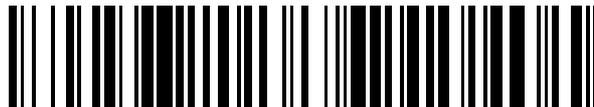


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 753**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10742930 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2449090**

54 Título: **Método y medio de cultivo para la detección mejorada de micobacterias**

30 Prioridad:

**01.07.2009 US 269977 P**

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

**01.08.2016**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX, INC (100.0%)  
100 Rodolphe Street  
Durham, NC 27712, US**

72 Inventor/es:

**DEOL, PARAMPAL;  
BARTON, LETICIA;  
PORTILLA, YOANY y  
LOVERN, DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 578 753 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

Método y medio de cultivo para la detección mejorada de micobacterias

**Campo de la invención**

5 La presente invención en general se refiere a un método para aumentar el crecimiento de micobacterias, a un método para el diagnóstico de infecciones provocadas por especies de micobacterias y a un equipo para detectar el crecimiento de micobacterias en un medio de cultivo. Más específicamente, se describen varias mejoras para un medio de cultivo y un método para aumentar o reducir el tiempo de detección (TD) del crecimiento de micobacterias en el medio de cultivo.

**Antecedentes de la invención**

10 Las micobacterias son un género de bacterias que están caracterizadas como bacilos gram-positivos inmóviles, resistentes a ácido. El género comprende muchas especies incluidas *Mycobacterium africanum*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. bovis-BCG*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. microti*, *M. scrofulaceum*, *M. paratuberculosis* y *M. tuberculosis*. Algunas de las micobacterias son patógenas tanto para las personas como para los animales, en especial *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. bovis*. Otras especies micobacterianas normalmente no son patógenas, pero provocan infecciones oportunistas en personas inmunodeficientes, tales como los pacientes de SIDA. Por ejemplo, las infecciones por *M. kansasii*, *M. avium* y *M. intracellulare* pueden producir neumopatía grave en pacientes en los que el sistema inmunitario está deprimido o afectado. De hecho, por primera vez desde 1953, los casos descritos de infecciones micobacterianas están aumentando en los Estados Unidos; muchos de estos casos están relacionado con el SIDA epidémico.

20 La detección de la especie *Mycobacterium* en especies clínicas es importante como herramienta de diagnóstico clínico. Tradicionalmente, se creía que *M. tuberculosis* era el único patógeno clínicamente importante en este género. Un aumento en la frecuencia de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos ha acentuado más la necesidad de detectar esta especie. La tuberculosis presenta todas las características principales de una enfermedad epidémica global. Actualmente, la tuberculosis afecta a más de 35 millones de personas en todo el mundo y produce más de 4 millones de muertes al año. Por lo tanto, la tuberculosis es un problema de principal interés en todo el mundo. La tuberculosis puede estar producida por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*, bacilos de Koch Gram-positivos, resistentes al ácido de la familia *Mycobacteriaceae*. Algunas cepas patógenas locales de *M. tuberculosis* se han aislado también de pacientes en Madras y otras ciudades en India, que difieren en algunos aspectos de H37Rv de *M. tuberculosis*, que es una cepa virulenta.

30 Sin embargo, otras especies de *Mycobacterium*, también son clínicamente importantes. Éstas se denominan a veces "MDDT" para otras micobacterias distintas de las de la tuberculosis, entre otras normalmente organismos del complejo *M. avium/intracellulare* (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, normalmente denominadas MAIC), *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum* y mezclas de especies de *Mycobacterium* en una muestra clínica. Por ejemplo, se ha demostrado que las infecciones oportunistas de crecimiento rápido por bacterias del complejo *M. avium* (MAC) se producen frecuentemente en pacientes de SIDA y otros pacientes inmunodeficientes. En dichas personas infectadas, se han encontrado al menos  $10^6$  células MAC/ml de sedimento de esputo. Por consiguiente, los análisis de detección que pueden detectar muchas especies de micobacterias son clínicamente importantes.

40 Muchos métodos clínicos para detectar e identificar especies de micobacterias en muestras requieren análisis de las características físicas (p. ej., tinción resistente al ácido y detección microscópica de bacilos), características fisiológicas (p. ej., cultivo en medios definidos) o características bioquímicas (p. ej., composición de lípidos de la membrana) de las bacterias. Estos métodos requieren concentraciones relativamente altas de bacterias en la muestra para ser detectadas, pueden ser subjetivas dependiendo de la experiencia y pericia del técnico clínico, y requieren mucho tiempo. Debido a que las especies de micobacterias con frecuencia son difíciles de cultivar *in vitro* y pueden tardar varias semanas en alcanzar una densidad útil en el cultivo, estos métodos pueden dar lugar además al tratamiento retardado del paciente y costes asociados al aislamiento de una persona infectada hasta que se completa el diagnóstico.

50 Las micobacterias en general, y *M. tuberculosis* y *M. bovis* en particular, son microorganismos exigentes que se desarrollan muy lentamente. Pueden tardar dos a tres semanas en desarrollarse estos organismos en el medio de cultivo convencionalmente utilizado. Se han hecho algunos esfuerzos para hallar un medio o una sustancia que pueda aumentar el crecimiento y reducir el factor temporal. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 3.935.073 describe un medio de cultivo para cultivar micobacterias que contienen los siguientes nutrientes en las concentraciones indicadas: 0,47% de caldo de cultivo básico 7H9 (que contiene fosfatos de potasio y de sodio, glutamato sódico, citrato sódico, sulfato amónico, piridoxina, citrato férrico y amónico, sulfato de magnesio, sulfato de cinc, sulfato de cobre, biotina y cloruro de calcio adquirido en BBL Microbiology Systems en Cockeysville, Maryland), 0,5% de albúmina de suero bovino, 0,1% de hidrolizado de caseína, 96 unidades/vial de catalasa, 2 uCi/vial de sustrato marcado con  $^{14}\text{C}$ , completar con agua desionizada hasta 2 ml, pH final  $6,8 \pm 0,1$ .

Como agente desintoxicante puede utilizarse albúmina en un medio para el cultivo de micobacterias. La albúmina es una proteína sencilla que se encuentra en casi todos los animales y en muchos tejidos vegetales. Las albúminas se caracterizan por ser solubles en agua y coagulables por el calor. Contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre. Una albúmina preferida para el medio de cultivo de la presente invención es la albúmina de suero bovino. La albúmina suele estar presente en el medio de cultivo a una concentración desde aproximadamente 0,1 por ciento en peso a aproximadamente 10 por ciento en peso.

Sin embargo, debido a la lenta velocidad de crecimiento y a la necesidad de un medio enriquecido para el crecimiento micobacteriano en el cultivo, la detección de micobacterias en muestras clínicas (p. ej. de esputo, líquidos pulmonares, tejido o heces) todavía representa un importante desafío biológico. Un factor en este desafío surge de hecho de que las bacterias que crecen más rápidamente pueden proliferar en el organismo micobacteriano de crecimiento lento de interés, excluyendo de este modo o dificultando considerablemente la detección de micobacterias. Durante décadas, se han desarrollado diversas técnicas para descontaminar muestras para diagnóstico (es decir, matar o inhibir organismos no micobacterianos) propuestas para identificación micobacteriana. Estas técnicas o bien destruyen los posibles contaminantes o les dañan en la medida en que su crecimiento se inhibe o se evita totalmente.

Convencionalmente, el diagnóstico de laboratorio de las micobacterias estaba basado en la tinción resistente al ácido y el cultivo del organismo, seguido de análisis bioquímicos. Como resultado del lento crecimiento y del prolongado tiempo de generación de las micobacterias, el diagnóstico exacto de laboratorio de micobacterias por técnicas convencionales puede tardar tanto como seis semanas. Los sistemas de cultivo automáticos tal como el sistema BacT/ALERT<sup>®</sup> (bioMérieux, Inc.) pueden disminuir el tiempo de identificación de las micobacterias en hasta dos semanas.

El presente cesionario, bioMérieux, Inc. ofrece el frasco de cultivo BacT/ALERT<sup>®</sup> MP de plástico para su uso en los sistemas de detección microbiana BacT/ALERT<sup>®</sup> como su sistema basado en el cultivo para detectar micobacterias en muestras clínicas, distintas de sangre. El sistema de detección microbiana BacT/ALERT<sup>®</sup> utiliza un sensor colorimétrico y luz reflejada para controlar la presencia y producción del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que está disuelto en el medio de cultivo. Si las micobacterias están presentes en la muestra del ensayo, el dióxido de carbono se produce a medida que los microorganismos metabolizan los sustratos en el medio de cultivo. Cuando el cultivo de las micobacterias produce CO<sub>2</sub>, el color del sensor permeable al gas instalado en el fondo de cada frasco de cultivo cambia del azul verdoso al amarillo.

El sistema de reactivos BacT/ALERT<sup>®</sup> MP comprende el frasco de cultivo BacT/ALERT<sup>®</sup> MP, líquido de redisolución (LR) y complemento antibiótico MB BacT (CAM) (en lo sucesivo denominado LR convencional o antiguo (o LR convencional/antiguo) y CAM convencional o antiguo (o CAM convencional/antiguo). El frasco de cultivo BacT/ALERT<sup>®</sup> MP es un frasco de plástico que contiene algunos componentes del medio. El líquido de redisolución (LR) contiene los nutrientes restantes para el cultivo de micobacterias y se utiliza para redissolver el CAM. El CAM es un polvo liofilizado compuesto de seis antimicrobianos para suprimir la flora respiratoria indeseable de las muestras de esputo. El LR y el CAM se envasan como el equipo del CAM. No obstante, todavía hay necesidad en la técnica de reducir más el tiempo requerido para el diagnóstico exacto de las micobacterias.

Palomino, *et al.*, "tuberculosis textbook" 1 de enero de 2007 (capítulo 14: New Diagnostic Methods) describe un medio Middlebrook 7H9 modificado que comprende una mezcla de enriquecimiento de OADC y polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim, vancomicina y azlocilina.

Gallagher, *et al.* "A selective oleic acid albumin agar medium for the cultivation of *Mycobacterium bovis*" Agosto de 1977, *The Journal of Hygiene*, vol. 79 (1), páginas 155-160 describe un medio selectivo de ácido oleico, albúmina y agar-agar para el cultivo de *Mycobacterium bovis*.

Lynn, *et al.* "Role of Bovine Serum Albumin in the Nutrition of *Mycobacterium tuberculosis*" 1979, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 38 (5), págs. 806-810 describe que la albúmina de suero bovino estimula el crecimiento de pequeños inóculos de *Mycobacterium tuberculosis* en medios que contienen ácidos grasos sin esterificar.

Por consiguiente, un objetivo principal de esta invención es proporcionar un método para aumentar el crecimiento y la detección de las especies de *Mycobacterium* que pueden estar presentes en una muestra clínica. Se expone además un medio de cultivo de micobacterias adecuado para el cultivo *in vitro* de micobacterias. Además se expone un medio de cultivo de micobacterias según el objetivo precedente, en donde el crecimiento de organismos contaminantes está inhibido.

Por consiguiente, se describe en la presente memoria una nueva formulación para medios de cultivo, una formulación de un nuevo complemento nutritivo (CN) y un nuevo complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) y mejoras en el procedimiento de fabricación que presentan mejoras inesperadas en el crecimiento y detección de las micobacterias. Además en la presente memoria se describen métodos para mejorar el cultivo y detección de micobacterias.

### Compendio de la invención

La presente invención generalmente se refiere a métodos para el cultivo y detección de *Mycobacterium*. Por otra parte, se exponen composiciones y métodos de diagnóstico que detectan un amplio espectro de la especie *Mycobacterium* que puede estar presente en una muestra clínica. La presente invención se refiere además a un equipo nuevo y mejorado que permite más tiempo de detección (TD) para el cultivo y detección de micobacterias, el sistema MP o el equipo que comprende un frasco de cultivo BacT/ALERT® MP esterilizable en autoclave, un complemento nutritivo (CN) y un nuevo complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM).

En la presente memoria se expone un medio de cultivo para cultivar micobacterias, medio de cultivo que comprende: (a) un medio de cultivo básico adecuado para el cultivo de micobacterias; (b) uno o más aditivos de complemento nutritivo; (c) y un complemento antimicrobiano mejorado; y en donde dicho medio de cultivo presenta aumento de crecimiento de dichas micobacterias.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para el aumento de crecimiento de micobacterias que comprende añadir a una muestra que se sospecha que contiene micobacterias a un medio de cultivo que contiene ASB exenta de ácidos grasos, un complemento de ácidos grasos que comprende uno o más ácidos grasos de cadena larga, teniendo dichos ácidos grasos 10 o más átomos de carbono, y un complemento antimicrobiano que comprende uno o más agentes antimicrobianos en donde dicho complemento antimicrobiano comprende fosfomicina, y someter el medio de cultivo a condiciones adecuadas para el cultivo de dichas micobacterias, en donde dicha ASB exenta de ácidos grasos y una o más de dichos ácidos grasos de cadena larga aumentan el crecimiento de dichas micobacterias en comparación con el medio de cultivo que no contiene una ASB exenta de ácidos grasos y un complemento de ácido graso que comprende uno o más ácidos grasos de cadena larga.

Otra realización de la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de la infección causado por una especie de micobacteria, que comprende las etapas siguientes: (a) proporcionar un medio de cultivo; (b) añadir un complemento nutritivo a dicho medio de cultivo, complemento nutritivo que comprende ASB exenta de ácidos grasos y uno o más ácidos grasos de cadena larga teniendo dichos ácidos grasos 10 o más átomos de carbono, en donde dicha ASB exenta de ácidos grasos y una o más de dichos ácidos grasos de cadena larga aumentan el crecimiento de dichas micobacterias en comparación con el medio de cultivo que no contiene una ASB exenta de ácidos grasos y un complemento de ácido graso que comprende uno o más ácidos grasos de cadena larga; (c) añadir una muestra para la que debe determinarse la presencia o ausencia de dicha especie de micobacteria, y (d) analizar en el cultivo la presencia de la especie de micobacteria, en donde un descubrimiento de la presencia de la especie de micobacteria indica un diagnóstico positivo de dicha infección.

Todavía en otra realización, la presente invención se refiere a un equipo mejorado. El equipo mejorado incluirá un frasco de cultivo que comprende un medio de cultivo básico para el cultivo de micobacterias o agua. Opcionalmente, el medio de cultivo o agua del nuevo frasco de cultivo MP no incluirá ningún componente térmicamente lábil, por lo que se permite que el nuevo frasco de cultivo MP sea esterilizable en autoclave. El sistema o equipo de reactivos incluirá además un nuevo complemento nutritivo (CN) que comprende ASB exenta de ácidos grasos y uno o más ácidos grasos de cadena larga teniendo dichos ácidos grasos 10 o más átomos de carbono y un nuevo complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) que comprende uno o más agentes antimicrobianos para suprimir el crecimiento de la flora respiratoria contaminante en dicho medio de cultivo. El complemento nutritivo (CN) puede incluir un medio de cultivo básico para el crecimiento de micobacterias y/o uno o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, azúcares, sales, nutrientes, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos u otros nutrientes. Preferiblemente el frasco de cultivo es un frasco de cultivo BacT/ALERT® MP.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1A - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de *M. tuberculosis* con y sin aporte complementario de ácidos grasos.

Figura 1B - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de *M. intracellulare* con y sin aporte complementario de ácidos grasos.

Figura 1C - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de *M. avium* con y sin aporte complementario de ácidos grasos.

Figura 2 - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de cepas de micobacterias con y sin aporte complementario de ácidos grasos.

Figura 3 - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de cepas de micobacterias con azlocilina.

Figura 4 - es un diagrama de caja que presenta el efecto de vancomicina sobre el crecimiento de cepas de micobacterias.

Figura 5A - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de 18283 de *M. tuberculosis* con diversas formulaciones del complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM).

Figura 5B - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de 27294 de *M. tuberculosis* con diversas formulaciones del complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM).

- 5 Figura 5C - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de 569 de *M. avium* con diversas formulaciones del complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM).

Figura 5D - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de 13950 de *M. intracellulare* con diversas formulaciones del complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM).

- 10 Figura 5E - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de 19981 de *M. scrofulaceum* con diversas formulaciones del complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM).

Figura 5F - es un diagrama de caja que presenta el tiempo de detección (TD) de 12478 de *M. kansasii* con diversas formulaciones del complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM).

- 15 Figura 6 - es un diagrama de caja que presenta una comparación de la formulación del CAM anterior frente a la nueva formulación del complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) para el tiempo de detección (TD) del crecimiento del complejo de *M. tuberculosis*.

Figura 7 - es un diagrama de caja que presenta una comparación de la formulación del CAM anterior frente a la nueva formulación del complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) para el tiempo de detección (TD) del crecimiento de otra cepa de micobacterias.

#### Descripción detallada de la invención

- 20 Es bien conocido que el cultivo de microorganismos se reproduce al proporcionar las condiciones nutritivas y ambientales apropiadas. Un cultivo o medio de cultivo adecuado debe contener todos los nutrientes requeridos por el microorganismo que ha de cultivarse. Por ejemplo, un medio de cultivo microbiológico típico debe contener recursos de agua disponibles, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, vitaminas, oligoelementos tales como potasio, magnesio, calcio y hierro, y minerales, tales como azufre y fósforo. Por lo general, estas necesidades se suministran de varias fuentes. Otros factores para condiciones de reproducción adecuadas pueden incluir pH, temperatura, aireación, concentración salina y presión osmótica del medio.

