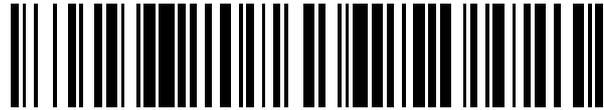


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 584**

51 Int. Cl.:

C12P 19/26 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2013 E 13734680 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2870255**

54 Título: **Preparación de hialuronato de sodio usando un mutante de Streptococcus zooepidemicus**

30 Prioridad:

05.07.2012 IT MI20121184

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

26.05.2016

73 Titular/es:

**ALTERGON ITALIA S.R.L. (100.0%)
Via dell'Industria
83030 Pietradefusi (AV), IT**

72 Inventor/es:

**PAGLIUCA, MAURIZIO;
RUGGIERO, ALESSANDRO y
VOLPE, FELICE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 571 584 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

Preparación de hialuronato de sodio usando un mutante de *Streptococcus zooepidemicus*

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de hialuronato sódico (HANa), que comprende el crecimiento de un microorganismo del género *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus* (número de depósito CNCM I-4645) en condiciones adecuadas en un medio nutritivo que contiene un azúcar como fuente de carbono.

La sal de sodio de ácido hialurónico se purifica altamente mediante una etapa de ultrafiltración. La invención también se refiere al microorganismo depositado.

Campo de la invención

10 Mediante el procedimiento de acuerdo con la invención, se produce HANa de conformidad con las normas de pureza, seguridad y consistencia actuales. Para obtener un alto grado de pureza, en el procedimiento se usa un medio que no contiene ingredientes de origen animal.

15 Debido a la porosidad y al pequeño tamaño de sus partículas, el HANa obtenido mediante el procedimiento se disuelve más rápidamente que otros HANa de origen animal y de fermentación, lo que lleva a una reducción considerable en el tiempo de fabricación y los costes. Adicionalmente, la alta pureza del material permite que se esterilice posteriormente sin ninguna pérdida significativa de peso molecular. Las ventajas de este procedimiento de fabricación son, por tanto, los perfiles de seguridad absoluta, de alta pureza, y de termolabilidad baja; una rápida disolución y capacidad de filtración simple para preparar soluciones; y la reproducibilidad del peso molecular, que se asocia con una polidispersidad baja.

Técnica anterior

20 El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano presente en la naturaleza, que consta de un polímero lineal con un peso molecular de 50.000 a 13.000.000 daltons. Es un polisacárido formado por unidades repetidas de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina unidas por enlaces β 1-3 y β 1-4 alternos. El ácido hialurónico está presente en varios tejidos conjuntivos de animales, tales como piel y cartílago. Algunos órganos, como el cordón umbilical, el líquido sinovial, el humor vítreo y las crestas de gallo, son particularmente ricos en ácido hialurónico. El ácido hialurónico también es producido por diversos microorganismos, tales como *Streptococcus* de tipo A y C. El ácido hialurónico está presente en todos los tejidos del cuerpo y realiza muchas funciones importantes. Estimula la liberación de nutrientes y el transporte de las toxinas desde la células que no tienen suministro de sangre, tales como las situadas en el cartílago; sin cantidades adecuadas de HA, las articulaciones se deteriorarían y serían frágiles. El ácido hialurónico no solo mantiene las articulaciones lubricadas, sino que también estimula la retención de líquidos en otros tejidos del cuerpo. En la piel y el cartílago, el papel del ácido hialurónico es el de unirse al agua y conservar la tonicidad y la elasticidad del tejido. La solución de ácido hialurónico viscoso en los fluidos de las articulaciones actúa como un lubricante y proporciona un entorno protector para las células.

35 Debido a su naturaleza hidrofílica y a sus propiedades reológicas y lubricantes, el hialuronato sódico es un biopolímero con un alto valor añadido, que tiene una amplia variedad de aplicaciones médicas, incluyendo la hidratación de la piel, el tratamiento de la artrosis, la cirugía oftálmica, la prevención de adherencias después de la cirugía abdominal y la cicatrización de heridas.

