

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 467**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2010 PCT/US2010/040559**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11002860**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10742929 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2449089**

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

30 Prioridad:

01.07.2009 US 269952 P

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

21.02.2017

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 2 602 467 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 se dirige en general a un método para la detección mejorada de micobacterias, un método para el diagnóstico de la infección provocada por una especie de micobacteria, y un kit para la detección del crecimiento de micobacterias. Esto se consigue mediante diversas mejoras en un medio de cultivo, y la presente invención se dirige a métodos para mejorar o reducir el tiempo de detección (TTD) del crecimiento de micobacterias en el medio de cultivo.

Antecedentes de la invención

10 Las micobacterias son un género de bacterias que se caracterizan como bacilos gram-positivos, sin movilidad, acidorresistentes. El género comprende muchas especies, que incluyen *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 para seres humanos y animales, en particular *M. tuberculosis*, *M. leprae*, y *M. bovis*. Otras especies de micobacterias no son patógenas normalmente, pero provocan infecciones oportunistas en individuos inmunodeprimidos, tales como pacientes de SIDA. Por ejemplo, la infección por *M. kansasii*, *M. avium*, y *M. intracellulare* puede provocar una enfermedad pulmonar grave en sujetos cuyo sistema inmunitario esté reducido o deprimido. De hecho, por primera vez desde 1953, los casos informados de infecciones micobacterianas se están incrementando en los Estados Unidos; muchos de estos casos están relacionados con la epidemia de SIDA.

20 La detección de especies de *Mycobacterium* en las muestras clínicas es importante como herramienta de diagnóstico clínico. Históricamente se creía que *M. tuberculosis* era el único patógeno clínicamente significativo de este género. Un aumento de la incidencia de cepas resistentes a fármacos de *M. tuberculosis* ha resaltado adicionalmente la necesidad de detectar esta especie. La tuberculosis exhibe todas las características principales de una enfermedad epidémica global. Actualmente, la tuberculosis afecta a más de 35 millones de individuos en todo el mundo, y da como resultado más de 4 millones de muertes al año. Así, la tuberculosis es un problema muy preocupante en todo el mundo. La tuberculosis puede estar provocada por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*, bacilos tuberculosos gram-positivos, acidorresistentes, de la familia *Mycobacteriaceae*. También se han aislado algunas cepas patógenas locales de *M. tuberculosis* de pacientes en Madras y otras ciudades de la India, que difieren en cierta medida de *M. tuberculosis* H37Rv, que es una cepa virulenta.

30 Otras especies de micobacterias, no obstante, también son clínicamente importantes. A veces se denominan "MOTT" las micobacterias distintas del bacilo tuberculoso, que incluyen habitualmente los organismos del complejo *M. avium/intracellulare* (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, habitualmente denominado MAIC), *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum* y mezclas de especies de micobacterias en una muestra clínica. Por ejemplo, se ha demostrado que las infecciones oportunistas de crecimiento rápido por bacterias del complejo *M. avium* (MAC) se dan con frecuencia en individuos con SIDA y otros individuos inmunodeprimidos. En tales individuos infectados, se han hallado al menos 10⁶ células MAC/ml de sedimento de esputo. Por lo tanto, los ensayos 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 el análisis de las características físicas de las bacterias (p.ej., la tinción acidorresistente y la detección microscópica de los bacilos), las características fisiológicas (p.ej., el crecimiento en medios definidos) o las características bioquímicas (p.ej., la composición de lípidos de la membrana). Estos métodos requieren concentraciones relativamente elevadas de las bacterias en la muestra a detectar, pueden ser subjetivos dependiendo de la experiencia y pericia del técnico clínico, y consumen tiempo. Debido a que las especies de micobacterias a menudo son difíciles de cultivar *in vitro* y puede llevar varias semanas alcanzar una densidad útil en cultivo, estos métodos también pueden dar como resultado un tratamiento retrasado de los pacientes y costes asociados al aislamiento de un individuo infectado hasta que se completa el diagnóstico.