- 25 Además, es sabido que pueden necesitarse determinados factores de crecimiento. Un factor de crecimiento es un compuesto orgánico que un microorganismo debe contener para crecer pero que no puede sintetizar. Muchos microorganismos, cuando se proporcionan con los nutrientes enumerados anteriormente, pueden sintetizar todos los constituyentes orgánicos de su protoplasma, incluidos los aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas, ácidos grasos y otros compuestos. Cada uno de estos compuestos esenciales es sintetizado por una secuencia discreta de reacciones enzimáticas y cada enzima se produce bajo el control de un gen específico. Sin embargo, algún microorganismo no puede sintetizar uno o más de estos factores de crecimiento y debe entonces obtenerse este compuesto del medio. Los factores de crecimiento requeridos pueden incluir, pero no se limitan a, aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas, ácidos grasos y otros compuestos requeridos para el crecimiento.

- 30 Como se expuso en la presente anteriormente, el cesionario actual, bioMérieux, Inc., produce y vende un frasco de medio de cultivo para cultivo y detección de micobacterias (frasco de proceso BacT/ALERT<sup>®</sup> MP). El frasco de proceso BacT/ALERT<sup>®</sup> MP está diseñado para su uso con los sistemas BacT/ALERT<sup>®</sup> o BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D para recuperación y detección de micobacterias procedentes de muestras del cuerpo estériles y de muestras clínicas digeridas descontaminadas. El frasco de proceso MP puede utilizarse junto con el complemento antimicrobiano (CAM) MB/BacT<sup>®</sup> y/o el líquido de redisolución (LR) MB/BacT<sup>®</sup> (denominado en la presente memoria CAM convencional o antiguo y LR convencional o antiguo).

- 35 El frasco de cultivo desechable BacT/ALERT<sup>®</sup> MP tiene un cierre extraíble y contiene aproximadamente 10 ml de medio y un detector interno que detecta dióxido de carbono como indicador de crecimiento microbiano. La formulación del medio de cultivo consiste en: caldo de cultivo Middlebrook 7H9 (0,47% p/v), producto de la digestión pancreática de caseína (0,1% p/v), albúmina de suero bovino (0,5% p/v) y catalasa (48 u/ml) en agua purificada (denominado en la presente memoria medio de cultivo convencional o antiguo).

- 40 El complemento antimicrobiano MB/BacT<sup>®</sup> convencional o antiguo (CAM convencional/antiguo) es un complemento liofilizado formulado para contener anfotericina B (0,0180% p/v), azlocilina (0,0034% p/v), ácido nalidíxico (0,0400% p/v), polimixina B (10.000 unidades), trimetoprim (0,00105% p/v) y vancomicina (0,0005% p/v).

- 45 El líquido de redisolución MB/BacT<sup>®</sup> convencional/antiguo (LR convencional/antiguo) contiene ácido oleico (0,05% p/v), glicerol (5% p/v), amaranto (0,004%) y albúmina de suero bovino (1% p/v) en agua purificada. El líquido de redisolución (LR) y el complemento antimicrobiano MB BacT/ALERT<sup>®</sup> (CAM) comprende un equipo de complemento que puede añadirse al frasco MP.

La presente invención se refiere a métodos y equipos que comportan un medio de cultivo nuevo y mejorado y métodos para el aumento de crecimiento de micobacterias. El medio de cultivo y los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para el cultivo de cualquier micobacteria conocida, incluidas, pero no limitadas a, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*,  
 5 *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoeense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium gordonae*. Los inventores han descubierto recientemente una nueva formulación de medio de cultivo, una nueva formulación de complemento nutritivo (denominado en la presente  
 10 memoria nuevo CN) y una nueva formulación de complemento antimicrobiano (denominado en la presente memoria CAM nuevo) y mejoras en el procedimiento de fabricación que muestran la mejora inesperada en el cultivo y detección de micobacterias.

Las características novedosas del sistema MP descrito en la presente memoria pueden incluir: (1) transferencia de los componentes térmicamente lábiles desde el medio de cultivo MP a un complemento nutritivo, lo que permite la  
 15 esterilización terminal del frasco MP; (2) uso de nuevas fuentes de carbono para optimizar la producción de CO<sub>2</sub>; (3) optimización del complemento nutritivo; y/o (4) optimización de los CAM antimicrobianos y/o de la concentración de antimicrobianos. Estas mejoras conducen a varias mejoras inesperadas en el cultivo y detección de micobacterias, incluidas: (1) mejor rendimiento del frasco MP por lo que se refiere al tiempo de detección (TD) de crecimiento micobacteriano; (2) mejor recuperación de micobacterias clínicamente relevantes; (3) reducción del avance de la  
 20 flora respiratoria contaminante (FRC); y/o (4) minimización de falsos positivos. Otras mejoras incluyen la simplificación del procedimiento de fabricación, de tal manera que, los frascos BacT/ALERT<sup>®</sup> MP pueden almacenarse y transportarse a temperatura ambiente.

#### *Medio de cultivo*

El nuevo medio de cultivo descrito en la presente memoria proporciona aumento de crecimiento de las  
 25 micobacterias. Tal como se emplea en la presente memoria, "aumento de crecimiento" significa que el crecimiento de las micobacterias puede detectarse utilizando el medio de cultivo y/o los complementos de la presente invención, por ejemplo en un frasco de cultivo, al menos aproximadamente 0,5 día, al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días o al menos  
 30 aproximadamente 7 días antes de utilizar el medio de cultivo convencional. En otras palabras, el crecimiento de micobacterias puede aumentarse de ese modo permitiendo una mejora o reducción en el tiempo de detección (TD) del crecimiento en comparación con el crecimiento de micobacterias en un medio de cultivo convencional. Según esta invención, TD puede aumentarse o reducirse al menos aproximadamente 0,5 día, al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días o al  
 35 menos aproximadamente 7 días utilizando el medio de cultivo de la presente invención en comparación con el medio de cultivo convencional. El medio de cultivo convencional/antiguo puede ser el medio de cultivo convencional enriquecido con el LR convencional/antiguo y CAM convencional/antiguo del frasco del proceso BacT/ALERT<sup>®</sup> MP (bioMérieux, Inc.), descrito en la presente memoria anteriormente.

El nuevo medio de cultivo descrito en la presente memoria puede proporcionar una disminución del desfase para el  
 40 crecimiento de micobacterias. Tal como se emplea en la presente memoria, "disminución del desfase" significa una disminución en el tiempo de incubación o de latencia antes de que la micobacteria entre en el crecimiento en fase logarítmica. El medio de cultivo y/o los complementos pueden dar lugar a una disminución o reducción del desfase de al menos aproximadamente 0,5 día, o al menos aproximadamente 1 día, o al menos aproximadamente 2 días o al  
 45 menos aproximadamente 3 días, en comparación con el desfase de las micobacterias en medio de cultivo convencional/antiguo. El medio de cultivo convencional/antiguo puede ser el medio de cultivo convencional enriquecido con el LR convencional/antiguo y CAM convencional/antiguo del frasco del proceso BacT/ALERT<sup>®</sup> MP (bioMérieux, Inc.), descrito en la presente memoria anteriormente.

El medio de cultivo descrito en la presente memoria puede comprender un medio nutritivo líquido o un caldo de  
 50 cultivo nutritivo. El medio de cultivo o caldo de cultivo nutritivo normalmente comprende uno o más nutrientes conocidos, por ejemplo, el medio de cultivo puede contener uno o más fuentes de carbono (p. ej., glicerol), fuentes de nitrógeno (p. ej., sales amoniacales), azúcares, sales (p. ej., de K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>), nutrientes, y/o agua. El medio de cultivo descrito en la presente memoria puede comprender Middlebrook 7H9. Como se expuso en la presente anteriormente, Middlebrook 7H9 comprende sales de potasio, sales de sodio, glutamato sódico, citrato sódico, sulfato amónico, piridoxina, citrato férrico amónico, sulfato de magnesio, sulfato de cinc, sulfato de cobre, biotina y cloruro cálcico.

El medio de cultivo descrito en la presente memoria puede comprender además nutrientes y/o componentes  
 55 adicionales que permiten el aumento de detección del crecimiento de micobacterias. Otros nutrientes y/o componentes que pueden añadirse al medio de cultivo comprenden, pero no se limitan a, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, extractos de células o vegetales y/o otros nutrientes. Por ejemplo, el medio de cultivo además puede comprender caseína (p. ej., un producto de la digestión pancreática de la caseína), albúmina (p. ej., albúmina de  
 60 suero bovino), catalasa y/o amaranto. Como se expone además en la presente memoria, estos nutrientes y/o componentes adicionales pueden comprender un complemento nutritivo aparte que puede añadirse a un medio de

cultivo básico antes de la inoculación del medio de cultivo con una muestra para la que puede desearse la determinación de la presencia o ausencia de una micobacteria.

Los autores han descubierto que altas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta y media (p. ej., ácidos grasos que tienen aproximadamente 8 átomos de carbono o menos) relacionado con la albúmina de suero bovino (ASB) en el frasco de medio de cultivo puede dar lugar a lecturas de falsos positivos. Como tal, puede ser preferible evitar usar ácidos grasos de cadena corta o media. Por ejemplo, debe evitarse el uso de ácidos grasos que tienen 8 átomos de carbono o menos (p. ej., ácido caprílico).

Sin embargo, los autores han descubierto además que estos falsos positivos inducidos por el reactivo pueden eliminarse o reducirse considerablemente empleando ASB exenta de ácidos grasos y enriqueciendo la formulación de medio de cultivo con ácidos grasos de cadena larga. Por consiguiente, el medio de cultivo puede comprender además ASB exenta de ácidos grasos (ASB exenta de A.G.) y uno o más ácidos grasos saturados o insaturados de cadena larga o una de sus sales. Puede ser preferible utilizar uno o más ácidos grasos de cadena larga con 10 o más átomos de carbono. En general, puede utilizarse cualquier ácido graso de cadena larga conocido, incluidos, pero no limitados a, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y una de sus sales. Como se expuso además en la presente memoria, los autores han descubierto que los ácidos grasos pueden transferirse desde el medio de cultivo del frasco a un complemento nutritivo que puede añadirse por separado al medio de cultivo antes de la inoculación con una muestra de ensayo. Como se muestra en la presente memoria (véase el ejemplo 1 y las figuras 1A-1C), el uso de una ASB exenta de ácidos grasos y el enriquecimiento del medio de cultivo con ácidos grasos de cadena larga dio lugar a un aumento del tiempo de detección (TD) de 2 a 2,5 días para el cultivo y detección de *M. tuberculosis* (véase la figura 1A), *M. intracellulare* (véase la figura 1B) y *M. avium* (véase la figura 1C).

El medio de cultivo descrito en la presente memoria puede enriquecerse con uno o más sustratos o compuestos intermedios conocidos de la serie de reacciones metabólicas. Los autores descubrieron sorprendentemente que al incluir un sustrato de la serie de reacciones metabólicas (p. ej.,  $\alpha$ -cetoglutarato) en el medio de cultivo, el cultivo y detección de micobacterias podía mejorarse en comparación con un medio de cultivo que no contiene el sustrato de la serie de reacciones metabólicas (p. ej.,  $\alpha$ -cetoglutarato). Aunque sin desear estar ligado por la teoría, se cree que el empleo de un sustrato de la serie de reacciones metabólicas (p. ej.,  $\alpha$ -cetoglutarato) en el medio de cultivo puede aumentar la producción de CO<sub>2</sub> por las micobacterias presentes en el cultivo. Pueden utilizarse sustratos o compuestos intermedios del ciclo del ácido cítrico, glucólisis o derivación de glioxilato. Pueden utilizarse sustratos o cofactores de enzimas productoras de CO<sub>2</sub>, o compuestos intermedios, precursores o uno de sus derivados. Por ejemplo, pueden ser útiles compuestos intermedios del ciclo del ácido cítrico, tales como piruvato, citrato, cis-aconitato, isocitrato, oxalosuccinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato o oxaloacetato. En el medio de cultivo descrito en la presente memoria pueden incluirse uno o más de entre  $\alpha$ -cetoglutarato, un precursor de  $\alpha$ -cetoglutarato y/o un derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato. Los precursores o derivados de  $\alpha$ -cetoglutarato, pueden incluir, pero no se limitan a, glutamato, isocitrato, oxalosuccinato o una de sus mezclas. El/los precursor(es) de  $\alpha$ -cetoglutarato,  $\alpha$ -cetoglutarato y/o el/los derivado(s) de  $\alpha$ -cetoglutarato pueden estar presentes en el medio de cultivo a una concentración final desde aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 50 g/l, desde aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 20 g/l o desde aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 20 g/l. Como se expuso además en la presente memoria, el  $\alpha$ -cetoglutarato, el precursor del  $\alpha$ -cetoglutarato y/o el derivado del  $\alpha$ -cetoglutarato pueden estar incluidos en un complemento nutritivo que puede añadirse por separado al medio de cultivo.

El medio de cultivo descrito en la presente memoria puede comprender además uno o más agentes o sustancias antimicrobianos. Un antimicrobiano es un agente o sustancia que mata, suprime o si no inhibe el crecimiento de microbios. En general, puede utilizarse cualquier agente antimicrobiano conocido, tales como, fármacos, productos químicos u otras sustancias que matan, suprimen o ralentizan el crecimiento de microbios. Los agentes antimicrobianos útiles incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, bacteriostáticos, bactericidas, antibacterianos, antivíricos, antimicóticos, antiprotozoarios y antiparasitarios. En general, el antimicrobiano se emplea en una cantidad suficiente para matar, suprimir o inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes que pueden estar presentes en el medio de cultivo. Por ejemplo, como entendería un experto en la técnica, puede ser preferible para inhibir el crecimiento de la flora respiratoria contaminante (FRC) en el medio de cultivo. La FRC puede interferir con el crecimiento de micobacterias, reducir los nutrientes necesarios para el crecimiento de micobacterias y/o conducir a falsos positivos. La flora respiratoria contaminante (FRC) puede incluir, pero no se limita a, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *C. tropicalis*, *S. aureus* resistente a metilicina (SARM), *E. faecalis* resistente a vancomicina (EFRV).

El antimicrobiano puede ser uno o más antibióticos o fármacos sintéticos, incluidos, pero no limitados a, polimixina B, vancomicina, azlocilina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y fosfomicina. Los antibióticos útiles inhiben la flora respiratoria contaminante (FRC) sin suprimir ni inhibir el crecimiento de las micobacterias.

En algunas realizaciones, el complemento antimicrobiano comprende uno o más antibióticos antimicóticos, antibióticos gram-negativos, antibióticos gram-positivos, un antibiótico antimicótico y antibióticos de amplio espectro. Por ejemplo, el complemento antimicrobiano descrito en la presente memoria puede comprender, un antimicótico (p. ej., anfotericina B), un antibiótico gram-negativo que altera la permeabilidad de la membrana citoplásmica (p. ej.,

polimixina B), un antibiótico de amplio espectro que inhibe la ADN-girasa (p. ej., ácido nalidíxico), un agente quimioterapéutico (p. ej., un agente que inhibe la dihidrofolato reductasa (p. ej., trimetoprim)) y un antibiótico de amplio espectro que inhibe la enolpiruvato transferasa (p. ej., fosfomicina). En general, en la puesta en práctica de esta invención pueden utilizarse cualquier antimicótico, antibióticos gram-negativos, antibióticos de amplio espectro, inhibidores antibióticos de ADN-girasa o agentes quimioterapéuticos conocidos. En una realización, el complemento antimicrobiano puede comprender anfotericina B, polimixina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y fosfomicina.

Como se muestra en la presente memoria (véanse, p. ej., los ejemplos 3-4 y las figuras 3-4), la utilización de vancomicina y/o azlocilina puede suprimir, inhibir o ralentizar el crecimiento de algunas especies de micobacterias. Por lo tanto, en algunas realizaciones, puede ser preferible evitar la utilización de vancomicina y/o azlocilina. Los autores han descubierto que puede utilizarse fosfomicina en lugar de azlocilina y vancomicina para dar el complemento antimicrobiano (CAM) que puede utilizarse para aumentar el crecimiento y la detección de las micobacterias en el cultivo, en comparación con el complemento antimicrobiano MBBacT<sup>®</sup>. Por ejemplo, sustituyendo azlocilina y vancomicina por fosfomicina, los autores han descubierto que el nuevo complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) aumenta o reduce el tiempo de detección (TD) del crecimiento de micobacterias de 2 a 9 días, en comparación con el CAM convencional/antiguo (véase, p. ej., el ejemplo 5 y las figuras 5A-5F). Por consiguiente, en algunas situaciones, la utilización de polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y fosfomicina puede ser preferible. Estos antibióticos pueden utilizarse en cantidades suficientes para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes que pueden estar presentes en el medio de cultivo. Por ejemplo, el medio de cultivo puede contener una concentración final desde aproximadamente 400 unidades/ml a aproximadamente 2.000 unidades/ml de polimixina B, desde aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 400 µg/ml de anfotericina B, desde aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 1.000 µg/ml de ácido nalidíxico, desde aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml de trimetoprim y desde aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 1.000 µg/ml de fosfomicina. Como se expone además en la presente memoria, estos agentes antimicrobianos pueden comprender un complemento aparte que puede añadirse a un medio de cultivo básico antes de la inoculación del medio de cultivo con una muestra para la que puede desearse la determinación de la presencia o ausencia de una micobacteria.