40 Los nuevos usos del hialuronato sódico son la liberación de fármacos, los recubrimientos / implantes y los tratamientos terapéuticos, basados en su capacidad para modificar el comportamiento celular. Dado que el rendimiento del producto formulado en muchas de dichas aplicaciones depende del peso molecular del biopolímero, el PM representa una característica de gran importancia en la producción de hialuronato sódico.

Hay dos procedimientos principales para la obtención de hialuronato sódico: (i) extracción de ácido hialurónico a partir de tejidos de origen animal (por ejemplo, extracción de crestas de gallo); (ii) crecimiento de microorganismos y recuperación del ácido hialurónico como producto de la fermentación.

45 (i) La extracción de crestas de gallo es cara y consume mucho tiempo, y conduce a problemas serios, a saber, una reducción de la calidad debido a la contaminación por las enzimas que degradan el ácido hialurónico (HAasa), y las reacciones inflamatorias en el momento de la inyección. Los procedimientos de extracción también se caracterizan por una serie de problemas y por los bajos rendimientos, la disponibilidad limitada del material de partida, la incapacidad para controlar las características del producto final (tales como el peso molecular) y los riesgos de contaminación derivados de virus.

50 (ii) La producción de hialuronato sódico mediante fermentación de un microorganismo adecuado representa un procedimiento efectivo en términos de costes. En la literatura se describen numerosos procedimientos para la producción y purificación de hialuronato sódico utilizando la tecnología de fermentación. Sin embargo, muchos de ellos utilizan habitualmente sales de amonio cuaternario para eliminar las impurezas, lo que lleva a tiempos prolongados de redisolución del precipitado y a la presencia de sales de amonio cuaternario en el producto final. Adicionalmente, dichas técnicas de purificación se basan principalmente en diferentes etapas de precipitación

que requieren un amplio uso de disolventes orgánicos, lo que aumenta los costes asociados con la purificación del producto y la eliminación de residuos.

5 El documento US2010/0137579A1 divulga un procedimiento para la purificación de ácido hialurónico de origen biológico (*Streptococcus zooepidemicus*) que es adecuado para usos médicos, que comprende etapas de diafiltración y ultrafiltración.

La publicación Biopolymers, 2010, 387–412 describe un procedimiento para la producción biotecnológica de ácido hialurónico mediante fermentación de *Streptococcus zooepidemicus*, filtración a través de un filtro de carbón, ultrafiltración / diafiltración y esterilización mediante microfiltración.

10 Separation and Purification Technology, 2006, 52, 29–38 describe un procedimiento de filtración de flujo tangencial de dos etapas para la separación de ácido hialurónico a partir de un caldo de fermentación. Sin embargo, este procedimiento no es adecuado para la producción a gran escala de ácido hialurónico, y este último no alcanza una pureza adecuado para usos médicos.

15 En vista de los problemas asociados con los procedimientos descritos, la importancia de un procedimiento de fabricación de hialuronato sódico que es simple, fácilmente aplicable y es capaz de eliminar las impurezas tales como proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas, iones metálicos, etc., está clara.

Descripción de la invención

20 La invención se refiere a un procedimiento para la producción de hialuronato sódico con altos rendimientos mediante fermentación de bacterias de *Streptococcus* (número de depósito CNCM I-4645) en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo enriquecido con un flujo de aire, la posterior separación de las bacterias del caldo de cultivo resultante y el aislamiento de hialuronato sódico del caldo de cultivo.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención supera los problemas mencionados anteriormente con un procedimiento para la producción de hialuronato sódico altamente purificado mediante fermentación en un medio nutritivo adecuado en condiciones adecuadas, usando un microorganismo de la especie *Streptococcus equi*, subespecie *zooepidemicus* (cepa mutante derivada de la cepa DSM salvaje n.º 20727). La cepa mutante se depositó con el número CNCM I-4645 el 21/06/2012 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur (París).