50 Las micobacterias en general, y *M. tuberculosis* y *M. bovis* en particular, son microorganismos de cultivo difícil que crecen muy lentamente. Puede llevar de dos a tres semanas cultivar estos organismos en los medios de cultivo usados de manera convencional. Se han hecho varios esfuerzos para hallar un medio o una sustancia que pueda mejorar el crecimiento y reducir el factor tiempo. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 3.935.073 describe un medio de crecimiento para cultivar micobacterias que contiene los siguientes nutrientes a los niveles indicados: caldo base 7H9 del 0,47% (que contiene fosfato potásico y sódico, glutamato sódico, citrato sódico, sulfato amónico, piridoxina, citrato férrico-amónico, sulfato magnésico, sulfato de zinc, sulfato de cobre, biotina y cloruro cálcico obtenido de BBL Microbiology Systems en Cockeysville, Maryland), albúmina de suero bovino del 0,5%, hidrolizado de caseína del 0,1%, catalasa a 96 unidades/vial, sustrato marcado con ¹⁴C a 2 uCi/vial, equilibrio con agua desionizada a 2 ml, pH final 6,8 ± 0,1.

Se puede usar albúmina como agente destoxicante en un medio para el crecimiento de micobacterias. La albúmina es una proteína simple hallada en prácticamente todos los animales y en muchos tejidos vegetales. Las albúminas

se caracterizan por ser solubles en agua y coagulables mediante calor. Contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre. Una albúmina preferida para los medios de crecimiento usados en la presente invención es la albúmina de suero bovino. La albúmina está presente en general en los medios de crecimiento a un nivel de alrededor del 0,1 por ciento en peso a alrededor del 10 por ciento en peso.

5 Sin embargo, debido a la lenta velocidad de crecimiento y a la necesidad de un medio enriquecido para el crecimiento micobacteriano en cultivo, la detección de micobacterias a partir de muestras clínicas (p.ej. esputo, fluidos pulmonares, tejido o heces) todavía representa un desafío biológico significativo. Un factor en este desafío surge por el hecho de que las bacterias que crecen más rápidamente pueden superar al organismo micobacteriano de crecimiento lento de interés, por lo que se impide o dificulta significativamente la detección de micobacterias. A lo
10 largo de décadas, se han desarrollado varias técnicas para descontaminar las muestras de diagnóstico (es decir, destruir o inhibir los organismos no micobacterianos) sometidas a identificación micobacteriana. Estas técnicas destruyen los contaminantes potenciales o los dañan hasta el punto de que su crecimiento se inhibe o se impide totalmente.

15 De manera convencional, el diagnóstico de laboratorio de las micobacterias se basó en la tinción acidorresistente y el cultivo del organismo, seguido de ensayos bioquímicos. Como resultado del crecimiento lento y del tiempo de generación largo de las micobacterias, el diagnóstico de laboratorio exacto de micobacterias mediante las técnicas convencionales puede llevar hasta seis semanas. Los sistemas de cultivo automatizados, tales como el sistema BacT/ALERT® (bioMérieux, Inc.) pueden disminuir el tiempo para la identificación de micobacterias hasta dos semanas.

20 El presente cesionario, bioMérieux, Inc., ofrece el frasco de cultivo BacT/ALERT® MP de plástico para el uso en los sistemas de detección microbiana BacT/ALERT® como su sistema basado en cultivo para detectar micobacterias en muestras clínicas distintas de sangre. El sistema de detección microbiana BacT/ALERT® utiliza un sensor colorimétrico y la luz reflejada para monitorizar la presencia y la producción de dióxido de carbono (CO₂) disuelto en el medio de cultivo. Si hay micobacterias en la muestra de ensayo, se produce dióxido de carbono a medida que los
25 microorganismos metabolizan los sustratos del medio de cultivo. Cuando el crecimiento de las micobacterias produce CO₂, el color del sensor permeable a gases instalado en el fondo de cada frasco de cultivo cambia de azul-verde a amarillo.