El medio de cultivo descrito en la presente memoria puede comprender uno o más de los siguientes: Middlebrook 7H9, albúmina de suero bovino, α-cetoglutarato, caseína, catalasa y/o agua. El medio de cultivo puede comprender además uno o más nutrientes y/o componentes adicionales conocidos por los expertos en la técnica por ser beneficiosos para el cultivo de micobacterias. Por ejemplo, el medio de cultivo descrito en la presente memoria puede constar además de uno o más azúcares o fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, minerales, sales, aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas, ácidos grasos y otros compuestos. El medio de cultivo puede comprender Middlebrook 7H9, glicerol, ácido esteárico (p. ej., estearato sódico), ácido mirístico (o una de sus sales), ácido palmítico (p. ej., palmitato sódico), ácido oleico (p. ej., oleato sódico), albumina de suero bovino, caseína (p. ej., producto de la digestión pancreática de la caseína), catalasa, piruvato sódico, α-cetoglutarato, amaranto y agua.

El medio de cultivo puede comprender además uno o más agentes antimicrobianos (p.ej., fosfomicina). Por ejemplo, el medio de cultivo puede comprender además una mezcla de agentes antimicrobianos, seleccionados de entre uno o más de polimixina B, azlocilina, vancomicina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y/o fosfomicina. El medio de cultivo puede comprender además una mezcla de antibióticos que comprende polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y fosfomicina.

El medio de cultivo puede ajustarse a un pH desde aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, un pH desde aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0 o un pH desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0. Según esta invención, el medio de cultivo aumenta o reduce el tiempo de detección (TD) de crecimiento micobacteriano en al menos aproximadamente 0,5 día, al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días o al menos aproximadamente 7 días en comparación con el medio de cultivo de micobacterias convencional/antiguo.

#### *Método para mejorar la detección de micobacterias*

En general, el presente invención se refiere además a un método para detectar el crecimiento de uno o más micobacterias que pueden estar presentes en una muestra biológica. Las muestras que pueden ser analizadas incluyen tanto las muestras clínicas como las que no son clínicas donde puede sospecharse la presencia de una micobacteria. Las muestras clínicas que pueden ser analizadas comprenden cualquier tipo de muestra que suele analizarse en los laboratorios clínicos, incluidas, pero sin limitarse a, sangre, esputo, aspirados, hisopos y enjuagues de hisopo, otros humores corporales y similares. En una realización, la muestra puede ser una muestra corporal estéril o una muestra clínica descontaminada de producto de la digestión. Las muestras que no son clínicas que pueden analizarse incluyen además sustancias muy variables, que comprenden, pero no se limitan a, muestras de alimentos, bebidas, productos farmacéuticos, cosméticos, agua, aire, suelo, vegetales, productos sanguíneos (incluidas las plaquetas), órganos de donantes o tejidos y similares.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para mejorar el crecimiento y/o la detección de micobacterias que comprende añadir una muestra que se sospecha que contiene micobacterias a un medio de cultivo que comprende ASB exenta de ácidos grasos, uno o más ácidos grasos de cadena larga, y un complemento

antimicrobiano, y someter al medio de cultivo a condiciones adecuadas para el crecimiento de dichas micobacterias, en donde dicha ASB exenta de ácidos grasos y una o más de dichos ácidos grasos de cadena larga aumentan el crecimiento de dichas micobacterias. Los autores han descubierto que la utilización de ASB exenta de ácidos grasos y uno o más ácidos grasos de cadena larga en el CN da lugar a una reducción sustancial en las lecturas de falsos positivos. Además, como se muestra e la presente memoria (véase el ejemplo 1 y las figuras 1A-1C), la utilización de una ASB exenta de ácidos grasos y el aporte complementario del medio de cultivo con ácidos grasos de cadena larga dio lugar a un aumento del tiempo de detección (TD) de 2 a 2,5 días para el crecimiento y la detección de *M. tuberculosis* (véase la figura 1A), *M. intracellulare* (véase la figura 1B) y *M. avium* (véase la figura 1C). En una realización, el medio de cultivo puede comprender además una cantidad eficaz de un aditivo que comprende  $\alpha$ -cetoglutarato, un precursor de  $\alpha$ -cetoglutarato o un derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato para aumentar el crecimiento de dichas micobacterias y someter el medio de cultivo a condiciones adecuadas para el crecimiento de dichas micobacterias. Los autores han descubierto inesperadamente que, al utilizar  $\alpha$ -cetoglutarato, un precursor de  $\alpha$ -cetoglutarato y/o un derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato en el medio de cultivo y el método de la presente invención, el tiempo de detección (TD) del crecimiento de micobacterias puede detectarse al menos aproximadamente en 0,5 días, al menos aproximadamente en 1 día, al menos aproximadamente en 2 días, al menos aproximadamente en 3 días, al menos aproximadamente en 5 días o al menos aproximadamente en 7 días antes que utilizando medio de cultivo convencional/antiguo (es decir, medio de cultivo sin  $\alpha$ -cetoglutarato, precursor o derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato). Como se muestra en el ejemplo 2 y la figura 2, el tiempo de detección (TD) de cepas de micobacterias en un medio de cultivo que contiene  $\alpha$ -cetoglutarato aumenta o se reduce en aproximadamente dos días en comparación con TD en un medio de cultivo que no contiene  $\alpha$ -cetoglutarato.

La presente invención se refiere además a un método para el diagnóstico de infecciones causadas por una especie de micobacteria, que comprende las etapas siguientes: (a) proporcionar un medio de cultivo; (b) añadir un complemento nutritivo a dicho medio de cultivo, comprendiendo dicho aditivo del complemento nutritivo ASB exenta de ácidos grasos y opcionalmente uno o más ácidos grasos de cadena larga; (c) añadir una muestra para la que debe determinarse la presencia o ausencia de dicha especie de micobacteria; y (d) analizar en dicho cultivo la presencia de dicha especie de micobacteria, en donde un hallazgo de la presencia de dicha especie de micobacteria indica un diagnóstico positivo para dicha infección. Los autores han descubierto que la utilización de ASB exenta de ácidos grasos y uno o más ácidos grasos de cadena larga en el CN da lugar a una reducción sustancial en las lecturas de falsos positivos. Además, como se muestra e la presente memoria (véase el ejemplo 1 y las figuras 1A-1C), la utilización de una ASB exenta de ácidos grasos y el aporte complementario del medio de cultivo con ácidos grasos de cadena larga dio lugar a un aumento del tiempo de detección (TD) de 2 a 2,5 días para en crecimiento y la detección de *M. tuberculosis* (véase la figura 1A), *M. intracellulare* (véase la figura 1B) y *M. avium* (véase la figura 1C). En una realización, el complemento puede comprender además  $\alpha$ -cetoglutarato, un precursor de  $\alpha$ -cetoglutarato y/o un derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato. Como se expuso anteriormente en la presente memoria, la utilización de  $\alpha$ -cetoglutarato, un precursor de  $\alpha$ -cetoglutarato o un derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato en el medio de cultivo y el método de la presente invención puede reducir el TD en al menos aproximadamente 0,5 día, al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días o en al menos aproximadamente 7 días. De acuerdo con este método, el complemento nutritivo (CN) opcionalmente puede utilizar ASB exenta de ácidos grasos y además comprender uno o más ácidos grasos de cadena larga (p. ej., ácidos grasos que tienen 10 o más átomos de carbono).

Se ha descrito además un método de inhibición de la contaminación bacteriana en un cultivo de micobacterias, método que comprende cultivar una muestra que se sospecha que contiene micobacterias en un medio de cultivo que comprende fosfomicina en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de la bacteria contaminante en condiciones adecuadas para el crecimiento de dichas micobacterias. Según este método, antes de la inoculación pueden añadirse al medio de cultivo uno o más agentes o sustancias antimicrobianos, o simultáneamente con ella, del medio de cultivo con la muestra biológica a analizar. Posteriormente, el medio de cultivo y la muestra pueden cultivarse durante un tiempo suficiente y a una temperatura suficiente para permitir el crecimiento y la detección de cualquiera de las micobacterias que pueden estar presentes en la muestra analítica. Uno o más antimicrobianos pueden incluirse en un complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) que pueden añadirse al medio de cultivo básico antes de, o simultáneamente con la inoculación del medio de cultivo con la muestra a analizar. Como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, el CAM puede comprender uno o más de entre polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y fosfomicina.

En otra realización todavía, la presente invención se refiere a un equipo para el crecimiento y/o la detección de micobacterias que pueden estar presentes en una muestra biológica. Como se ha descrito con más detalle en la presente memoria, el sistema de reactivo BacT/ALERT<sup>®</sup> MP mejorado incluirá el frasco de cultivo MP mejorado que comprende un medio de cultivo básico para el crecimiento de micobacterias, un nuevo complemento nutritivo (CN) y un nuevo complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM). El complemento nutritivo (CN) y/o el complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) puede añadirse al medio de cultivo básico del frasco antes de, o simultáneamente con la inoculación del medio de cultivo con la muestra biológica a analizar la presencia de micobacterias. El frasco inoculado se cultivará durante un tiempo suficiente y a una temperatura suficiente que permita el crecimiento y/o la detección de cualquiera de las micobacterias que pueden estar presentes en la muestra biológica. En una realización, el medio de cultivo del nuevo frasco de cultivo MP no incluirá ningún componente térmicamente lábil, lo que permite que el nuevo frasco de cultivo MP sea esterilizable en autoclave.

*Equipo de reactivos MP*

En un aspecto, la presente invención se refiere a un equipo de reactivos MP para el aumento del crecimiento y la detección de micobacterias. El equipo de reactivos MP comprenderá un frasco de cultivo que tiene un medio de cultivo básico de micobacterias, un complemento nutritivo (CN), y/o un complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM).

*Frasco de cultivo*

En la presente memoria se ha descrito un frasco o recipiente (es decir, un frasco de cultivo) que contiene un nuevo y mejorado medio de cultivo de micobacterias. En general, el frasco de cultivo puede ser de cualquier diseño o tamaño conocido en la técnica y puede comprender cualquier medio de cultivo conocido beneficioso para el crecimiento y/o detección de micobacterias. El frasco de cultivo puede comprender caldo de cultivo Middlebrook 7H9 y/o agua como medio de cultivo básico. El frasco MP convencional/antiguo utilizar un medio de cultivo líquido con un pH de aproximadamente 6,8 para el crecimiento y detección de *Mycobacterium*. Asimismo, el nuevo y mejorado frasco de cultivo MP tendrá un medio de cultivo básico líquido o caldo al que puede añadirse un nuevo complemento nutritivo y/o un nuevo complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM). El medio de cultivo puede ajustarse a un pH desde aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, un pH desde aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0 o un pH desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0. En otra realización, el medio de cultivo del frasco de cultivo MP tendrá un pH de aproximadamente 6,8.

Los autores han descubierto sorprendentemente que al eliminar determinados nutrientes de crecimiento del frasco del medio de cultivo, incluidos, por ejemplo, albúmina de suero bovino, catalasa de hígado bovino y/o caseína, el frasco puede esterilizarse finalmente. Por ejemplo, al eliminar los componentes térmicamente lábiles el frasco puede esterilizarse en autoclave. Las mejoras relacionadas con la esterilización terminal del frasco incluyen mejoras del almacenamiento y transporte. Por ejemplo, el frasco finalmente esterilizado (p. ej., el frasco esterilizado en autoclave) puede almacenarse y transportarse a temperatura ambiente lo que da lugar a una considerable reducción de costes. El frasco finalmente esterilizado además puede dar lugar a un periodo de conservación mejorado y/o un nivel de esterilidad (SAL) aumentado.

*Complemento nutritivo (CN)*

Se ha descrito además en la presente memoria un complemento nutritivo (CN) mejorado que puede añadirse al frasco de cultivo descrito en la presente memoria para aumentar el crecimiento y la detección de micobacterias. En general, el complemento nutritivo (CN) se añade a un frasco de cultivo que contiene un medio de cultivo básico para crecimiento de micobacterias, antes de la inoculación del frasco y el medio de cultivo con una muestra para la que se desea la detección de la presencia de una micobacteria.

El complemento nutritivo (CN) mejorado puede incluir cualquier nutriente o complemento conocido beneficioso para el crecimiento de micobacterias. Por ejemplo, el complemento nutritivo puede incluir uno o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, azúcares, sales, nutrientes, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y/o otros nutrientes conocidos por los expertos en la técnica.

El complemento nutritivo puede comprender además  $\alpha$ -cetoglutarato, un precursor de  $\alpha$ -cetoglutarato y/o un derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato. En general, puede utilizarse cualquier precursor o derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato conocido, incluidos, pero no limitados a, glutamato, isocitrato, oxalosuccinato o una de sus mezclas. El  $\alpha$ -cetoglutarato, el/los precursor(es) de  $\alpha$ -cetoglutarato y/o el/los derivado(s) de  $\alpha$ -cetoglutarato pueden estar presentes en el complemento nutritivo en una cantidad suficiente de tal manera que tras la adición al medio de cultivo del frasco de cultivo, la concentración final de  $\alpha$ -cetoglutarato, precursor de  $\alpha$ -cetoglutarato y/o derivado de  $\alpha$ -cetoglutarato es de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 50 g/l.

El complemento nutritivo puede comprender además uno o más ácidos grasos saturados o insaturados de cadena larga o una de sus sales. En una realización puede ser preferible utilizar uno o más ácidos grasos de cadena larga con 10 o más átomos de carbono. En general, puede utilizarse cualquier ácido graso de cadena larga conocido, incluidos, pero no limitados a, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y una de sus sales. En otra realización, puede ser preferible evitar el utilizar ácidos grasos de cadena corta o media. Por ejemplo, según esta realización debe evitarse el uso de ácidos grasos que tienen 8 átomos de carbono o menos (p. ej., ácido caprílico).

Como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria, puede ser preferible utilizar albúmina de suero bovino (ASB) exenta de ácidos grasos en el complemento nutritivo de la presente invención. Como se ha mencionado anteriormente, la utilización de ASB exenta de ácidos grasos puede reducir o eliminar sustancialmente falsos positivos basados en reactivos.

El complemento nutritivo (CN) puede comprender glicol, uno o más ácidos grasos de cadena larga, albúmina de suero bovino (ASB) exenta de ácidos grasos, producto de la digestión pancreática de la caseína, piruvato sódico, amaranto y  $\alpha$ -cetoglutarato. El complemento nutritivo puede añadirse al frasco de cultivo junto con el medio de cultivo básico, o puede añadirse al frasco de cultivo justo antes de la inoculación con una muestra analítica.

Alternativamente, el complemento nutritivo puede utilizarse para volver a poner en suspensión el complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) y a continuación añadirlo al frasco de medio de cultivo.

#### Complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM)

5 Se ha descrito además en la presente memoria un complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) mejorado que puede añadirse al frasco de cultivo descrito en la presente memoria para aumentar el crecimiento y la detección de micobacterias. Los autores han desarrollado un complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) mejorado que aumenta el crecimiento de micobacterias en el cultivo. El CAM mejorado es eficaz en la supresión o inhibición del crecimiento de la flora respiratoria contaminante (FRC) sin suprimir o inhibir el crecimiento micobacteriano. La flora respiratoria contaminante (FRC) puede incluir, pero no se limita a, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E.*  
10 *faecalis*, *K. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *C. tropicalis*, *S. aureus* resistente a metilicina (SARM), *E. faecalis* resistente a vancomicina (EFRV). El complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) puede añadirse directamente a un frasco de cultivo que comprende un medio de cultivo básico para crecimiento de micobacterias, antes de la inoculación del frasco y el medio de cultivo con una muestra para la que se desea la detección de la presencia de una micobacteria. En otra realización, el complemento nutritivo (CN) puede utilizarse para volver a poner en  
15 suspensión el complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) antes de ser añadido al frasco de medio de cultivo.

En general, puede utilizarse cualquier agente o sustancia antimicrobiano conocido, incluidos, pero no limitados a, antibióticos, bacteriostáticos, bactericidas, antibacterianos, antivíricos, antimicóticos, antiprotozoarios y/o antiparasitarios. Sin embargo, los agentes antimicrobianos preferidos incluyen cualquiera de los antimicrobianos que suprime o inhibe el crecimiento de la flora respiratoria contaminante (FRC) sin suprimir o inhibir el crecimiento de las micobacterias. En una realización, el CAM comprende uno o más antimicrobianos en una cantidad suficiente para inhibir la contaminación bacteriana en dicho medio de cultivo.

El medio de cultivo descrito en la presente memoria puede incluir uno o más antibióticos. Los antibióticos útiles comprenden, por ejemplo, antibióticos que suprimen o inhiben el crecimiento de FRC, incluidos, pero no limitados a, polimixina B (POLY B), vancomicina (VAN), azlocilina (AZL), anfotericina B (AMF B), ácido nalidíxico (AN), trimetoprim (TMP) y fosfomicina (FOS). Los antibióticos utilizados para tratar infecciones micobacterianas y que pueden matar, suprimir o inhibir el crecimiento de micobacterias no sirven en el complemento antibiótico en la presente invención e incluyen, por ejemplo, isoniazida, rifampin, pirazinamida, estreptomina y etambutol. Como se expuso anteriormente en la presente memoria, el presente cesionario comercializa y vende un complemento antimicrobiano MB/BacT<sup>®</sup> que es un complemento liofilizado formulado que contiene anfotericina B (0,0180% p/v), azlocilina (0,0034% p/v), ácido nalidíxico (0,0400% p/v), polimixina B (10.000 unidades), trimetoprim (0,00105% p/v) y vancomicina (0,0005% p/v). Sin embargo, los autores actualmente han descubierto inesperadamente que la fosfomicina puede enriquecerse en azlocilina y vancomicina para dar un complemento antimicrobiano (CAM) que puede utilizarse para el aumento de crecimiento y detección de micobacterias en el cultivo, en comparación con el  
25 complemento antimicrobiano MB/BacT<sup>®</sup> convencional/antiguo.