Durante la fermentación, el microorganismo produce ácido hialurónico y lo libera en el medio de cultivo.

30 A continuación se recupera el ácido hialurónico del medio de fermentación mediante la reducción de la viscosidad de la solución con un ácido, concentrándolo y purificándolo mediante ultrafiltración, comprobando y definiendo el peso molecular con un tratamiento térmico con valores de pH bajos, purificación adicional mediante adsorción con una técnica de adsorción adecuada, precipitando el hialuronato sódico, por ejemplo mediante precipitación con disolventes orgánicos, filtrando y secando el precipitado

El esquema de la Figura 1 ilustra esquemáticamente el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

35 De acuerdo con la invención, "hialuronato sódico de alto peso molecular" significa un hialuronato sódico que tiene una viscosidad intrínseca $\geq 1,8 \text{ m}^3/\text{kg}$.

El microorganismo se cultiva en un biorreactor, en un medio de cultivo adecuado, en condiciones de velocidad de agitación y oxigenación alta.

El medio contiene un azúcar como fuente de carbono a una concentración de partida que varía de 20 a 80 gramos por litro, y de 20 a 30 gramos por litro de extracto de levadura y / o peptona de soja.

40 El pH del medio se mantiene constante en el intervalo de 6,0 a 8,0 mediante adición continua de una solución básica manejado con un controlador de pH; el pH del medio se mantiene preferentemente a aproximadamente 7,0 por adición continua de NaOH concentrado.

45 El crecimiento de las bacterias se lleva a cabo en condiciones aerobias a presión, preferentemente con una velocidad de agitación alta. La presión de aire se mantiene constante a aproximadamente 0,6-1,0 barg, y la oxigenación a aproximadamente 0,8-1,2 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto.

Los rendimientos de fermentación varían de 5,0 to 10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de hialuronato sódico con un peso molecular promedio que varía de aproximadamente 1,8 a aproximadamente $3,0 \times 10^6$ daltons.

50 La duración de la fermentación es de aproximadamente 7-12 horas, con un 1 a 5 % v / v de inóculo cultivado hasta 4,0-12,0 unidades de DO medidas a 600 nm. Al final de la fermentación, la densidad de la biomasa es equivalente a una turbidez de 8-16 unidades de DO.

El medio de cultivo más adecuado tiene la siguiente composición:

Sacarosa	60 – 80 g·l ⁻¹
Glucosa	20 – 60 g·l ⁻¹
Extracto de levaduras	20 – 30 g·l ⁻¹
Peptona	10 – 30 g·l ⁻¹
Fosfato sódico monobásico monohidrato	2,0 – 4,0 g·l ⁻¹
Sulfato de magnesio heptahidrato	1,0 – 3,0 g·l ⁻¹
Sulfato potásico	0,5 – 2,2 g·l ⁻¹
Agente antiespumante sin silicona	0,2 – 1,0 g·l ⁻¹
Cloruro cálcico hexahidrato	8,0 – 12,0 mg·l ⁻¹
Sulfato de manganeso monohidrato	0,05 – 0,2 mg·l ⁻¹
Sulfato de cobre pentahidrato	0,01 – 0,1 mg·l ⁻¹
Cloruro de cinc	0,05 – 0,2 mg·l ⁻¹
L-arginina	40,0 – 60,0 mg·l ⁻¹
Glutamato monosódico	2,0 – 6,0 g·l ⁻¹

5 El hialuronato sódico puede recuperarse mediante tratamiento del medio para eliminar el microorganismo y otros materiales insolubles en el medio. El procedimiento preferido de eliminación, después de la adición de ácido para reducir la viscosidad de la solución, es la filtración con un auxiliar de filtración inerte.

Después, el hialuronato sódico se somete a microfiltración a través de cartuchos de filtro con una potencia nominal de 0,6 / 0,2 micrómetros (µm) para eliminar cualquier residuo del auxiliar de filtración y el microorganismo.