30 El sistema de reactivos BacT/ALERT® MP incluye un frasco de cultivo BacT/ALERT® MP, fluido de reconstitución (FR) y suplemento antibiótico MB BacT (SAM) (denominado más adelante en la presente memoria FR convencional o antiguo (o FR convencional/antiguo) y SAM convencional o antiguo (o SAM convencional/antiguo)). El frasco de cultivo BacT/ALERT® MP es un frasco de plástico que contiene algunos componentes del medio. El fluido de reconstitución (FR) contiene los nutrientes restantes para el crecimiento de micobacterias, y se usa para reconstituir el SAM. El SAM es un polvo liofilizado constituido por seis antimicrobianos para inhibir la flora respiratoria indeseada de las muestras de esputo. El FR y SAM se envasan como el kit SAM. Sin embargo, todavía existe la necesidad en
35 la técnica de reducir adicionalmente el tiempo necesario para el diagnóstico exacto de micobacterias.

Nakamura M., "Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in Cell-free Medium Containing α -Ketoglutaric Acid and Cytochrome c", J. Gen Microbiology (1972), 73, 193-195 presenta pruebas de la multiplicación de *Mycobacterium lepraemurium* en medio sin células que contiene ácido α -cetoglutarico y citocromo c.

40 El documento WO 00/52139 describe un método de cultivo de micobacterias. El medio de crecimiento es un medio de cultivo químicamente definido que comprende α -cetoglutarato.

Tortoli y Palomino, "Chapter 14: New Diagnostic Methods" en "Tuberculosis textbook" (2007), www.tuberculosistextbook.com, páginas 441-486, describe diversos suplementos para el diagnóstico de infecciones micobacterianas que comprenden diversos antimicrobianos.

45 Por lo tanto, un objetivo principal de esta invención es proporcionar un método o kit que usa un medio de cultivo para el crecimiento y la detección mejorada de especies de *Mycobacterium* que pueden estar presentes en una muestra clínica. También se describe en la presente memoria un nuevo medio de cultivo de micobacterias adecuado para el cultivo *in vitro* de micobacterias. Otro objetivo de esta invención es proporcionar un método o kit que usa un medio de cultivo de micobacterias, en el que se inhibe el crecimiento de los organismos contaminantes.

50 Por lo tanto, en la presente memoria se describe una formulación nueva de medios de cultivo, un suplemento de nutrientes (SN) nuevo y una formulación nueva de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM), y mejoras en el proceso de fabricación que muestran una mejora inesperada del crecimiento y la detección de micobacterias. También se describen en la presente memoria métodos para el crecimiento y la detección mejorada de micobacterias.

Sumario de la invención

55 En la presente memoria se describe un medio de cultivo nuevo para el crecimiento y la detección de *Mycobacterium*. Además, la presente invención proporciona métodos que usan composiciones y métodos de diagnóstico que detectan un amplio espectro de especies de *Mycobacterium* que pueden estar presentes en una muestra clínica. La

presente invención también se dirige a un kit MP nuevo y mejorado que muestra un tiempo de detección (TTD) mejorado para el crecimiento y la detección de micobacterias, y el kit MP comprende un frasco de cultivo BacT/ALERT[®] MP autoclavable, un suplemento de nutrientes (SN) y un suplemento antimicrobiano de micobacterias (SAM) nuevo.

- 5 En la presente memoria se describe un medio de cultivo nuevo para cultivar micobacterias, y el medio de cultivo comprende: (a) un medio de cultivo base adecuado para el crecimiento de micobacterias; (b) uno o más aditivos de suplemento de nutrientes; (c) y un suplemento antimicrobiano mejorado; y en el que dicho medio de cultivo exhibe un crecimiento mejorado para dichas micobacterias.