Como tal, el complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) mejorado puede comprender un complemento liofilizado formulado que contiene anfotericina B (AMF B), polimixina B (POLY B), trimetoprim (TMP), ácido nalidíxico (AN) y fosfomicina (FOS). El complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) puede formularse de tal manera que el medio de cultivo final contenga una concentración final desde aproximadamente 400 unidades/ml a aproximadamente 2.000 unidades/ml de polimixina B, desde aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 400 µg/ml de anfotericina B, desde aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 800 µg/ml de ácido nalidíxico, desde aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml de trimetoprim y desde aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 1.000 µg/ml de fosfomicina.

El complemento nutritivo (CN) y el complemento antimicrobiano (CAM) pueden formar un equipo aparte que puede añadirse a continuación a un frasco de medio de cultivo finalmente esterilizado. En esta realización, el equipo de CN/CAM puede comercializarse por separado y venderse como un aditivo para el frasco BacT/ALERT MP.

Los ejemplos siguientes se ponen para ilustrar más las características de la invención, pero no están destinadas a limitar el alcance de la invención en modo alguno.

#### Ejemplos

50 Ejemplo 1. TD de diversas cepas de micobacterias con y sin aporte complementario de ácidos grasos

Para evaluar el efecto de los ácidos grasos (AG) de cadena larga sobre el crecimiento de micobacterias, ASB exenta de ácidos grasos (EAG) se seleccionó de Proliant, Inc. (Ames, Iowa). Se identificaron 5 AG de cadena larga: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18: 1) y ácido linoleico (C18: 2) como posibles complementos de AG basándose en el perfil de AG y el rendimiento en el crecimiento. Se preparó y ensayó una nueva formulación del complemento con ASB EAG con y sin los cinco AG (véase la Tabla 1 para la nueva formulación del complemento). Las concentraciones objetivo del aporte complementario de AG estaban basadas en el contenido en AG obtenido en evaluaciones anteriores. La concentración de ASB EAG utilizada fue de 10 g/l. La pérdida de AG durante la filtración del nuevo complemento se determinó por análisis del éster metílico de  
55

ácido graso (EMAG). Se observó que la recuperación de AG era >80% después de la filtración con un filtro de 0,45 µm. El análisis de esta formulación demostró que las concentraciones mayores de ASB aumentaban la disolución y la estabilidad de AG con fijación de ASB-AG (datos no mostrados). Los análisis además demostraron que a menor contenido en ASB, menor fijación de AG lo que da lugar a más pérdida de AG durante la filtración.

5 Un nuevo frasco de cultivo esterilizable en autoclave se diseñó transfiriendo componentes térmicamente lábiles del medio de cultivo presentes en el frasco convencional o antiguo al LR convencional/antiguo. El nuevo frasco de cultivo esterilizable en autoclave comprendía Middlebrook 7H9. El nuevo complemento de LR se preparó empleando la composición de LR convencional o antiguo pero modificándola para acomodar los componentes térmicamente lábiles transferidos desde la formulación del antiguo frasco MP. La Tabla 1 a continuación presenta la composición de un nuevo frasco MP esterilizable en autoclave (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y un nuevo complemento. La ASB utilizada en este nuevo complemento fue exenta de ASB ácidos grasos (EAG) (Proliant Inc., Ames, Iowa) en lugar de la ASB convencional utilizada en el LR convencional/antiguo.

Tabla 1 - Nuevo frasco MP y nuevas formulaciones del complemento

Nuevo frasco MP		LR modificado o nuevo complemento	
Frasco de cultivo MP		Líquido de redisolución	
Materia prima	g/l	Materia prima	g/l
Middlebrook 7H9	4,7	Albúmina de suero bovino	210
		Producto de la digestión pancreático de caseína	20
		Catalasa de hígado bovino	0,86
		Glicerol	50
		Ácido oleico	0,475
		Piruvato sódico	20
		Amaranto	0,04

15 Se ensayó el rendimiento en el crecimiento en cinco organismos (*M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. intracellulare*). La formulación del CAM convencional se utilizó para estos experimentos. El nuevo complemento con/sin aporte complementario de AG y LR convencional/antiguo se utilizaron para rehidratar un polvo liofilizado del complemento antibiótico MB BacT convencional o antiguo (CAM convencional/antiguo) (bioMérieux, Inc.). El CAM convencional/antiguo contenía 1.000 unidades/ml de polimixina B (POLY B), 180 µg/ml de anfotericina B (AMF B), 200 µg/ml de ácido nalidixico (AN), 10,5 µg/ml de trimetoprim (TMP), 34 µg/ml de Azlocilina (AZL) y 5 µg/ml de Vancomicina (VAN).

25 Para el nuevo complemento se utilizó el nuevo frasco BacT/ALERT® MP esterilizable en autoclave (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y para LR convencional/antiguo, se utilizó el frasco MP convencional/antiguo. Antes de la inoculación de nuevos y convencionales/antiguos frascos de cultivo MP (bioMérieux, Inc.) con cultivos de micobacterias, se añadieron 0,5 ml de nuevo complemento con/sin AG o 0,5 ml de LR convencional/antiguo a una serie del frasco de cultivos BacT/ALERT® MP. Se añadió CAM convencional rehidratado (utilizando el nuevo complemento con/sin AG y LR convencional/antiguo) a la segunda serie de frascos de cultivo MP. Se comparó el crecimiento (como TD de crecimiento) en estos frascos para cultivos de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium tuberculosis* después de inocular con aproximadamente  $0,5 \times 10^3$  UFC/ml. Se llevaron a cabo asimismo recuentos de colonias utilizando placas de agar agar Middlebrook 7H10 para comprobar las concentraciones en el inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37°C en el sistema sin oscilación BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) durante 35 días. Se recogieron datos de tiempo de detección (TD) cuando los frascos se declararon positivos con el instrumento de BacT/ALERT®. Los resultados se presentan en la Tabla 2 y las figuras 1A-1C.

35

Tabla 2 - Resultados de TD para *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* y *M. avium*

Organismo	Complemento	ASB	Ácidos grasos	TD med.	Desv. Típ. de TD	TD min.	TD máx.	nº de positivos	Nº de analizados
<i>M. avium</i> 25291	Sólo medio	Convencional	Sin AG	15,1	0,7	14,3	16,0	5	5
		EAG	AG	15,3	0,5	14,8	15,8	5	5
			Sin AG	17,0	0,6	16,2	17,7	5	5
	Medio+ CAM	Convencional	Sin AG	18,1	0,9	16,7	19,0	5	5
		EAG	AG	16,8	0,9	15,8	17,7	5	5
			Sin AG	21,0	0,8	20,3	22,0	5	5
<i>M. intracellulare</i> 13950	Sólo medio	Convencional	Sin AG	8,3	0,3	7,8	8,7	5	5
		EAG	AG	7,9	0,3	7,5	8,2	5	5
			Sin AG	12,5	0,5	11,7	12,8	5	5
	Medio+CAM	Convencional	Sin AG	18,7	2,7	16,0	22,5	5	5
		EAG	AG	13,8	1,4	11,5	16,0	10	10
			Sin AG	24,8	6,1	17,3	33,5	10	10
MTB 25177	Sólo medio	Convencional	Sin AG	19,3	0,4	18,7	19,7	5	5
		EAG	AG	18,7	0,8	17,7	19,5	5	5
			Sin AG	19,9	0,5	19,3	20,3	5	5
	Medio+ CAM	Convencional	Sin AG	25,6	4,0	20,2	31,5	5	5
		EAG	AG	23,4	0,6	22,3	23,8	5	5
			Sin AG	27,6	1,8	25,8	30,0	5	5

5 La figura 1A presenta los resultados de TD para *Mycobacterium tuberculosis* in cultivos que contienen ASB exenta de AG (EAG) con y sin aporte complementario de ácidos grasos de cadena larga. Como se muestra en la figura 1A, se observó una reducción en el TD en las muestras que contenían ASB exenta de AG enriquecidas con AG en comparación con las muestras que contenían ASB sin aporte complementario de AG.

10 La figura 1B presenta los resultados de TD para *Mycobacterium intracellulare* in cultivos que contienen ASB exenta de AG (EAG) con y sin aporte complementario de ácidos grasos de cadena larga. Como se muestra en la figura 1B, se observó una reducción en el TD en las muestras que contenían ASB exenta de AG enriquecidas con AG en comparación con las muestras que contenían ASB sin aporte complementario de AG.

La figura 1C presenta los resultados de TD para *Mycobacterium avium* in cultivos que contienen ASB exenta de AG (EAG) con y sin aporte complementario de ácidos grasos de cadena larga. Como se muestra en la figura 1C, se observó una reducción en el TD en las muestras que contenían ASB exenta de AG enriquecidas con AG en comparación con las muestras que contenían ASB sin aporte complementario de AG.

15 Los resultados demostraron una mejora en el TD de *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* y *M. avium* en 2 a 2.5 días en presencia de complemento antimicrobiano micobacteriano (CAM) y nuevo complemento nutritivo (CN). Como se

expuso anteriormente en la presente memoria, el nuevo CN comprende ASB exenta de ácidos grasos y ácidos grasos de cadena larga enriquecidos.

#### Ejemplo 2. TD de cepas de micobacterias con y sin $\alpha$ -cetoglutarato

5 Para mejorar más el TD de micobacterias, se seleccionaron sustratos y/o cofactores de enzimas productoras de CO<sub>2</sub> en las rutas de las células micobacterianas para ulterior estudio, incluidos  $\alpha$ -cetoglutarato, iso-citrato, L-malato, ácido oxaloacético, lactato y L-arginina. El nuevo complemento con AG se preparó y esterilizó por filtración como se ha explicado anteriormente. Se añadieron los sustratos a diferentes concentraciones en el nuevo complemento.

10 Se ensayaron cuatro especies de micobacterias a una concentración de  $0,5 \times 10^3$  UFC/ml. Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -cetoglutarato sobre el crecimiento (como TD de crecimiento) de cultivos de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium tuberculosis*. Se utilizó un nuevo frasco de cultivo BacT/ALERT<sup>®</sup> MP esterilizable en autoclave (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria). Antes de la inoculación de frascos de cultivo MP con cultivos de micobacterias, se añadió 0,5 ml de nuevo complemento con varias cantidades de  $\alpha$ -cetoglutarato a los nuevos frascos de cultivo BacT/ALERT<sup>®</sup> MP. Se llevaron a cabo asimismo recuentos de colonias utilizando placas de agar-agar Middlebrook 7H10 para comprobar las concentraciones en el inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37°C en el sistema sin oscilación BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D durante 35 días. Se recogieron datos del tiempo de detección (TD) cuando los frascos se declararon positivos con el instrumento BacT/ALERT<sup>®</sup>.

20 Los resultados para el TD de la especie de micobacterias clave con la inclusión de dos concentraciones de 5 y 15 g/l de  $\alpha$ -cetoglutarato se presentan en la Tabla 3 y la figura 2. La Tabla 3 y la figura 2 demuestran que la adición de  $\alpha$ -cetoglutarato (5 g/l o 15 g/l) a un medio de cultivo daba lugar a una reducción aproximada de dos días en el tiempo de detección (TD) del crecimiento en los cultivos de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium tuberculosis* en comparación con un medio de cultivo que no contiene  $\alpha$ -cetoglutarato.

25 Se llevaron a cabo experimentos similares utilizando diferentes concentraciones de iso-citrato, L-malato, ácido oxaloacético, lactato y L-arginina, sin embargo, a diferencia del  $\alpha$ -cetoglutarato, estos otros sustratos no presentaban una reducción en TD (datos no mostrados).

Tabla 3 - TD de especies de micobacterias con y sin  $\alpha$ -cetoglutarato

Organismo	Sustrato	TD med.	Desv. Típ. de TD	TD min.	TD máx.	nº de positivos	nº de analizados
<i>M. avium</i> 25291	Sin $\alpha$ -cetoglutarato	15,6	0,2	15,5	15,8	3	3
	5 g de $\alpha$ -cetoglutarato	13,8	1,1	12,7	14,8	3	3
	15 g de $\alpha$ -cetoglutarato	13,5	1,3	12,2	14,8	3	3
<i>M. intracellulare</i> 13950	Sin $\alpha$ -cetoglutarato	11,6	1,3	10,7	13,0	3	3
	5 g de $\alpha$ -cetoglutarato	9,0	0,3	8,7	9,2	3	3
	15 g de $\alpha$ -cetoglutarato	8,8	0,4	8,5	9,2	3	3
MTB 27294	Sin $\alpha$ -cetoglutarato	15,7	0,8	14,8	16,2	3	3
	5 g de $\alpha$ -cetoglutarato	14,3	0,8	13,8	15,2	3	3
	15 g de $\alpha$ -cetoglutarato	13,9	0,2	13,7	14,0	3	3

## Ejemplo 3. TD de especies de micobacterias con CAM convencional

Se determinó la eficacia del CAM convencional frente al crecimiento de micobacterias estudiando el efecto de seis fármacos incluidos polimixina B (POLY B), anfotericina B (AMF B), ácido nalidíxico (AN), trimetoprim (TMP), Azlocilina (AZL) y Vancomicina (VAN). Estos estudios se llevaron a cabo también para identificar los fármacos y sus concentraciones que tenían efectos secundarios sobre el crecimiento de micobacterias.

Para el rendimiento del crecimiento, se preparó LR convencional/antiguo y se añadieron diferentes concentraciones de seis antimicrobianos. Las concentraciones se seleccionaron como concentraciones 25-50% menores o mayores que las concentraciones del CAM convencional que son 1.000 unidades/ml de polimixina B (POLY B), 180 µg/ml de anfotericina B (AMFB), 400 µg/ml de ácido nalidíxico (AN), 10,5 µg/ml de trimetoprim (TMP), 34 µg/ml de Azlocilina (AZL) y 5 µg/ml de Vancomicina (VAN).

El crecimiento (como TD de crecimiento) se determinó para *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium tuberculosis* utilizando azlocilina en el medio de cultivo. La supresión de gram-positivas, gram-negativas y levadura que podían estar presentes en una muestra de esputo (denominada flora respiratoria contaminante o FRC) se estudió también en paralelo con las mismas formulaciones (datos no mostrados).

Para esta evaluación, se utilizó la formulación MP convencional o antigua (bioMérieux, Inc.) . Antes de la inoculación de frascos de cultivo MP con micobacterias u otros cultivos de bacterias/levaduras, se añadió 0,5 ml de LR convencional/antiguo con diferentes fármacos cantidades de α-cetoglutarato a frascos de cultivo BacT/ALERT® MP convencionales (bioMérieux, Inc.). Los recuentos de colonias se llevaron a cabo también utilizando Middlebrook 7H10 o sangre de oveja o placas con soja y agar-agar tripsínico para comprobar las concentraciones de inóculo y la pureza de los cultivos. Los inoculados frascos MP se cargaron a 35-37°C en el sistema no oscilante BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) durante 35 días para cultivos de micobacterias y hasta 15 días para otros cultivos. Se recogieron datos del tiempo de detección (TD) cuando los frascos se declararon positivos con el instrumento BacT/ALERT. Los resultados se presentan en las Tablas 4 -5 y las figuras 3-4.

Como se muestra en la Tabla 4 y la figura 3, la utilización de azlocilina en un medio de cultivo tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento (determinado por el TD del crecimiento) de *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium tuberculosis*, en comparación con un medio de cultivo que no contenía agentes antimicrobianos.

El crecimiento (como TD de crecimiento) se determinó para *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium tuberculosis* utilizando vancomicina en el medio de cultivo.

Como se muestra en la Tabla 5 y la figura 4, la utilización de vancomicina en un medio de cultivo tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento (determinado por el TD del crecimiento) de *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium tuberculosis*, en comparación con un medio de cultivo que no contenía agentes antimicrobianos.

El empleo de otros fármacos en un medio de cultivo no tuvo ningún impacto adverso sobre el crecimiento de micobacterias (datos no mostrados) incluso a las mayores concentraciones ensayadas. Las mayores concentraciones de fármacos fueron capaces de suprimir la mayor parte de FRC durante 10-15 días con algunas excepciones de gram-negativos (datos no mostrados).