El pH del medio se ajusta después a aproximadamente 7,0 mediante la adición de NaOH concentrado.

10 El filtrado, tratado con el auxiliar de filtración inerte, se somete a filtración de flujo tangencial (FFT) para eliminar los ingredientes residuales de bajo peso molecular derivados de la etapa de fermentación. El tratamiento de ultrafiltración se realiza con membranas de ultrafiltración con un corte de 10 - 100 KDa, con agua altamente purificada (AAP) como tampón de diafiltración.

La diafiltración se lleva a cabo en condiciones de presión diferencial (AP) de 1,0 a 5,0 barg y a una presión transmembrana (PTM) de 0,5 a 4,5 barg.

15 La solución diafiltrada se somete a continuación a un tratamiento térmico con la adición de ácido clorhídrico (2 M) para reducir su peso molecular y la viscosidad intrínseca. Al final del tratamiento térmico, el pH de la solución se ajusta a 7,0 ± 1,0 mediante la adición de NaOH concentrado.

El producto obtenido de este modo, después de la adición de cloruro sódico (normalmente 0,7 M), se purifica con un auxiliar de filtración adecuado y después se filtra.

20 A continuación, el filtrado se microfiltra a través de los cartuchos de filtro con una potencia nominal de 0,2 micrómetros (µm).

25 Después de la adición de ácido clorhídrico (HCl), el hialuronato sódico se puede precipitar con un disolvente orgánico, tal como etanol al 96 % en v / v. Después de la eliminación del sobrenadante, se añade al precipitado etanol al 96 % en v / v. Después de la eliminación del sobrenadante, se añade a este segundo precipitado etanol al 96 % en v / v. El precipitado recuperado de este modo se seca a continuación al vacío para obtener un polvo fino de hialuronato sódico. Si se desea, se puede producir hialuronato sódico con un peso molecular definido y viscosidad intrínseca realizando un tratamiento térmico a valores de pH bajos de acuerdo con la tabla expuesta a continuación:

Peso molecular (kDa)	Viscosidad intrínseca (m ³ kg ⁻¹)	pH (UpH)
60 – 100	0,14 – 0,29	1,00 – 3,00
100 – 250	0,29 – 0,68	1,00 – 3,00
250 – 350	0,68 – 0,88	2,00 – 4,00
350 – 500	0,88 – 1,12	2,00 – 4,00
500 – 800	1,2 – 1,52	2,00 – 4,00
800 – 1000	1,52 – 1,75	3,00 – 5,00
1000 – 1400	1,75 – 2,14	3,00 – 5,00
1400 – 1800	2,14 – 2,47	3,00 – 5,00
1800 – 2400	2,47 – 2,92	3,00 – 5,00

La invención se describirá con mayor detalle en el ejemplo siguiente.

Ejemplo**Selección de bacterias para la producción de alto rendimiento**

5 Como bacteria productora de HANA se usa *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus* CNCM I-4645 (cepa mutante que deriva de la cepa DSM salvaje número 20727, depositada en la Colección Microbiana de DSMZ): el microorganismo se almacena en 20 % (v / v) de glicerol en un vial y se congela ($T \leq -70$ °C).

10 El procedimiento de fabricación comienza con la descongelación de un vial seguido de sembrado por raspado de la suspensión bacteriana en la placa en medio sólido, y crecimiento a 37 °C durante 20-36 horas (etapa de revitalización). Después, una colonia tomada de la placa se resuspende en medio de cultivo recién preparado en un tubo de ensayo y se incuba durante 8-16 horas a 37 °C con agitación (100 - 300 rpm, etapa de expansión celular I). Después, el tubo de ensayo se utiliza como inóculo en dos matraces Erlenmeyer de 5 litros que contienen 2 litros de medio de cultivo estéril. Los matraces se incubaron durante 8-16 horas a 37 °C con agitación (100 - 300 rpm, etapa de expansión celular II). La suspensión celular obtenida se utiliza después para la inoculación.