10 En una realización, la presente invención se dirige a un método para el crecimiento mejorado de micobacterias que comprende añadir una muestra que contiene micobacterias a un medio de cultivo que contiene una cantidad eficaz de un aditivo que comprende α -cetoglutarato para proporcionar un medio de cultivo con una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L de α -cetoglutarato, y someter al medio de cultivo a condiciones adecuadas para el crecimiento de dichas micobacterias, en el que dicho aditivo mejora el crecimiento de dichas micobacterias, y reduce el tiempo de detección del crecimiento de las micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato.

15 Otra realización de la presente invención se dirige a un método para el diagnóstico de una infección provocada por una especie de micobacteria, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo; (b) añadir un suplemento de nutrientes a dicho medio de cultivo, y el suplemento de nutrientes comprende α -cetoglutarato para proporcionar un medio de cultivo con una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L de α -cetoglutarato; (c) 20 añadir una muestra en la que se va a determinar la presencia o ausencia de dicha especie de micobacteria, y (d) analizar en el cultivo la presencia de la especie de micobacteria, en el que un hallazgo de la presencia de la especie de micobacteria indica un diagnóstico positivo para dicha infección, y en el que dicho aditivo de α -cetoglutarato reduce el tiempo de detección del crecimiento de micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato.

25 En otra realización, la presente invención se dirige a un kit de reactivos BacT/ALERT[®] MP mejorado. El kit de reactivos BacT/ALERT[®] MP mejorado incluirá un frasco de cultivo MP mejorado que incluye un medio de cultivo base para el crecimiento de micobacterias; un suplemento de nutrientes que comprende α -cetoglutarato; y un suplemento antimicrobiano que comprende uno o más agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de la flora respiratoria contaminante en dicho medio de cultivo, en el que dicho α -cetoglutarato del suplemento de nutrientes 30 está a una concentración tal que después de mezclar el suplemento de nutrientes y el suplemento antimicrobiano con el medio de cultivo base contenido en el frasco de cultivo, dicho aditivo de α -cetoglutarato presente en el medio de cultivo está a una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L, y en el que dicho aditivo de α -cetoglutarato reduce el tiempo de detección del crecimiento de micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato. Opcionalmente, el medio de cultivo del frasco de cultivo MP nuevo o 35 incluirá ningún componente termolábil, y de ese modo permitirá que el frasco de cultivo MP nuevo sea autoclavable. El suplemento de nutrientes (SN) puede incluir un medio de cultivo base para el crecimiento de micobacterias y/o una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, carbohidratos, sales, nutrientes, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, u otros nutrientes.

Breve descripción de las figuras

40 Figura 1A - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. tuberculosis* con y sin suplemento de ácidos grasos.

Figura 1B - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. intracellulare* con y sin suplemento de ácidos grasos.

45 Figura 1C - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. avium* con y sin suplemento de ácidos grasos.

Figura 2 - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de cepas de micobacterias con y sin α -cetoglutarato.

Figura 3 - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de cepas de micobacterias con azlocilina.

50 Figura 4 - es una gráfica de cajas que muestra el efecto de vancomicina sobre el crecimiento de cepas micobacterianas.

Figura 5A - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. tuberculosis* 18283 con diversas formulaciones de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM).

55 Figura 5B - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. tuberculosis* 27294 con diversas formulaciones de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM).

Figura 5C - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. avium* 569 con diversas formulaciones de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM).

Figura 5D - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. intracellulare* 13950 con diversas formulaciones de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM).

- 5 Figura 5E - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. scrofulaceum* 19981 con diversas formulaciones de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM).

Figura 5F - es una gráfica de cajas que muestra el tiempo de detección (TTD) de *M. kansasii* 12478 con diversas formulaciones de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM).

- 10 Figura 6 - es una gráfica de cajas que muestra una comparación de la formulación anterior de SAM frente a la formulación nueva de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) por el tiempo de detección (TTD) del crecimiento del complejo *M. tuberculosis*.

