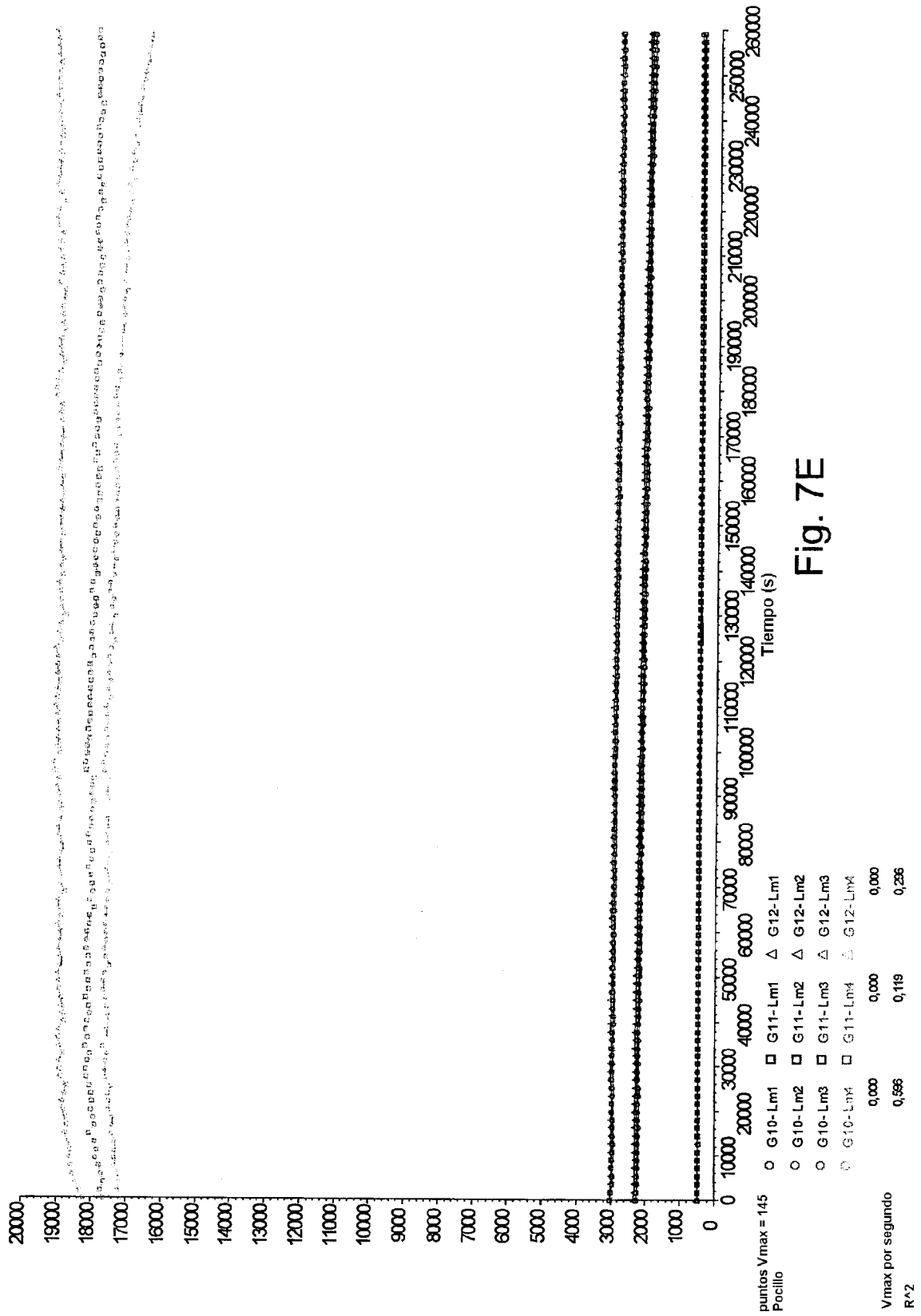