Fermentación de producción

15 Después de la inoculación en el medio de cultivo estéril, la fermentación de producción se lleva a cabo a 30-40 °C y pH $7,0 \pm 1,0$ con oxigenación de $1500 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, sobrepresión de 0,6-1,0 barg y agitación a 200-300 rpm. El valor del pH se mantiene constante en el intervalo específico mediante la adición de NaOH concentrado. Durante la fermentación, el ácido hialurónico forma parte de la cápsula de las células y es liberado gradualmente en forma soluble al medio de fermentación.

Filtración y microfiltración

20 El caldo de cultivo de fermentación se transfiere a un tanque al que se añade un ácido para que sea menos viscoso, y se añade un auxiliar de filtración inerte para obtener la mayor tasa de flujo necesaria para el grado de clarificación requerido. Cuando la etapa de embalaje se ha completado, la suspensión celular se transporta mediante una bomba a un filtro de presión y se filtró; el panel que forma es retenido por las placas de filtro, mientras que el filtrado se recupera para las etapas ulteriores.

25 El producto obtenido de este modo se microfiltra para eliminar todos los residuos de auxiliar o celulares mediante filtración con filtración de flujo normal (FFN), a través de los cartuchos de filtro con una potencia nominal de 0,6 / 0,2 micrómetros (μm).

Neutralización y la ultrafiltración

30 Después de las etapas de filtración y microfiltración (MF), se obtiene una solución filtrada acelular de hialuronato sódico, que puede purificarse. La primera etapa es recoger el producto en un tanque de almacenamiento al que se añade NaOH concentrada para restaurar el valor del pH a aproximadamente 7.

35 Un sistema de membranas de ultrafiltración de flujo tangencial (FFT) se utiliza para concentrar y purificar el producto. Las membranas utilizadas (casetes o módulos de fibra huecos) están hechas de un material compatible con el procedimiento, preferentemente polietersulfona o polipropileno, y tienen un punto de corte de 10 - 100 kDa, preferentemente de 30 kDa. Los intervalos de funcionamiento de los parámetros deL procedimiento de ultrafiltración son: presión transmembrana (PTM) 0,5-4,5 barg y presión diferencial (ΔP) 1,0-5,0 barg. El sobrenadante se concentró hasta 3-5 veces el volumen inicial para eliminar la mayoría de los contaminantes de de peso molecular bajo. La fracción retenida que contiene el hialuronato sódico se somete a diafiltración con hasta 5-7 volúmenes con agua altamente purificada para eliminar los contaminantes de bajo peso molecular restantes. La diafiltración termina cuando se alcanza un valor de conductividad inferior a $300 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

40

Tratamiento térmico a valores de pH bajos y neutralización

45 El producto diafiltrado concentrado se calienta en agitación en un tanque de procedimiento termostático en un intervalo de temperaturas de 50-65 °C, y el pH se ajusta al valor de 1-5 UpH mediante la adición de ácido clorhídrico. Después, la solución se incuba a en dichas condiciones hasta que se obtiene el peso molecular requerido. En estas condiciones, las moléculas de hialuronato sódico se descomponen al azar sin formar subproductos. El tratamiento térmico se termina mediante el ajuste del pH a un valor de $7,0 \pm 1,0$ UpH con NaOH concentrado y enfriamiento a una temperatura de aproximadamente 25,0 °C.

Adsorción con carbón activado, filtración y pulido

50 Se añade una sal a la solución ultrafiltrada para reducir su viscosidad y se usa un auxiliar de filtración para eliminar endotoxinas. Para eliminar las endotoxinas de manera eficaz, la solución se agita durante al menos 2-4 horas y después se filtra para eliminar el auxiliar de filtración. El filtrado se microfiltra mediante filtración en flujo normal para eliminar cualquier residuo de auxiliar de filtración.