ES 2 578 753 T3

Tabla 4 - TD de especies de micobacterias en presencia de Azlocilina (AZL)

Organismo	Complemento	TD medio	Desv. Típ. de TD	TD mín.	TD máx.	nº de positivos	nº de analizados
<i>M. avium</i> 25291	Media+ AZL 12	20,1	2,2	17,8	22,8	4,0	4,0
	Media+AZL 24	22,2	1,8	20,7	24,3	4,0	4,0
	Media+AZL 48	21,2	1,6	19,8	23,0	4,0	4,0
	Media sin fármaco	18,6	0,9	17,7	19,5	3,0	3,0
<i>M. fortuitum</i> 6841	Media+ AZL 12	4,0	0,2	3,8	4,2	4,0	4,0
	Media+AZL 24	4,2	0,3	3,8	4,5	4,0	4,0
	Media+AZL 48	4,1	0,2	3,8	4,3	4,0	4,0
	Media sin fármaco	3,8	0,3	3,5	4,0	3,0	3,0
<i>M. intracellulare</i> 13950	Media+ AZL 12	16,4	1,1	15,3	18,0	4,0	4,0
	Media+AZL 24	19,8	4,7	16,8	26,8	4,0	4,0
	Media+AZL 48	20,0	1,1	19,2	20,8	2,0	4,0
	Media sin fármaco	8,5	0,2	8,3	8,7	3,0	3,0
<i>M. kansasii</i> 12478	Media+ AZL 12	18,5	1,1	17,7	19,7	3,0	4,0
	Media+AZL 24	18,9	1,8	16,5	20,5	4,0	4,0
	Media+AZL 48	20,5	#DIV/0!	20,5	20,5	1,0	4,0
	Media sin fármaco	14,8	1,8	13,0	16,5	3,0	3,0
<i>M. scrofulaceum</i> 19981	Media+ AZL 12	24,2	0,2	24,0	24,3	2,0	4,0
	Media+AZL 24						4,0
	Media+AZL 48	21,7	#DIV/0!	21,7	21,7	1,0	3,0
	Media sin fármaco	15,4	0,5	15,0	16,0	3,0	3,0
<i>M. tuberculosis</i> 27294	Media+ AZL 12	15,4	0,8	14,7	16,5	4,0	4,0
	Media+AZL 24	16,0	0,9	15,3	17,3	4,0	4,0
	Media+AZL 48	15,4	0,5	14,7	15,8	4,0	4,0
	Media sin fármaco	15,5	0,8	14,7	16,2	3,0	3,0

ES 2 578 753 T3

<i>M. tuberculosis</i> 25177	Media+ AZL12	22,4	3,7	17,0	24,8	4,0	4,0
	Media+AZL 24	23,8	4,2	20,8	26,8	2,0	4,0
	Media+AZL 48	24,8	0,1	24,7	24,8	2,0	4,0
	Media sin fármaco	23,6	1,3	22,2	24,8	3,0	3,0

Tabla 5 - TD de especies de micobacterias en presencia de Vancomicina (VAN)

Organismo	Complemento	TD medio	Desv. Típ. de TD	TD mín.	TD máx.	nº de positivos	nº de analizados
<i>M. avium</i> 25291	Media+VAN 1,75	20,6	2,2	18,5	22,8	3,0	4,0
	Media+VAN 3,5	21,2	1,6	19,8	22,7	4,0	4,0
	Media+VAN 7	20,6	2,0	18,3	23,2	4,0	4,0
	Media sin fármaco	19,4	0,4	19,0	19,8	3,0	3,0
<i>M. fortuitum</i> 6841	Media+VAN 1,75	4,7	0,3	4,5	5,2	4,0	4,0
	Media+VAN 3,5	4,1	0,3	3,7	4,5	4,0	4,0
	Media+VAN 7	4,8	0,5	4,3	5,3	4,0	4,0
	Media sin fármaco	4,2	0,3	4,0	4,5	3,0	3,0
<i>M. intracellulare</i> 13950	Media+VAN 1,75	9,4	0,1	9,2	9,5	4,0	4,0
	Media+VAN 3,5	9,7	0,3	9,5	10,2	4,0	4,0
	Media+VAN 7	10,3	0,7	9,7	11,2	4,0	4,0
	Media sin fármaco	9,3	0,2	9,2	9,5	3,0	3,0
<i>M. kansasii</i> 12478	Media+VAN 1,75	17,7	0,8	17,0	18,8	4,0	4,0
	Media+VAN 3,5	21,5	0,4	21,2	21,8	2,0	4,0
	Media+VAN 7						4,0
	Media sin fármaco	16,5	0,2	16,3	16,7	3,0	3,0
<i>M. scrofulaceum</i> 19981	Media+VAN 1,75	14,2	1,0	12,8	15,3	4,0	4,0
	Media+VAN 3,5	14,0	1,2	12,2	15,0	4,0	4,0
	Media+VAN 7	15,3	-	15,3	15,3	1,0	1,0
	Media sin fármaco	13,9	0,8	13,2	14,8	3,0	3,0

MTB 25177	Media+VAN 1,75	23,7	0,9	23,0	24,3	2,0	4,0
	Media+VAN 3,5						4,0
	Media+VAN 7						4,0
	Media sin fármaco	22,6	0,8	21,8	23,3		3,0
MTB 27294	Media+VAN 1,75	16,3	0,7	15,3	16,8	4,0	4,0
	Media+VAN 3,5	16,0	0,6	15,5	16,8	4,0	4,0
	Media+VAN 7	18,3	0,9	17,2	19,0	4,0	4,0
	Media sin fármaco	15,4	1,1	14,7	16,7	3,0	3,0

Ejemplo 4. TD de varias especies de micobacterias con varias formulaciones de CAM

Para mejorar el TD de micobacterias, se examinó en varios fármacos su capacidad para suprimir la flora respiratoria contaminante (FRC). A partir de estas evaluaciones, se consideró que la fosfomicina era la mejor elección para la supresión de FRC.

5

Se llevó a cabo un estudio para determinar la mejor formulación posible para una nueva mezcla de CAM, se probaron varias formulaciones que contenían diferentes concentraciones de TMP, AN, FOS y POLY B. Se evaluaron las siguientes fórmulas: (1) CN: Nuevo frasco + complemento nutritivo (CN); (2) LR: Frasco MP convencional/antiguo + líquido de redisolución convencional/antiguo; (3) Fórmula 1: CN+ TMP (30 µg/ml), AN (600 µg/ml), POLY B (1.250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Anf B (180 µg/ml-PI o IFU); and (4) Fórmula 2: CN+ TMP (30 µg/ml), AN (400 µg/ml-PI o IFU), POLY B (1.250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Anf B (180 µg/ml- PI o IFU); (5) Fórmula 3: CN+ TMP (30 µg/ml), AN (400 µg/ml-PI o IFU), POLY B (1.500 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Anf B (180 µg/ml- PI o IFU); (6) Fórmula 4: CN+ TMP (30 µg/ml), AN (600 µg/ml), POLY B (1.250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Anf B (180 µg/ml-PI o IFU); y (7) Fórmula 5: CN+ TMP (50 µg/ml), AN (400 µg/ml-PI o IFU), POLY B (1.250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Anf B (180 µg/ml- PI o IFU); donde TMP es trimetoprim, AN es ácido nalidíxico, POLY B es polimixina B, FOS es fosfomicina y Anf B es anfotericina B.

10

15

El nuevo complemento que contiene ASB exenta de ácidos grasos (EAG), 5 ácidos grasos de cadena larga y de α-cetoglutarato, denominado complemento nutritivo (CN), se preparó y se esterilizó por filtración como se ha explicado anteriormente. Para este estudio se utilizó el nuevo frasco de cultivo MP esterilizable en autoclave (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria). La Tabla 6 presenta la composición del nuevo frasco de cultivo MP y el complemento nutritivo (CN).

20

Tabla 6 - Nuevo frasco de cultivo y nuevas formulaciones del complemento nutritivo

Nuevo frasco de cultivo BacT/ALERT MP		Complemento nutritivo (CN)	
Frasco de cultivo MP		Descripción del material	Cantidad por litro
Materia prima	g/l	Glicerol	50 g
Middlebrook	4,7	Estearato sódico nº 1	0,113 g
		Sal sódica del ácido mirístico nº 2	0,167 g
		Palmitato sódico nº 3	0,088 g
		Oleato sódico nº 4	0,113 g
		Sal sódica del ácido linoleico nº 5	0,111 g
		Albúmina de suero bovino (ASB)	210 g
		Catalasa	0,064 g
		Producto de la digestión pancreática de caseína	20 g
		Piruvato sódico	20 g
		Amaranto	0,04 g
		α-cetoglutarato	5 g

- Para el nuevo CN, se utilizó un frasco esterilizable al autoclave o nuevo BacT/ALERT® MP (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y para el LR convencional/antiguo, se utilizó el frasco MP convencional/antiguo (bioMérieux, Inc.). Antes de la inoculación de los frascos de cultivo MP antiguos o nuevos con micobacterias u otros cultivos de bacterias o levadura, se añadieron 0,5 ml de complemento nutritivo (nuevo CN) o 0,5 ml de LR convencional o antiguo con diferentes fármacos a una serie de frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. El CAM convencional (utilizando LR convencional/antiguo) y nuevas fórmulas del CAM (utilizando CN) se añadieron a la segunda serie de los frascos de cultivo MP. El experimento se llevó a cabo con especies de micobacterias a  $0,5 \times 10^3$  UFC/ml y cultivos de FRC a  $0,5 \times 10^5$  UFC/ml. Los recuentos de colonias se llevaron a cabo también utilizando Middlebrook 7H10 o sangre de oveja o placas con soja y agar-agar tripsínico para comprobar las concentraciones de inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37°C en el sistema no oscilante BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) durante 35 días para cultivos de micobacterias y hasta 15 días para otros cultivos. Se recogieron datos de tiempo de detección (TD) cuando los frascos se declararon positivos con el instrumento de BacT/ALERT®. Los resultados se presentan en la Tabla 7 y las figuras 5A-5F.
- Todas las nuevas fórmulas del CAM consiguieron mejor supresión de bacterias Gram-negativas en comparación con el CAM convencional/antiguo. Hubo crecimiento novedoso de especies de *Staphylococcus* y *Enterococcus* con las nuevas fórmulas en comparación con el CAM convencional/antiguo.
- La Tabla 7 y la Figura 5A presentan el TD de *M. tuberculosis* 18283 con varias formulaciones de CAM. Las 5 nuevas formulaciones presentaron una mejora en TD en comparación con la formulación convencional/antigua del CAM. La mejora en TD para *M. tuberculosis* 18283 con la nueva formulación de CAM fue aproximadamente de 6-8 días.
- La Tabla 7 y la Figura 5B presentan el TD de *M. tuberculosis* 27294 con varias formulaciones de CAM. Las 5 nuevas formulaciones presentaron una mejora en TD en comparación con la formulación convencional/antigua del CAM. La mejora en TD para *M. tuberculosis* 27294 con la nueva formulación de CAM fue aproximadamente de 3-4 días.
- La Tabla 7 y la figura 5C presentan el TD de *M. avium* 569 con varias formulaciones del CAM. Las 5 nuevas formulaciones presentaron una mejora en el TD en comparación con la formulación convencional/antigua del CAM. La mejora en TD para *M. avium* 569 con la nueva formulación del CAM fue aproximadamente de 6-7 días.
- La Tabla 7 y la figura 5D presentan el TD de *M. intracellulare* 13950 con varias formulaciones del CAM. Las 5 nuevas formulaciones presentaron una mejora en TD en comparación con la formulación convencional/antigua del CAM. La mejora en TD para *M. intracellulare* 13950 con la nueva formulación de CAM fue aproximadamente de 8-9 días.
- La Tabla 7 y la figura 5E presentan el TD de *M. scrofulaceum* 19981 con varias formulaciones del CAM. Las 5 nuevas formulaciones presentaron una mejora en TD en comparación con la formulación convencional/antigua del CAM. La mejora en TD para *M. scrofulaceum* 19981 con la nueva formulación de CAM fue aproximadamente de 6-7 días. Particularmente, 2 de las 5 muestras analizadas para *M. scrofulaceum* 19981 no presentaron crecimiento con la formulación convencional/antigua del CAM.
- La Tabla 7 y la figura 5D presentan el TD de *M. kansasii* 12478 con varias formulaciones del CAM. Las 5 nuevas formulaciones presentaron una mejora en TD en comparación con la formulación convencional/antigua del CAM. La detección del TD para *M. kansasii* 12478 fue aproximadamente de 13-14 días con el CAM nuevo en comparación con la falta de crecimiento detectada con la formulación convencional/antigua del CAM.

Tabla 7 - TD de varias especies

Organismo	LR	Complemento	TD medio	Desv. Típ. de TD	TD min.	TD máx.	nº de positivos	nº de analizados
<i>M. avium</i> 569	1	CN sin fármacos	9,2	0,5	8,7	9,7	3,0	3,0
	3	CN + fórmula 1	9,0	0,6	8,5	10,0	5,0	5,0
	4	CN + fórmula 2	9,3	0,6	8,8	10,3	5,0	5,0
	5	CN + fórmula 3	8,4	0,3	8,0	8,7	5,0	5,0
	6	CN + fórmula 4	8,5	0,2	8,3	8,8	5,0	5,0
	7	CN + fórmula 5	9,2	0,3	8,7	9,5	5,0	5,0
	8	LR sin fármacos	9,4	0,4	9,0	9,7	3,0	3,0
	9	LR+ CAM antiguo	14,6	0,4	14,3	15,0	3,0	3,0
	<i>M. intracellulare</i> 13950	1	CN sin fármacos	9,2	0,1	9,2	9,3	3,0
3		CN + fórmula 1	9,5	0,3	9,0	9,7	5,0	5,0
4		CN + fórmula 2	9,4	0,1	9,3	9,5	5,0	5,0
5		CN + fórmula 3	9,4	0,3	9,0	9,7	5,0	5,0
6		CN + fórmula 4	10,0	0,2	9,7	10,3	5,0	5,0
7		CN+ fórmula 5	9,2	0,2	9,0	9,5	5,0	5,0
8		LR sin fármacos	8,1	0,1	8,0	8,2	3,0	3,0
9		LR+ CAM antiguo	17,2	1,3	15,8	18,2	3,0	3,0
<i>M. kansasii</i> 12478		1	CN sin fármacos	12,3	0,6	11,7	12,8	3,0
	3	CN + fórmula 1	13,7	0,3	13,3	14,2	5,0	5,0
	4	CN + fórmula 2	13,4	0,7	12,7	14,3	5,0	5,0
	5	CN + fórmula 3	13,4	0,5	13,0	14,2	5,0	5,0
	6	CN + fórmula 4	13,9	0,6	13,2	14,8	5,0	5,0
	7	CN+ fórmula 5	14,0	0,8	13,0	15,3	5,0	5,0
	8	LR sin fármacos	17,3	0,5	16,7	17,7	3,0	3,0
	9	LR+ CAM antiguo						3,0
	<i>M. scrofulaceum</i> 19981	1	CN sin fármacos	12,3	0,4	12,0	12,7	3,0
3		CN + fórmula 1	11,0	0,5	10,3	11,5	5,0	5,0
4		CN + fórmula 2	11,1	0,1	11,0	11,3	5,0	5,0
5		CN + fórmula 3	11,1	0,3	10,5	11,3	5,0	5,0
6		CN + fórmula 4	11,3	0,2	11,2	11,5	5,0	5,0
7		CN+ fórmula 5	10,8	0,3	10,5	11,2	5,0	5,0
8		LR sin fármacos	12,3	0,2	12,2	12,5	3,0	3,0
9		LR+ CAM antiguo	17,5	1,1	16,7	18,3	2,0	3,0
MTB 18283		1	CN sin fármacos	9,3	0,1	9,2	9,3	3,0
	3	CN + fórmula 1	10,1	0,9	9,2	11,3	5,0	5,0
	4	CN + fórmula 2	9,5	0,4	9,0	10,0	5,0	5,0
	5	CN + fórmula 3	9,7	0,3	9,5	10,3	5,0	5,0
	6	CN + fórmula 4	10,8	0,3	10,5	11,2	5,0	5,0
	7	CN+ fórmula 5	10,1	0,6	9,5	10,8	5,0	5,0
	8	LR sin fármacos	11,3	0,5	10,8	11,7	3,0	3,0
	9	LR+ CAM antiguo	17,5	0,9	16,5	18,2	3,0	3,0
	MTB 27294	1	CN sin fármacos	13,6	0,6	13,3	14,3	3,0
3		CN + fórmula 1	12,9	0,1	12,8	13,0	5,0	5,0
4		CN + fórmula 2	13,1	0,3	12,7	13,5	5,0	5,0
5		CN + fórmula 3	13,0	0,3	12,8	13,5	5,0	5,0

Organismo	LR	Complemento	TD medio	Desv. Típ. de TD	TD mín.	TD máx.	nº de positivos	nº de analizados
	6	CN + fórmula 4	13,2	0,4	12,7	13,7	5,0	5,0
	7	CN+ fórmula 5	12,5	0,3	12,2	13,0	5,0	5,0
	8	LR sin fármacos	12,6	0,4	12,2	13,0	3,0	3,0
	9	LR+ CAM antiguo	14,8	0,8	14,0	15,5	3,0	3,0

Ejemplo 5. Comparación de la anterior formulación del CAM frente a la nueva formulación del CAM para el TD de crecimiento del complejo *M. tuberculosis*

5 La fórmula del nuevo frasco MP, el complemento nutritivo CN y la fórmula 5 del CAM nuevo se seleccionaron para experimentación ulterior. Este estudio se llevó a cabo con cepas del complejo *M. tuberculosis* incluidas *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium tuberculosis*. La composición de la fórmula 5 era: CN+ TMP (50 µg/ml), AN (400 µg/ml-PI o IFU), POLY B (1.250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Anf B (180 µg/ml- PI o IFU).

10 Para las nuevas formulas y el CN, se utilizó un nuevo frasco BacT/ALERT® MP esterilizable al autoclave (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y para el LR convencional/antiguo, se utilizó el frasco MP convencional/antiguo (bioMérieux, Inc.). Antes de la inoculación de los frascos de cultivo MP antiguos o nuevos con cultivos de micobacterias, se añadieron 0,5 ml de complemento nutritivo (nuevo CN) o 0,5 ml de LR convencional/antiguo con diferentes fármacos a una serie de frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. El CAM  
15 convencional (utilizando LR convencional/antiguo) y nuevas fórmulas de CAM (utilizando CN) se añadieron a la segunda serie de frascos de cultivo MP.