Figura 7 - es una gráfica de cajas que muestra una comparación de la formulación anterior de SAM frente a la formulación nueva de suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) por el tiempo de detección (TTD) del crecimiento de otras cepas de micobacterias.

15 Descripción detallada de la invención

El cultivo de microorganismos en proliferación proporcionando las condiciones nutricionales y ambientales adecuadas es muy conocido. Un medio de crecimiento o cultivo adecuado debería contener todos los nutrientes requeridos por el microorganismo que se va a cultivar. Por ejemplo, un medio de cultivo microbiológico típico debería contener fuentes disponibles de agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, vitaminas, oligoelementos tales como potasio, magnesio, calcio y hierro, y minerales, tales como azufre y fósforo. En general, estos requerimientos se suministran a partir de varias fuentes. Otros factores para las condiciones de proliferación adecuadas pueden incluir el pH, la temperatura, la aireación, la concentración salina y la presión osmótica del medio.

Además, se sabe que pueden ser necesarios ciertos factores de crecimiento. Un factor de crecimiento es un compuesto orgánico que debe contener un microorganismo para crecer, pero que es incapaz de sintetizar. Muchos microorganismos, cuando se les proporcionan los nutrientes enumerados anteriormente, son capaces de sintetizar todos los constituyentes orgánicos de su protoplasma, que incluyen los aminoácidos, las vitaminas, las purinas y pirimidinas, los ácidos grasos y otros compuestos. Cada uno de estos compuestos esenciales se sintetiza mediante una secuencia discreta de reacciones enzimáticas, y cada enzima se produce bajo el control de un gen específico. Sin embargo, algunos microorganismos no pueden sintetizar uno o más de estos factores de crecimiento, y deben obtener esos compuestos del medio. Los factores de crecimiento necesarios pueden incluir, pero sin limitación, aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas, ácidos grasos y otros compuestos necesarios para el crecimiento.

Como se discutió anteriormente en la presente memoria, el actual cesionario, bioMérieux, Inc., produce y vende un frasco de medio de cultivo para el crecimiento y la detección de micobacterias (Frasco de Proceso BacT/ALERT® MP). El Frasco de Proceso BacT/ALERT® MP está diseñado para el uso con los sistemas BacT/ALERT® o BacT/ALERT® 3D para la recuperación y detección de micobacterias de muestras corporales estériles y de muestras clínicas digeridas-descontaminadas. El Frasco de Proceso MP se puede usar junto con el Suplemento Antimicrobiano MB/BacT® (SAM) y/o el Fluido de Reconstitución MB/BacT® (FR) (denominados en la presente memoria SAM convencional o antiguo y FR convencional o antiguo).

El frasco de cultivo desechable BacT/ALERT® MP tiene un cierre extraíble y contiene aproximadamente 10 ml de medio y un sensor interno que detecta el dióxido de carbono como indicador del crecimiento microbiano. La formulación del medio de cultivo consiste en: caldo Middlebrook 7H9 (0,47% p/v), 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).

El Suplemento Antimicrobiano MB/BacT® convencional o antiguo (SAM convencional/antiguo) es un suplemento 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), trimetoprima (0,00105% p/v), y vancomicina (0,0005% p/v).

El Fluido de Reconstitución MB/BacT® convencional/antiguo (FR 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 Fluido de Reconstitución (FR) y el Suplemento Antimicrobiano MB BacT/ALERT® (SAM) constituyen un kit de suplemento que se puede añadir al frasco MP.

La presente invención se dirige a métodos y kits que usan un medio de cultivo nuevo y mejorado, y un método para el crecimiento mejorado de micobacterias. El medio de cultivo y los métodos de la presente invención se pueden usar para el cultivo de cualquier micobacteria conocida, que incluye, pero sin limitación, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium*

malmoense, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, y *Mycobacterium gordonae*. Ahora se ha descubierto una formulación nueva de medios de cultivo, un suplemento de nutrientes nuevo (denominado en la presente memoria SN nuevo) y una formulación nueva de suplemento antimicrobiano (denominado en la presente memoria SAM nuevo), y mejoras en el proceso de fabricación que muestran una mejora inesperada en el crecimiento y la detección de micobacterias.