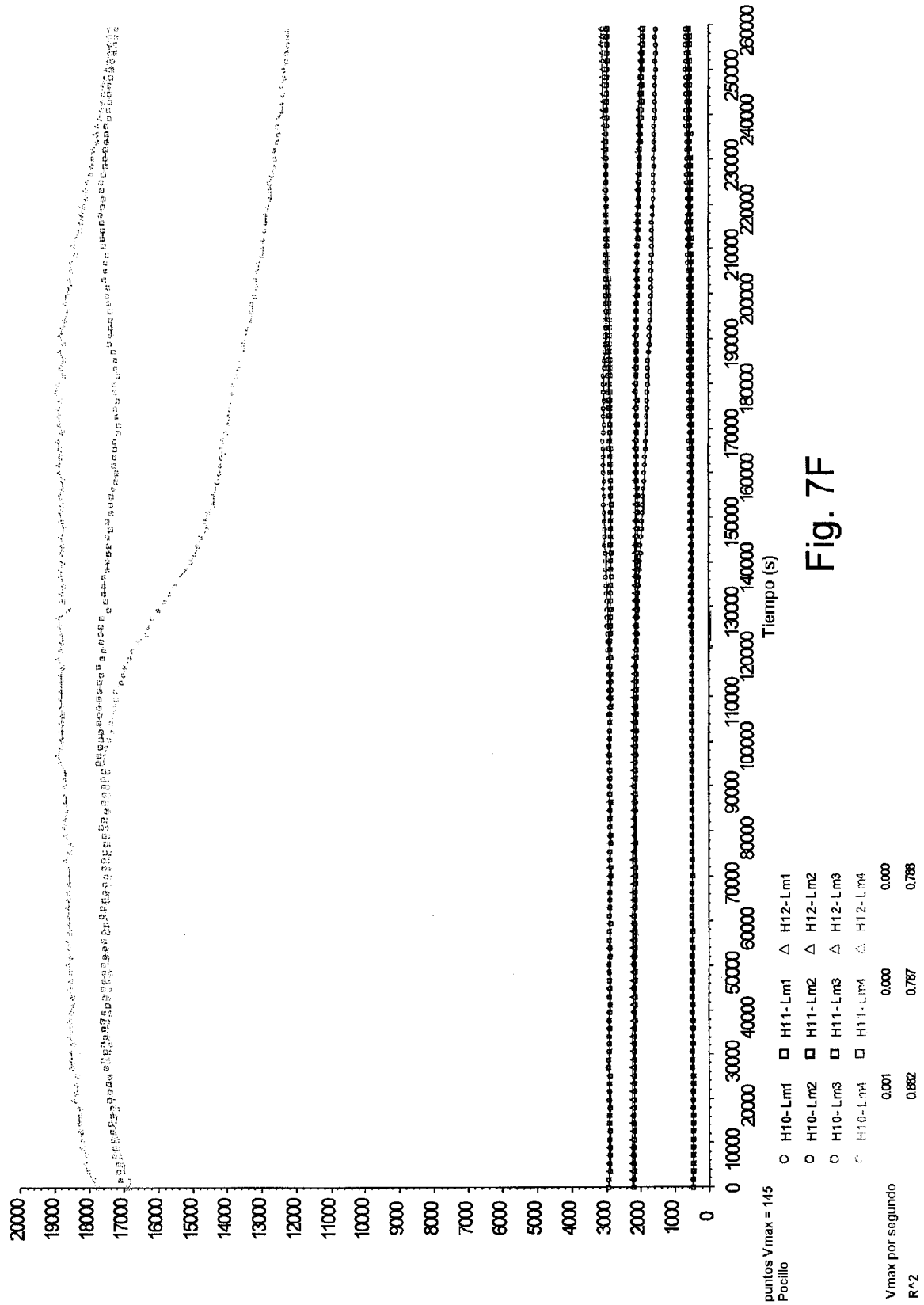