Precipitación

5 Después de la adición de ácido clorhídrico (por ejemplo 2M) para neutralizar la solución, se añade un disolvente orgánico (tal como etanol al 96 % en v / v) a la solución de hialuronato sódico. El disolvente orgánico hidrosoluble se añade preferentemente en el intervalo de 1,2-2,8 volúmenes de la solución de hialuronato sódico. Para precipitar y sedimentar el hialuronato sódico eficazmente mediante la adición de un disolvente orgánico a la solución de hialuronato sódico, es preferible dejarlo sedimentar durante al menos 3-7 horas después de añadir el disolvente orgánico.

10 El hialuronato sódico precipitado obtenido en esta etapa, a partir de la eliminación del sobrenadante, se lava mediante la adición de disolvente orgánico recién preparado. El precipitado hialuronato sódico obtenido en esta segunda etapa, después de la eliminación del sobrenadante, se resuspende en disolvente orgánico recién preparado.

Recuperación y secado

El hialuronato sódico sedimentado se recupera y se filtra. Se realiza una etapa de secado final al vacío para obtener un polvo muy fino.

15 El hialuronato sódico obtenido de este modo es adecuado para producir preparaciones caracterizadas por la ausencia de pirogenicidad y actividad inflamatoria.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de hialuronato sódico con un peso molecular definido que varía de 60 a 2.400 kDa y polidispersidad baja (1,4 Mw / Mn) que comprende:

- 5 a) una etapa de fermentación de *Streptococcus equi* subespecie *zoepidemicus* CNCM 1-4645 en un medio de cultivo adecuado;
 b) una etapa de ultrafiltración de la solución filtrada acelular, concentración y diafiltración de la solución en condiciones de presión diferencial (ΔP) de 1,0 a 5,0 barg y a una presión transmembrana (PTM) de 0,5 a 4,5 barg.

10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de fermentación se lleva a cabo en un procedimiento por lotes para obtener la concentración máxima de ácido hialurónico ($5 - 10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) después de 7 - 12 horas.

3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en el que la etapa de fermentación se lleva a cabo en condiciones aeróbicas a una presión de 0,6 - 1,0 barg y una condición de oxigenación de 0,8 - 1,2 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto.

15 4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio de cultivo tiene la siguiente composición:

Sacarosa	60 – 80 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Glucosa	20 – 60 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Extracto de levaduras	20 – 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Peptona	10 – 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Fosfato sódico monobásico monohidrato	2,0 – 4,0 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Sulfato de magnesio heptahidrato	1,0 – 3,0 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Sulfato potásico	0,5 – 2,2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Antiespumante sin silicona	0,2 – 1,0 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Cloruro cálcico hexahidrato	8,0 – 12,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Sulfato de manganeso monohidrato	0,05 – 0,2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Sulfato de cobre pentahidrato	0,01 – 0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Cloruro de cinc	0,05 – 0,2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
L-arginina	40,0 – 60,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Glutamato sódico	2,0 – 6,0 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

20 5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que el hialuronato sódico se produce con un peso molecular y viscosidad intrínseca predefinidos realizando un tratamiento térmico a valores de pH bajos de acuerdo con la siguiente tabla:

Peso molecular (kDa)	Viscosidad intrínseca	pH (UpH)
60 – 100	0,14 – 0,29	1,00 – 3,00
100 – 250	0,29 – 0,68	1,00 – 3,00
250 – 350	0,68 – 0,88	2,00 – 4,00
350 – 500	0,88 – 1,12	2,00 – 4,00
500 – 800	1,2 – 1,52	2,00 – 4,00
800 – 1000	1,52 – 1,75	3,00 – 5,00
1000 – 1400	1,75 – 2,14	3,00 – 5,00
1400 – 1800	2,14 – 2,47	3,00 – 5,00
1800 – 2400	2,47 – 2,92	3,00 – 5,00

6. *Streptococcus equi* subespecie *zoepidemicus* CNCM I-4645.

Esquema