El inóculo de micobacterias fue de  $0,5 \times 10^3$  UFC/ml. Los recuentos de colonias se llevaron a cabo también utilizando Middlebrook 7H10 o sangre de oveja o placas con soja y agar-agar tripsínico para comprobar las concentraciones de inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37°C en el sistema no oscilante BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) durante 35 días para cultivos de micobacterias. Se recogieron datos del tiempo  
20 de detección (TD) cuando los frascos se declararon positivos con el instrumento BacT/ALERT.

El crecimiento (como TD de crecimiento) se determinó para cepas del complejo *M. tuberculosis* comparando el LR convencional/antiguo y CAM (LR + CAM convencional/antiguo) y el nuevo complemento nutritivo y el CAM nuevo (CN+ CAM nuevo). El TD se determinó para cuatro de cada cinco cepas del complejo *M. tuberculosis* es decir *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium tuberculosis* en LR +  
25 medio de cultivo CAM convencional/antiguo y CN+ medio de cultivo de CAM nuevo. Los resultados se presentan en la Tabla 8 y la figura 6.

Como se muestra en la Tabla 8 y la figura 6, CN+ CAM nuevo presenta una mejora aproximada de 1-10 días en el TD para el crecimiento de la cepa del complejo *M. tuberculosis* en comparación con LR + CAM convencional/antiguo.

30 Tabla 8 - TD del complejo *M. tuberculosis*

Organismo	Complemento	TD medio (días)	Desv. Típ. de TD (días)	TD mín. (días)	TD máx. (días)	nº de positivos	nº de analizados
<i>M. africanum</i> 25420	CN + fórmula 5	14,2	0,3	13,8	14,7	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	15,5	0,8	14,8	16,3	3,0	3,0
<i>M. bovis</i> 8131	CN + fórmula 5	18,4	1,3	17,2	19,7	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	20,4	2,1	18,2	22,3	3,0	3,0
<i>M. microti</i> 19422	CN + fórmula 5	15,0	1,4	12,8	16,3	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	16,6	0,3	16,2	16,8	3,0	3,0
MTB 18283	CN + fórmula 5	10,1	0,2	9,7	10,2	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	20,9	1,8	19,2	22,7	3,0	3,0

Organismo	Complemento	TD medio (días)	Desv. Típ. de TD (días)	TD mín. (días)	TD máx. (días)	nº de positivos	nº de analizados
MTB 25177	CN + fórmula 5	19,9	1,3	18,3	21,2	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	32,4	1,6	31,3	34,2	3,0	3,0
MTB 27294	CN + fórmula 5	14,1	0,4	13,7	14,7	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	16,8	0,5	16,3	17,3	3,0	3,0

Ejemplo 6. Comparación de la formulación anterior del CAM frente a la nueva formulación del CAM para el TD de crecimiento de micobacterias distintas de *tuberculosis* (MDDT)

5 La fórmula del nuevo frasco MP, el complemento nutritivo CN y la fórmula 5 del CAM nuevo se seleccionaron para experimentación ulterior. Este estudio se llevó a cabo con cepas de micobacterias distintas de *tuberculosis* (MDDT) incluidas *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium scrofilaceum*. La composición de la fórmula 5 era: CN+ TMP (50 µg/ml), AN (400 µg/ml-PI o IFU), POLY B (1.250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Anf B (180 µg/ml- PI o IFU).

10 Para las nuevas formulas y el nuevo CN, se utilizó un nuevo frasco BacT/ALERT® MP esterilizable al autoclave (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y para el LR convencional/antiguo, se utilizó el frasco MP convencional/antiguo (bioMérieux, Inc.). Antes de la inoculación de los frascos de cultivo MP antiguos o nuevos con cultivos de micobacterias, se añadieron 0,5 ml de complemento nutritivo (nuevo CN) o 0,5 ml de LR convencional/antiguo con diferentes fármacos a una serie de frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. El CAM convencional (utilizando LR convencional/antiguo) y nuevas fórmulas de CAM (utilizando CN) se añadieron a la  
15 segunda serie de frascos de cultivo MP.

20 El inóculo de micobacterias era de  $0,5 \times 10^3$  UFC/ml. Los recuentos de colonias se llevaron a cabo también utilizando Middlebrook 7H10 o sangre de oveja o placas con soja y agar-agar tripsínico para comprobar las concentraciones de inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37°C en el sistema no oscilante BacT/ALERT3D (bioMérieux, Inc.) durante 35 días para cultivos de micobacterias. Se recogieron datos de tiempo de detección (TD) cuando los frascos se declararon positivos con el instrumento de BacT/ALERT®. Los resultados se presentan en la Tabla 9 y la figura 7.

Como se muestra en la Tabla 9 y la figura 7, CN + CAM nuevo presenta una mejora aproximada de 1-12 días en el TD para las *Mycobacteria* distintas de *tuberculosis* en comparación con LR + CAM convencional/antiguo.

Tabla 9 - TD de micobacterias distintas de *tuberculosis* (MDDT)

Organismo	Complemento	TD medio (días)	Desv. Típ. de TD (días)	TD mín. (días)	TD máx. (días)	nº de positivos	nº de analizados
<i>M. avium</i> 25291	CN + fórmula 5	11,8	0,4	11,5	12,5	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	12,9	0,7	12,3	13,7	3,0	3,0
<i>M. avium</i> 569	CN + fórmula 5	14,2	1,3	12,7	15,7	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	20,0	1,8	18,7	21,2	2,0	3,0
<i>M. intracellulare</i> 13950	CN + fórmula 5	8,6	0,3	8,2	9,0	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	16,0	0,9	15,0	16,8	3,0	3,0
<i>M. intracellulare</i> 644	CN + fórmula 5	13,8	1,0	12,7	14,7	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	29,9	2,6	28,0	31,7	2,0	3,0

Organismo	Complemento	TD medio (días)	Desv. Típ. TD (días)	TD mín. (días)	TD máx. (días)	nº de positivos	nº de analizados
<i>M. kansasii</i> 12478	CN + fórmula 5	13,6	0,6	12,8	14,5	5,0	5,0
	LR + CAM antiguo	31,5	2,6	30,0	34,5	3,0	3,0
<i>M. scrofulaceum</i> 19981	CN + fórmula 5	10,0	0,3	9,7	10,5	5,0	5,0
	LR+CAM antiguo	17,9	0,3	17,7	18,2	3,0	3,0

Ejemplo 7. Comparación de la formulación anterior de CAM frente a dos formulaciones nuevas de CAM con diferentes concentraciones de FOS para el TD de cepas de *M. tuberculosis*

5 La fórmula 5 del CAM nuevo se perfeccionó más para conseguir mejor supresión de FRC aumentando la concentración de FOS desde 600 µg/ml a 800 µg/ml. El estudio siguiente se llevó a cabo con 10 cepas de *M. tuberculosis* a  $0,5 \times 10^3$  UFC/ml. Diez cepas de *M. tuberculosis* constaban de cuatro cepas de CDC, cinco cepas virulentas ATCC y una cepa QC de referencia.

10 Para las nuevas formulas y el nuevo CN, se utilizó un nuevo frasco BacT/ALERT® MP esterilizable al autoclave (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y para el LR convencional/antiguo, se utilizó el frasco MP convencional/antiguo (bioMérieux, Inc.). Antes de la inoculación de los frascos de cultivo MP antiguos o nuevos con cultivos de micobacterias, se añadieron 0,5 ml de complemento nutritivo (nuevo CN) o 0,5 ml de LR convencional/antiguo con diferentes fármacos a una serie de frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. El CAM convencional (utilizando LR convencional/antiguo) y nuevas formulas de CAM (utilizando CN) se añadieron a la segunda serie de frascos de cultivo MP.

15 El inóculo de micobacterias fue de  $0,5 \times 10^3$  UFC/ml. Los recuentos de colonias se llevaron a cabo también utilizando Middlebrook 7H10 o sangre de oveja o placas con soja y agar-agar tripsínico para comprobar las concentraciones de inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37°C en el sistema no oscilante BacT/ALERT3D (bioMérieux, Inc.) durante 35 días para cultivos de micobacterias. Se recogieron datos de tiempo de detección (TD) cuando los frascos se declararon positivos con el instrumento de BacT/ALERT®. Los resultados se  
20 presentan en la Tabla 10.

Como se muestra en la Tabla 10, las nuevas fórmulas de CAM presentaban una mejora aproximada de 2-8 días en el TD para las cepas de *M. tuberculosis* en comparación con LR + CAM convencional/antiguo.

Tabla 10 - TD de varias cepas de *M. tuberculosis* con nuevas fórmulas de CAM que contienen 600 µg/ml (CAM 5) y 800 µg/ml (fórmula 5+ 200 µg/ml de FOS)

Organismo	Cepa ID	Complemento	TD medio (días)	Desv. Típ. de TD (días)	TD mín. (días)	TD máx. (días)	nº de positivos	nº de analizados
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2663	CN + fórmula 5	15,1	0,8	14,0	16,0	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	15,3	0,3	14,8	15,7	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	17,9	0,2	17,7	18,3	5,0	5,0
	2677	CN + fórmula 5	17,3	0,5	16,7	18,0	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	17,2	0,6	16,5	18,0	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	22,1	0,6	21,3	22,8	5,0	5,0

Organismo	Cepa ID	Complemento	TD medio (días)	Desv. Típ. de TD (días)	TD mín. (días)	TD máx. (días)	nº de positivos	nº de analizados
	18283	CN + fórmula 5	8,9	0,5	8,3	9,5	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	9,5	0,3	9,0	9,7	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	17,0	0,8	16,0	18,2	5,0	5,0
	18292	CN + fórmula 5	13,9	0,7	13,3	14,7	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	14,1	0,3	13,7	14,5	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	15,8	0,8	15,2	17,2	5,0	5,0
	25177	CN + fórmula 5	16,0	0,4	15,5	16,3	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	16,3	0,8	15,2	17,3	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	19,1	0,3	18,8	19,5	5,0	5,0
	27294	CN + fórmula 5	14,1	0,4	13,5	14,5	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	14,5	0,5	13,8	15,2	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	16,3	0,4	15,7	16,7	5,0	5,0
	35822	CN + fórmula 5	15,0	0,8	13,7	16,0	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	15,7	0,3	15,3	16,2	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	17,9	0,6	17,2	18,8	5,0	5,0
	35837	CN + fórmula 5	14,8	1,0	13,5	16,3	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	15,2	0,2	15,0	15,3	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	17,8	0,4	17,2	18,2	5,0	5,0
	35838	CN + fórmula 5	15,5	0,6	14,8	16,2	5,0	5,0
		CN + fórmula 5+FOS 200	15,7	0,4	15,2	16,2	5,0	5,0
		LR+CAM antiguo	17,0	0,6	16,2	17,5	5,0	5,0

Ejemplo 8. Comparación de la formulación anterior de CAM frente a las dos formulaciones nuevas de CAM con diferentes concentraciones de FOS para la supresión de la flora respiratoria contaminante (FRC)

- 5 La fórmula 5 del CAM nuevo se perfeccionó más para conseguir mejor supresión de FRC aumentando la concentración de FOS desde 600 µg/ml a 800 µg/ml. Se determinó el crecimiento o la falta de crecimiento (FC) para varios cultivos de bacterias y levadura gram-positivos o gram-negativos comparando el LR convencional/antiguo y CAM (LR + CAM convencional/antiguo) y nuevo complemento nutritivo y nuevas formulaciones de CAM CN+ CAM nuevo). Las nuevas formulaciones de CAM contenían fórmula 5 + 200 µg/ml de FOS (un total de 800 µg/ml de FOS). Se analizaron las FRC a  $0,6 \times 10^4$  UFC/ml. Los recuentos de colonias se llevaron a cabo también utilizando sangre de oveja o placas con soja y agar-agar tripsínico para comprobar las concentraciones de inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37 °C en el sistema no oscilante BacT/ALERT® 3D (bioMérieux,
- 10

Inc.) durante 15 días para todos los cultivos. Se recogieron datos de tiempo de detección (TD) cuando los frascos se declararon positivos con el instrumento de BacT/ALERT®.

La Tabla 11 demuestra que la nueva formulación de CAM era una formulación mejor para suprimir el crecimiento de FRC en comparación con la formulación de CAM convencional/antiguo.

5

Tabla 11 - Tabla que presenta la supresión de la flora respiratoria contaminante (FRC)

Organismo	Cepa ID	Complemento	Contaminación novedosa
<i>Candida albicans</i>	11006	CN + fórmula 5	FC
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	FC
	302876	CN + fórmula 5	FC
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	1/5
<i>Enterococcus faecalis</i>	8711	CN + fórmula 5	5/5
		CN + fórmula 5 + FOS 200	1/5
		LR + CAM antiguo	FC
	8340 (VRE)	CN + fórmula 5	5/5
		CN+ fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	3/5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	109241	CN + fórmula 5	FC
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	FC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	CN + fórmula 5	FC
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	1/5
	106159	CN + fórmula 5	FC
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	FC
<i>Staphylococcus aureus</i>	12535	CN + fórmula 5	5/5
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	FC
	25923	CN + fórmula 5	5/5

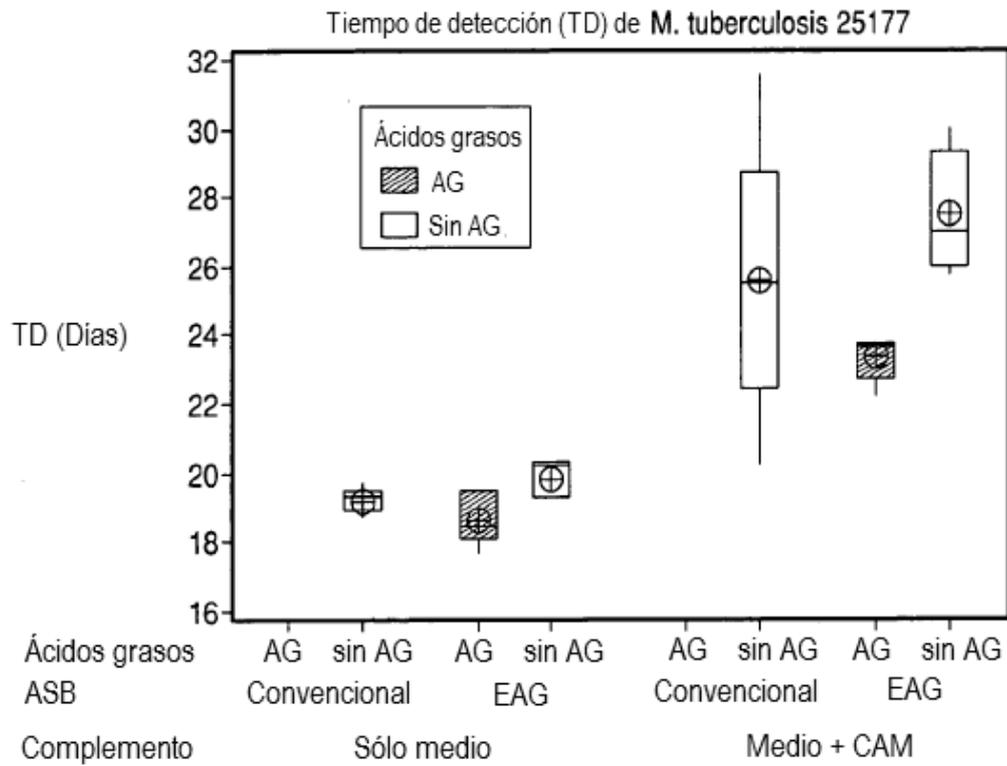
ES 2 578 753 T3

Organismo	Cepa ID	Complemento	Contaminación novedosa
		CN + fórmula 5 + FOS 200	2/5
		LR + CAM antiguo	FC
		13305 (MRSA)	CN + fórmula 5
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	FC
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7104	CN + fórmula 5	5/5
		CN + fórmula 5 + FOS 200	1/5
		LR + CAM antiguo	FC
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13637	CN + fórmula 5	FC
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	FC
	106259	CN + fórmula 5	5/5
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	2/5
<i>Streptococcus oralis</i>	12975	CN + fórmula 5	FC
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	FC
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	CN + fórmula 5	5/5
		CN + fórmula 5 + FOS 200	FC
		LR + CAM antiguo	FC