Fig. 7E

ALDOL + CF



ALDOL + CF

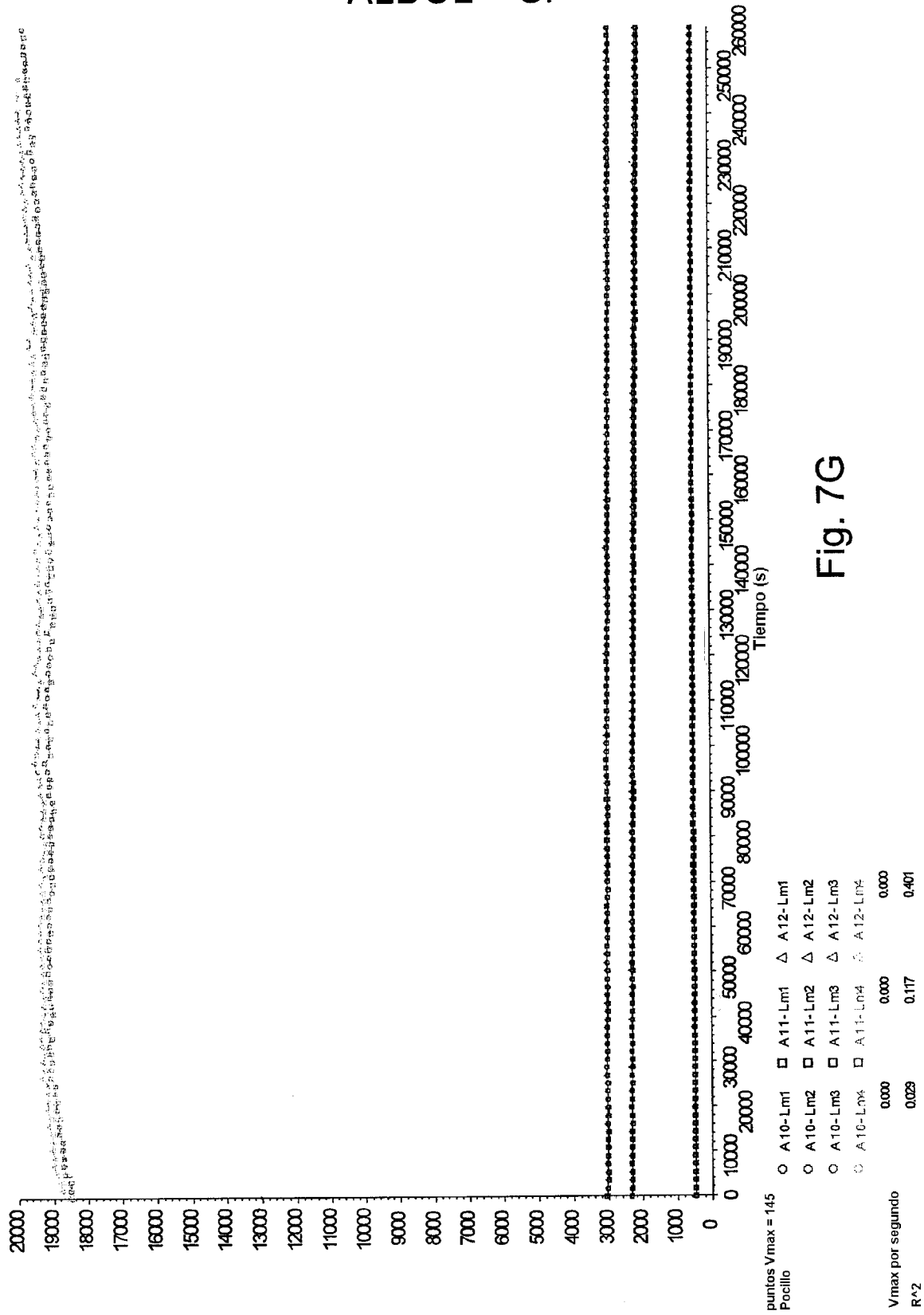


Fig. 7G