Las características nuevas del sistema MP de la presente invención pueden incluir: (1) la transferencia de componentes termolábiles del medio de cultivo MP a un suplemento de nutrientes, lo que permite la esterilización terminal del frasco MP; (2) el uso de fuentes de carbono nuevas para optimizar la producción de CO₂; (3) la optimización del suplemento de nutrientes; y/o (4) la optimización de los antimicrobianos del SAM y/o la concentración de antimicrobianos. Estas mejoras conducen a varias mejoras inesperadas del crecimiento y la detección de micobacterias, que incluyen: (1) el rendimiento mejorado del frasco MP en cuanto al tiempo de detección (TTD) del crecimiento micobacteriano; (2) la recuperación mejorada de micobacterias clínicamente relevantes; (3) la reducción de la interurrencia de la flora respiratoria contaminante (FRC); y/o (4) la minimización de falsos positivos. Las mejoras adicionales incluyen la simplificación del proceso de fabricación, de forma que se pueden almacenar los frascos BacT/ALERT[®] MP y enviarlos a temperatura ambiente.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo nuevo de la presente invención proporciona un crecimiento mejorado de las micobacterias. Tal como se usa en la presente memoria, "crecimiento mejorado" significa que el crecimiento de las micobacterias se puede detectar mediante el uso del medio de cultivo y/o los suplementos de la presente invención, por ejemplo en un frasco de cultivo, al menos alrededor de 0,5 días, al menos alrededor de 1 día, al menos alrededor de 2 días, al menos alrededor de 3 días, al menos alrededor de 5 días, o al menos alrededor de 7 días antes que con el uso de los medios de cultivo convencionales. En otras palabras, se puede mejorar el crecimiento de las micobacterias, y de ese modo se permite una mejora o reducción en el tiempo de detección (TTD) del crecimiento en comparación con el crecimiento de las micobacterias en un medio de cultivo convencional. De acuerdo con esta invención, el TTD se puede mejorar o reducir en al menos alrededor de 0,5 días, al menos alrededor de 1 día, al menos alrededor de 2 días, al menos alrededor de 3 días, al menos alrededor de 5 días, o al menos alrededor de 7 días con el uso del medio de cultivo de la presente invención en comparación con los medios de cultivo convencionales. En una realización, el medio de cultivo convencional puede ser el medio de cultivo convencional complementado con el FR convencional/antiguo y SAM convencional/antiguo del Frasco de Proceso BacT/ALERT[®] MP (bioMérieux, Inc.), descrito anteriormente en la presente memoria.

El medio de cultivo nuevo usado en la presente invención puede proporcionar una disminución del tiempo de latencia para el crecimiento de micobacterias. Tal como se usa en la presente memoria, "tiempo de latencia disminuido" significa una disminución en el tiempo de incubación o de latencia antes de que la micobacteria entre en la fase logarítmica de crecimiento. De acuerdo con la presente invención, el uso del medio de cultivo y/o los suplementos en los métodos y kits de la invención da como resultado una disminución o reducción del tiempo de latencia de al menos alrededor de 0,5 días, o al menos alrededor de 1 día, o al menos alrededor de 2 días, o al menos alrededor de 3 días, en comparación con la fase de latencia de la micobacteria en el medio de cultivo convencional/antiguo. El medio de cultivo convencional/antiguo puede ser el medio de cultivo convencional complementado con el FR convencional/antiguo y el SAM convencional/antiguo del Frasco de Proceso BacT/ALERT[®] MP (bioMérieux, Inc.), descrito anteriormente en la presente memoria.