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para el aumento de crecimiento de micobacterias que comprende añadir a una muestra que se sospecha que contiene micobacterias a un medio de cultivo que contiene ASB exenta de ácidos grasos, un complemento de ácidos grasos que comprende uno o más ácidos grasos de cadena larga, teniendo dichos ácidos grasos 10 o más átomos de carbono, y un complemento antimicrobiano que comprende uno o más agentes antimicrobianos en donde dicho complemento antimicrobiano comprende fosfomicina, y someter el medio de cultivo a condiciones adecuadas para el cultivo de dichas micobacterias, en donde dicha ASB exenta de ácidos grasos y una o más de dichos ácidos grasos de cadena larga aumentan el crecimiento de dichas micobacterias en comparación con el medio de cultivo que no contiene una ASB exenta de ácidos grasos y un complemento de ácidos grasos que comprende uno o más ácidos grasos de cadena larga.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho aumento de crecimiento comprende la reducción del tiempo de detección del crecimiento de micobacterias en al menos aproximadamente 1 día.
3. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dichos ácidos grasos se seleccionan del grupo consistente en ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y una de sus sales.
4. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho complemento antimicrobiano comprende uno o más antimicrobianos en una cantidad suficiente para inhibir la contaminación bacteriana, de levadura o micótica en dicho medio de cultivo y en donde una o más de dichas sustancias antimicrobianas se seleccionan del grupo consistente en antibióticos, bacteriostáticos, bactericidas, antibacterianos, antivíricos, antimicóticos, antiprotozoarios y antiparasitarios y opcionalmente en donde dicho uno o más antimicrobianos comprende uno o más antibióticos, y en donde dicho uno o más antibióticos se seleccionan del grupo consistente en polimixina B, vancomicina, azlocilina, anfotericina B, ácido nalidíxico y trimetoprim.
5. Un método para el diagnóstico de infecciones producidas por una especie de micobacteria, que comprende las etapas siguientes: (a) proporcionar un medio de cultivo; (b) añadir un complemento nutritivo a dicho medio de cultivo, complemento nutritivo que comprende ASB exenta de ácidos grasos y uno o más ácidos grasos de cadena larga, teniendo dichos ácidos grasos 10 o más átomos de carbono, en donde dicha ASB exenta de ácidos grasos y uno o más de dichos ácidos grasos de cadena larga aumentan el crecimiento de dichas micobacterias en comparación con el medio de cultivo que no contiene una ASB exenta de ácidos grasos y un complemento de ácidos grasos que comprende uno o más ácidos grasos de cadena larga; (c) añadir una muestra para la que debe determinarse la presencia o ausencia de dicha especie de micobacteria; y (d) analizar en dicho cultivo la presencia de dicha especie de micobacteria, en donde un descubrimiento de la presencia de dicha especie de micobacteria indica un diagnóstico positivo de dicha infección.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dichos ácidos grasos se seleccionan del grupo consistente en ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y una de sus sales.
7. El método de las reivindicaciones 5-6, en donde dicho medio de cultivo comprende además un complemento antimicrobiano y en donde dicho complemento antimicrobiano se añade antes de la adición de dicha muestra en la etapa (c) y opcionalmente en donde dicho complemento antimicrobiano comprende uno o más antibióticos seleccionados del grupo consistente en polimixina B, vancomicina, azlocilina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y fosfomicina.
8. Un equipo para detectar el crecimiento de micobacterias en un medio de cultivo, comprendiendo dicho equipo: (1) un frasco de cultivo que contiene un medio de cultivo básico; (2) un complemento nutritivo que comprende ASB exenta de ácidos grasos y uno o más ácidos grasos de cadena larga, teniendo dichos ácidos grasos 10 o más átomos de carbono; y (3) un complemento antimicrobiano que comprende uno o más uno o más agentes antimicrobianos para suprimir el crecimiento de la flora respiratoria contaminante en dicho medio de cultivo, en donde dicha ASB exenta de ácidos grasos y una o más de dichos ácidos grasos de cadena larga aumentan el crecimiento de dichas micobacterias en comparación con el medio de cultivo que no contiene una ASB exenta de ácidos grasos y un complemento de ácidos grasos que comprende uno o más ácidos grasos de cadena larga.
9. El equipo de la reivindicación 8, en donde dicho aumento de crecimiento comprende la reducción del tiempo de detección del crecimiento de micobacterias en al menos aproximadamente 1 día.
10. El equipo de la reivindicación 8 o 9, en donde dicho medio de cultivo básico es Middlebrook 7H9 y/o no contiene componentes térmicamente lábiles y preferiblemente en donde dicho frasco de cultivo y dicho medio de cultivo básico se esterilizan al autoclave.
11. El equipo de las reivindicaciones 8-10, en donde dichos ácidos grasos se seleccionan del grupo consistente en ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y una de sus sales.
12. El equipo de las reivindicaciones 8-11, en donde dicho complemento antimicrobiano comprende fosfomicina y opcionalmente comprende además uno o más antibióticos adicionales seleccionados del grupo consistente en polimixina B, vancomicina, azlocilina, anfotericina B, ácido nalidíxico y trimetoprim.

**Fig. 1A**



**Fig. 1B**

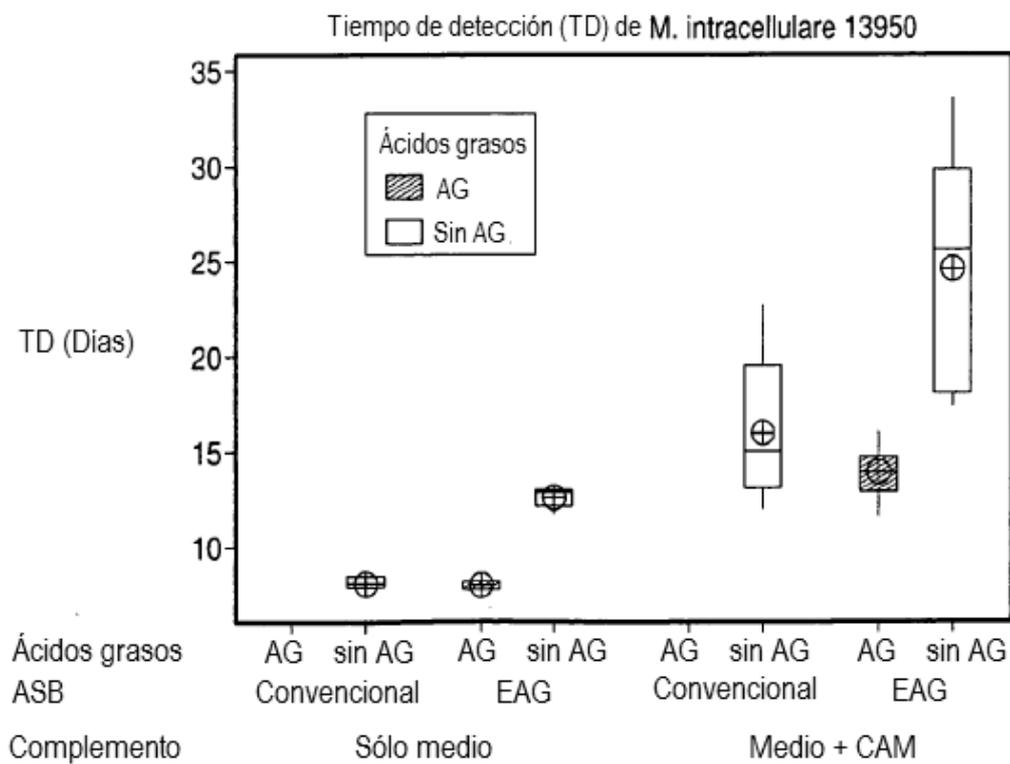


Fig. 1C

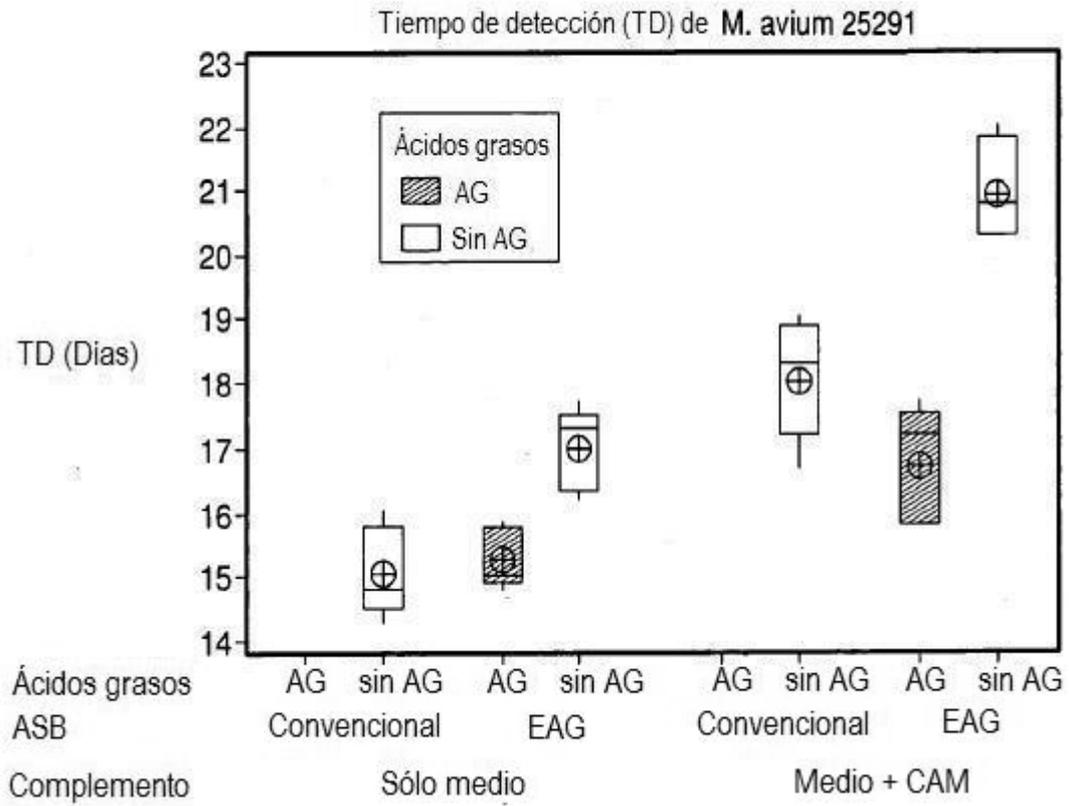


Fig. 2

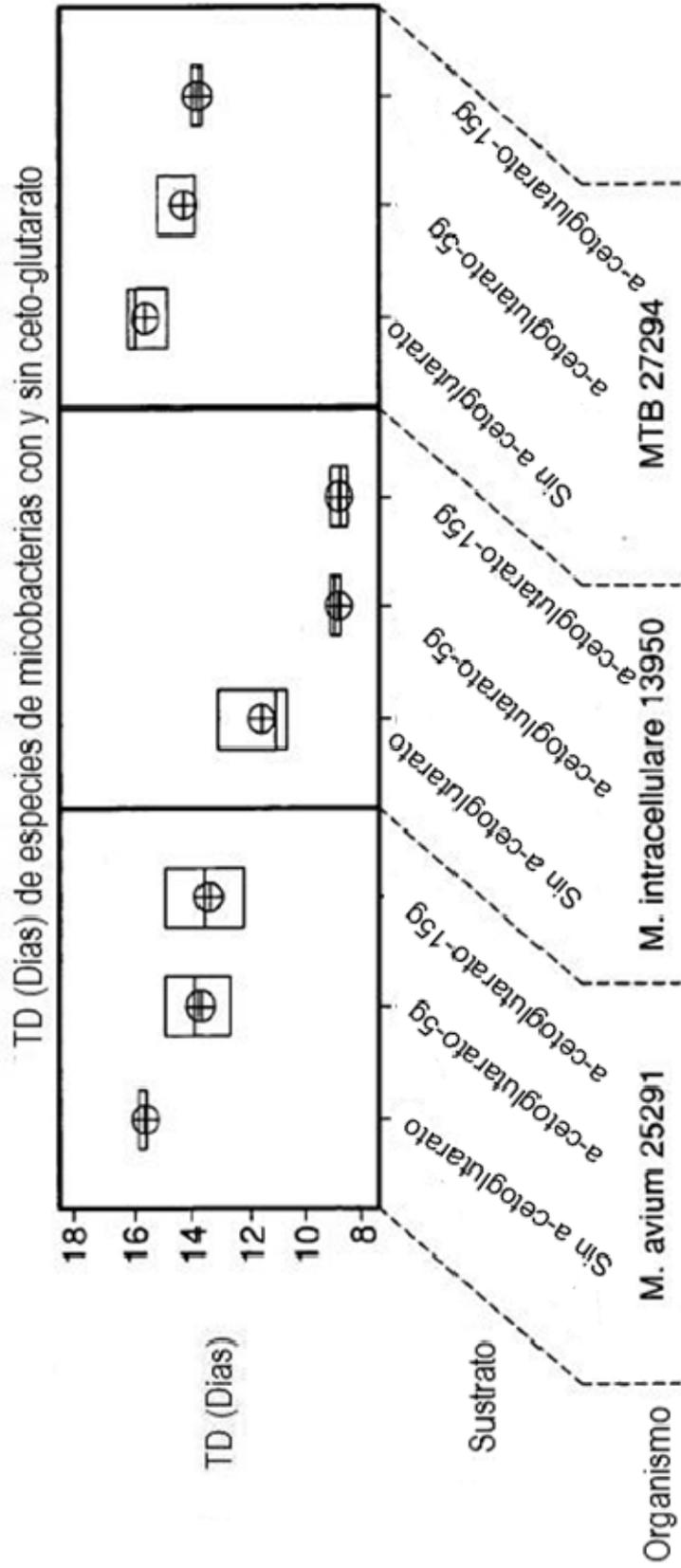




Fig. 4

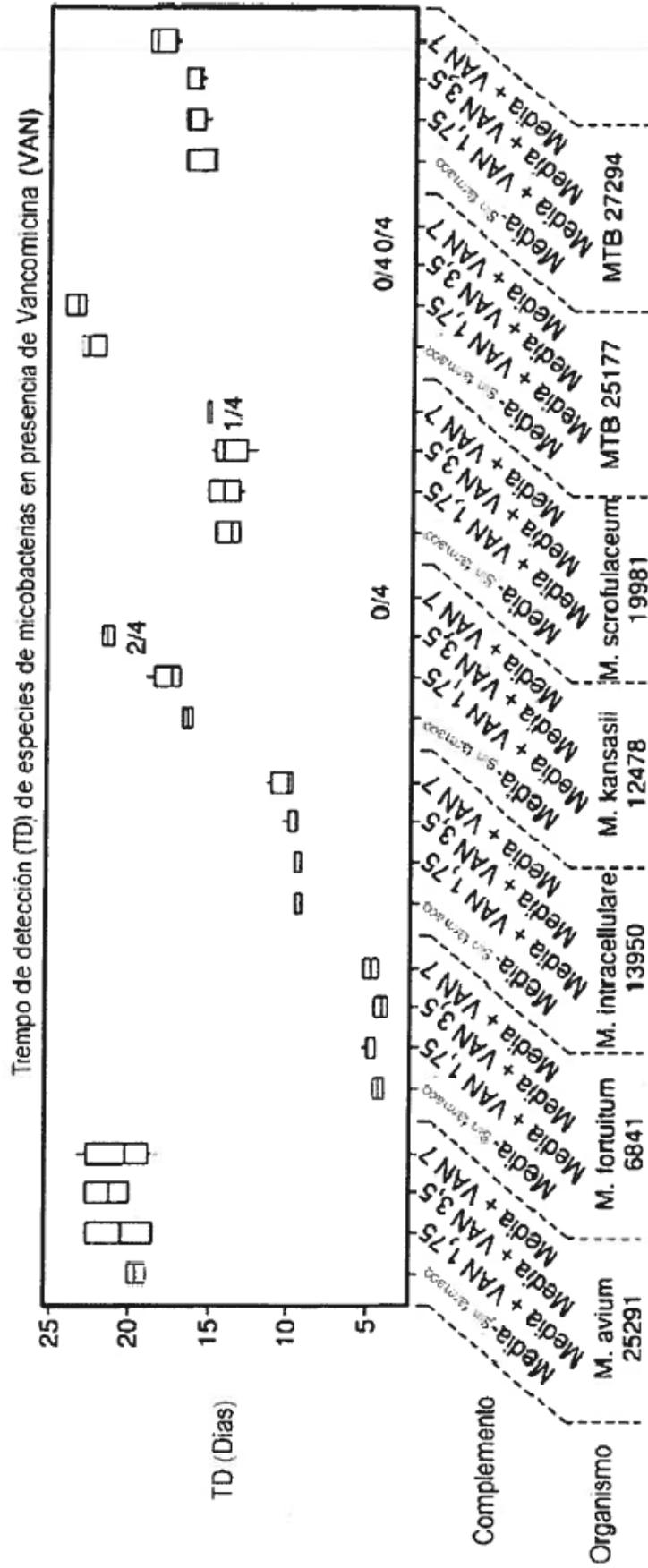


Fig. 5A

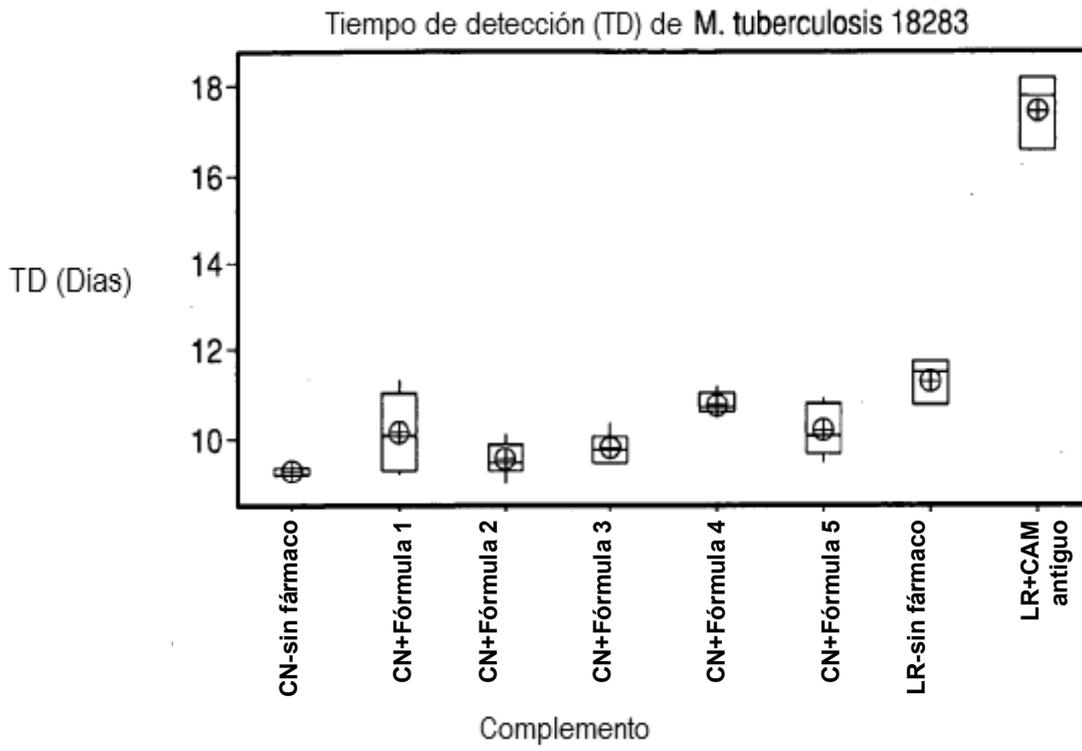


Fig. 5B

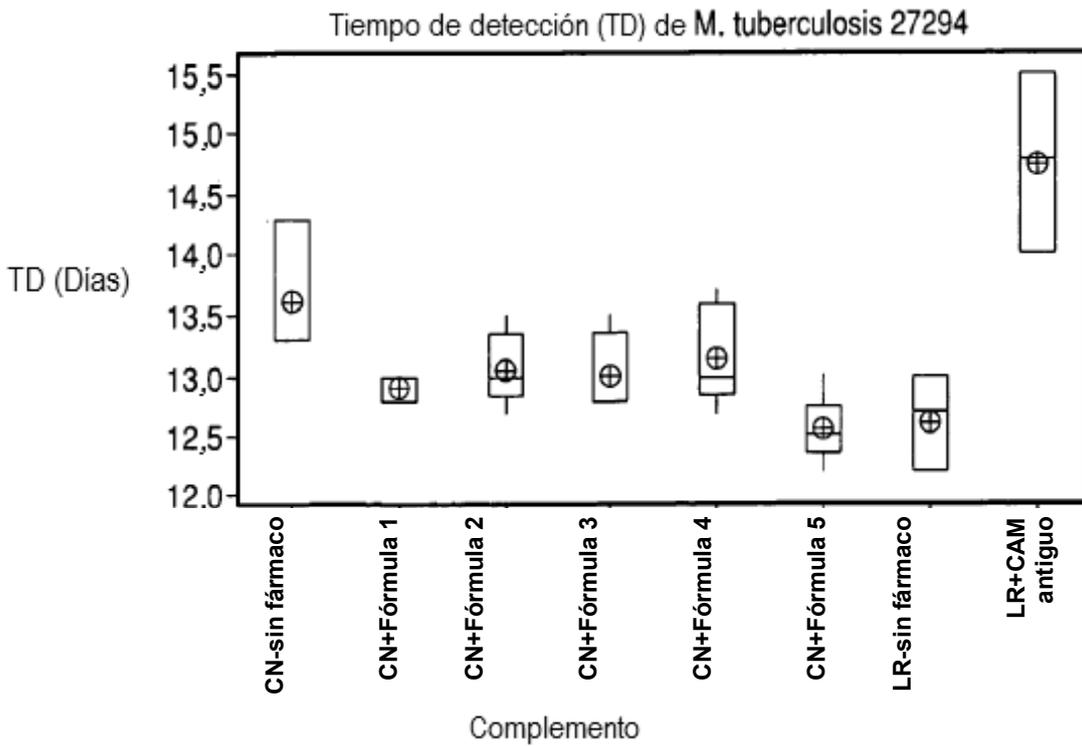


Fig. 5C

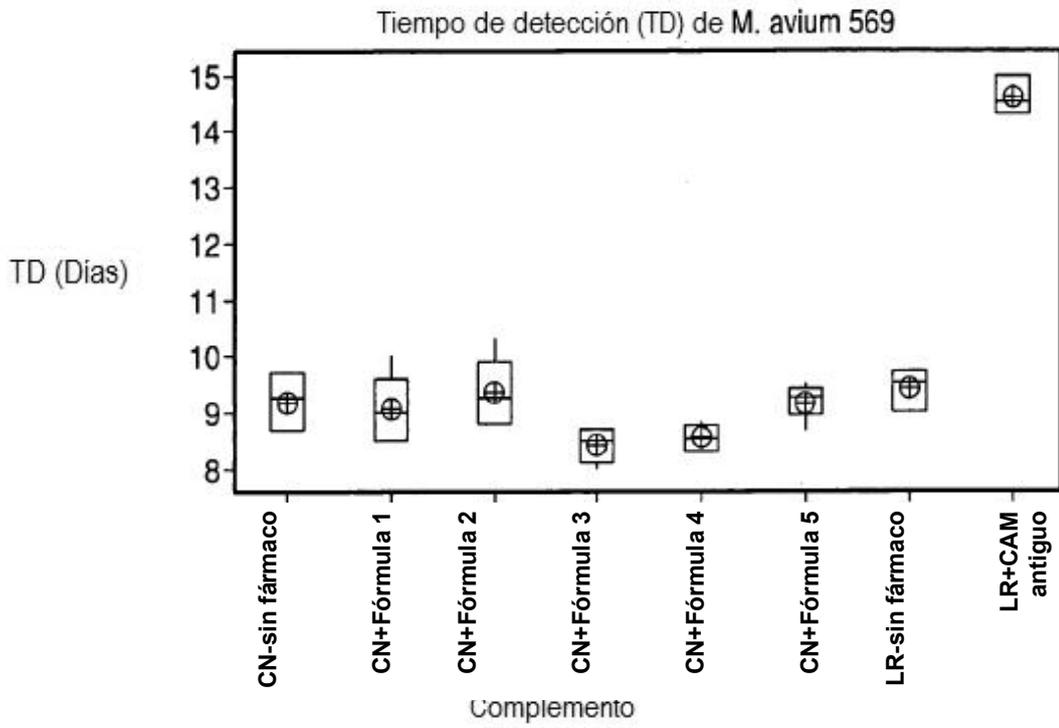


Fig. 5D

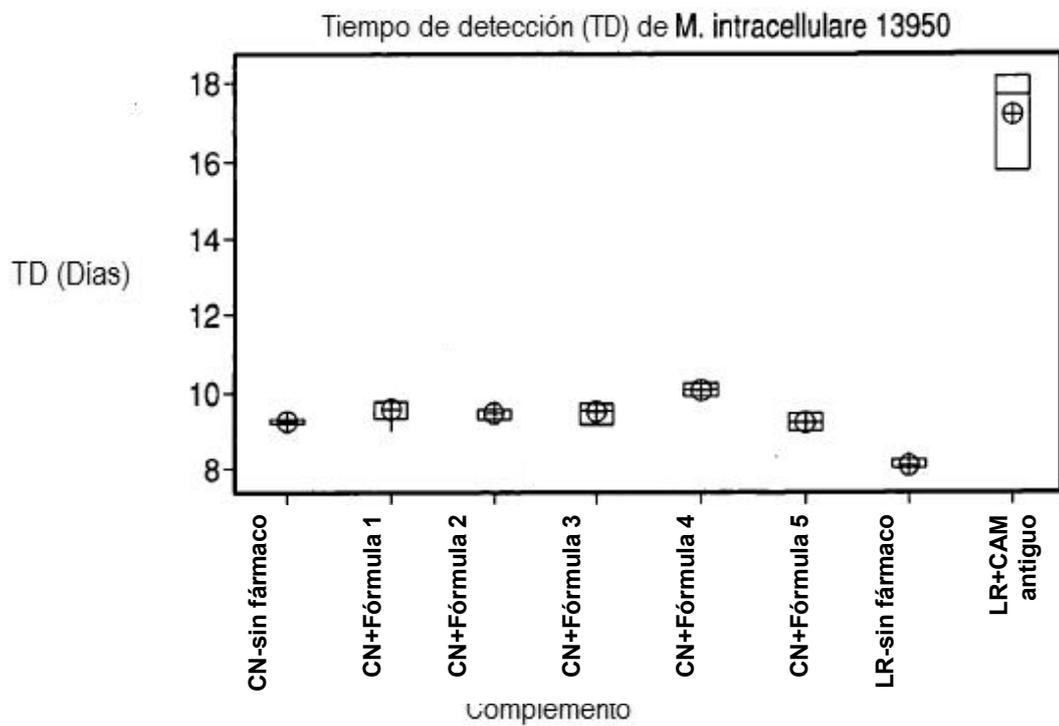


Fig. 5E

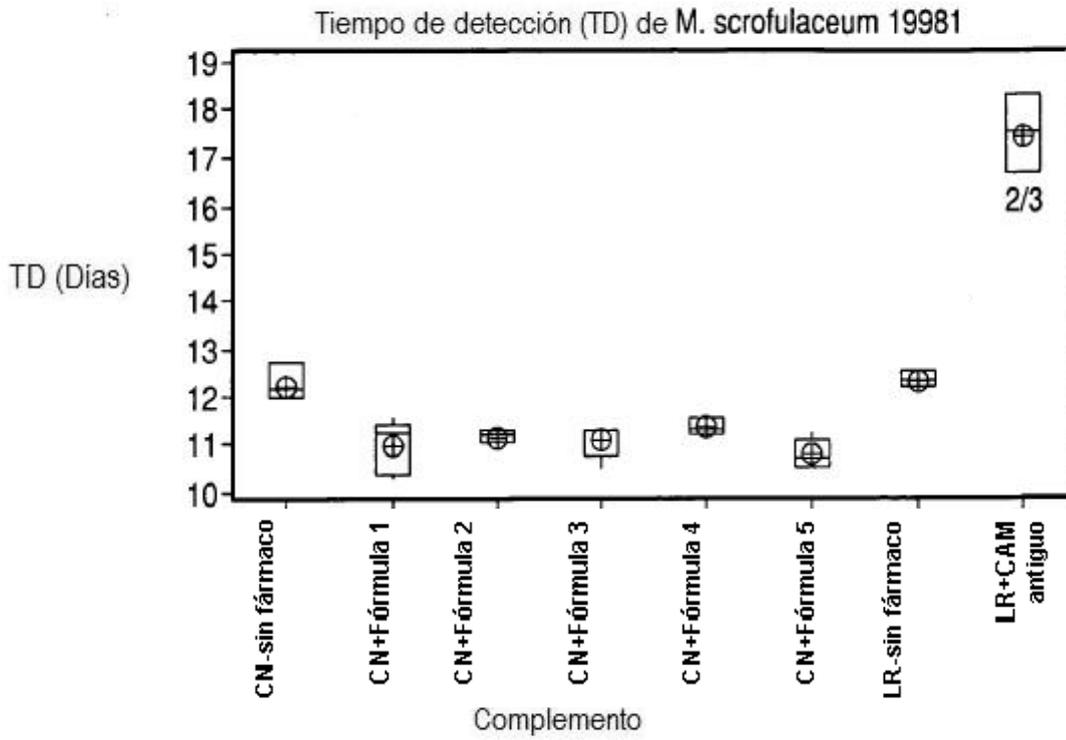


Fig. 5F

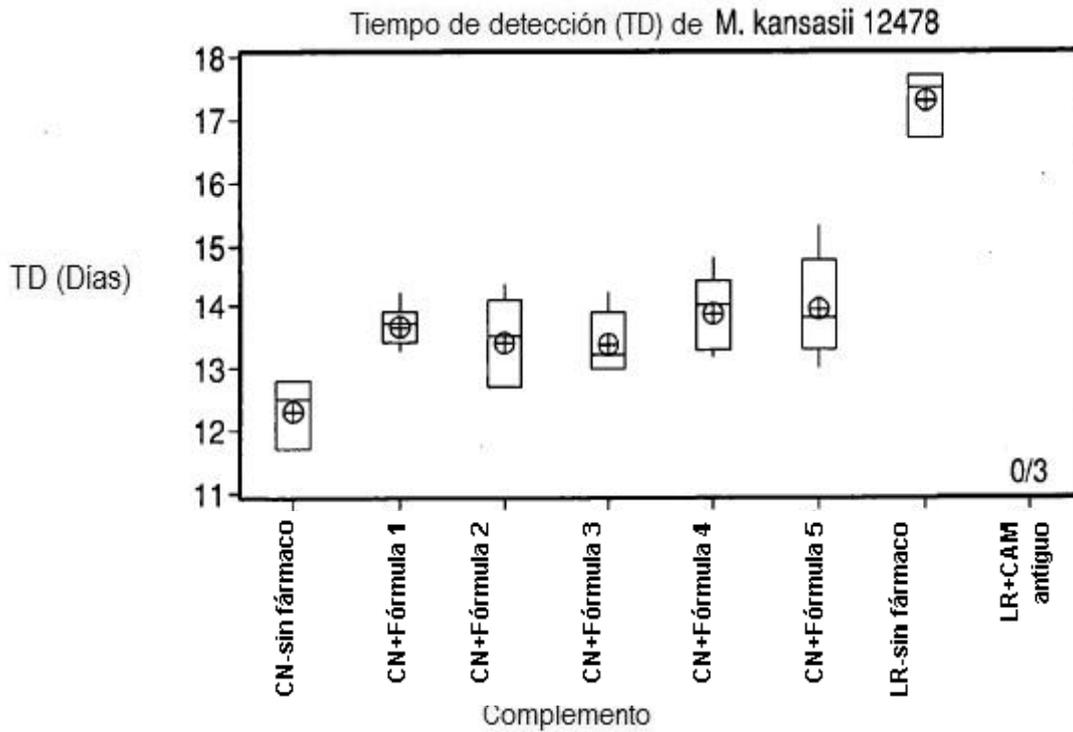


Fig. 6

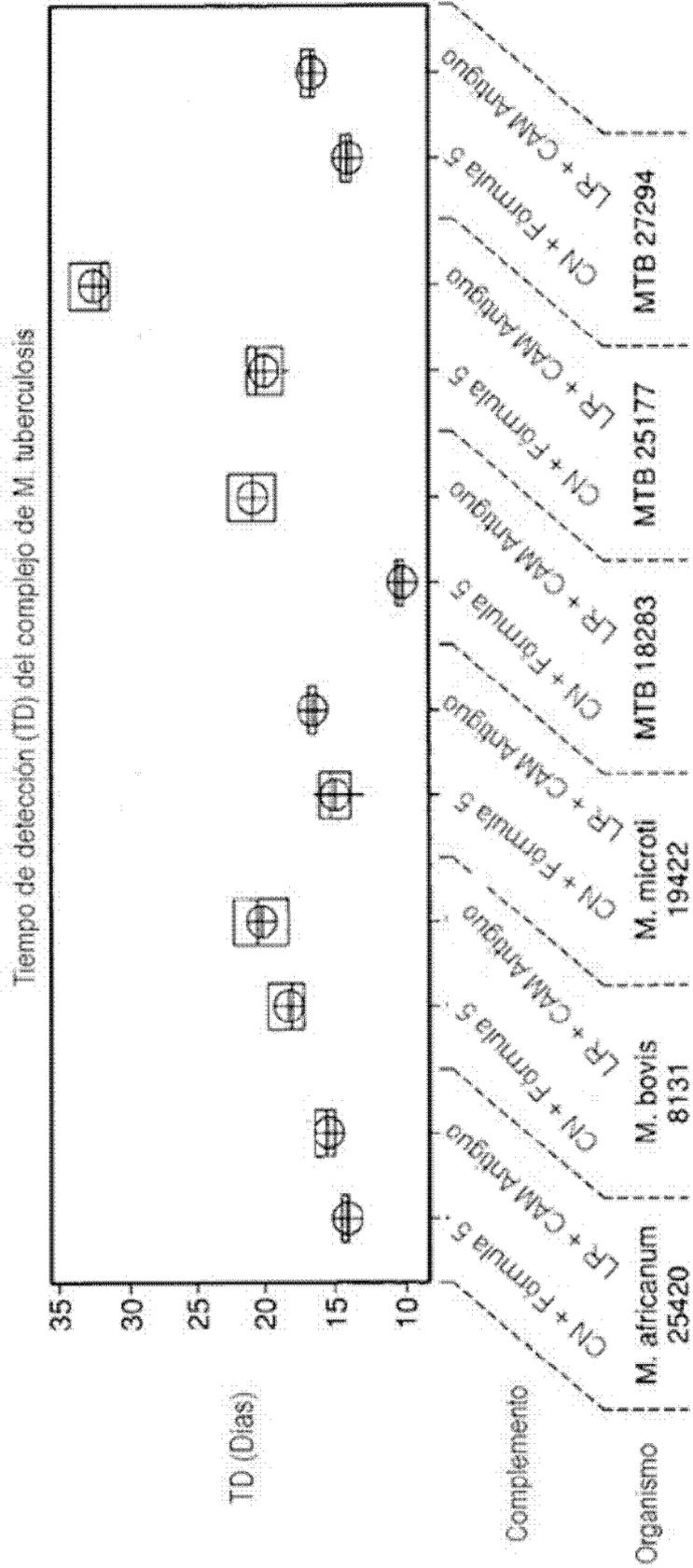


Fig. 7