El medio de cultivo que se usa en los métodos y kits de la presente invención comprende un medio líquido de nutrientes o caldo de nutrientes. El medio de cultivo o caldo de nutrientes comprende en general uno o más nutrientes conocidos, por ejemplo, el medio de cultivo puede contener una o más fuentes de carbono (p.ej., glicerol), fuentes de nitrógeno (p.ej., sales de amonio), carbohidratos, sales (p.ej., K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺), nutrientes, y/o agua. El medio de cultivo usado en la presente invención puede comprender Middlebrook 7H9. Como se discutió anteriormente en la presente memoria, el Middlebrook 7H9 comprende sales de potasio, sales de sodio, glutamato sódico, citrato sódico, sulfato amónico, piridoxina, citrato férrico-amónico, sulfato magnésico, sulfato de zinc, sulfato de cobre, biotina y cloruro cálcico.

El medio de cultivo usado en la presente invención puede comprender además nutrientes y/o componentes adicionales que permiten la detección mejorada del crecimiento de micobacterias. Los nutrientes y/o componentes adicionales que se pueden añadir al medio de cultivo de la presente invención incluyen, pero sin limitación, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, extractos celulares o vegetales, y/u otros nutrientes. Por ejemplo, el medio de cultivo usado en la presente invención puede comprender además caseína (p.ej., una digestión pancreática de caseína), albúmina (p.ej., albúmina de suero bovino), catalasa y/o amaranto. Como se discute adicionalmente en la presente memoria, estos nutrientes y/o componentes adicionales pueden comprender un suplemento de nutrientes diferente que se puede añadir a un medio de cultivo base antes de la inoculación del medio de cultivo con una muestra para la que se puede desear la determinación de la presencia o ausencia de una micobacteria.

Se ha descubierto que los niveles elevados de ácidos grasos de cadena corta y media (p.ej., ácidos grasos que tienen alrededor de 8 o menos átomos de carbono) asociados a la albúmina de suero bovino (ASB) en el frasco de

medio de cultivo pueden dar como resultado lecturas de falsos positivos. Como tal, se puede preferir evitar el uso de ácidos grasos de cadena corta o media. Por ejemplo, se debería evitar el uso de ácidos grasos que tengan 8 o menos átomos de carbono (p.ej., ácido caprílico).

5 Sin embargo, también se ha descubierto que estos falsos positivos inducidos por el reactivo se pueden eliminar o reducir significativamente mediante el uso de ASB sin ácidos grasos y complementando la formulación del medio de cultivo con ácidos grasos de cadena larga. Por lo tanto, el medio de cultivo puede comprender además ASB sin ácidos grasos (ASB sin AG) y uno o más ácidos grasos de cadena larga saturada o insaturada, o sales de los mismos. Se puede preferir utilizar uno o más ácidos grasos de cadena larga que tengan 10 o más átomos de carbono. En general, se puede usar cualquier ácido graso de cadena larga conocido, que incluye, pero sin limitación, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, y las sales de los mismos. Como se discute adicionalmente en la presente memoria, se ha descubierto que los ácidos grasos se pueden transferir desde los medios de cultivo del frasco a un suplemento de nutrientes que se puede añadir por separado a los medios de cultivo antes de la inoculación con una muestra de ensayo. Como se muestra en la presente memoria (véase, p.ej., el Ejemplo 1 y las Figuras 1A-1C), el uso de una ASB sin ácidos grasos y la complementación del medio de cultivo con ácidos grasos de cadena larga dio como resultado una mejora en el tiempo de detección (TTD) 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 un aspecto de la presente invención, el medio de cultivo de la presente invención se puede complementar con uno o más sustratos o intermedios conocidos de rutas metabólicas. Se ha descubierto sorprendentemente que incluyendo un sustrato de ruta metabólica de α -cetoglutarato en los medios de cultivo, se pudo mejorar el crecimiento y la detección de micobacterias en comparación con un medio de cultivo que no contuvo el sustrato de ruta metabólica de α -cetoglutarato. Aunque sin desear limitarse por la teoría, se cree que el uso de un sustrato de ruta metabólica de α -cetoglutarato en el medio de cultivo puede aumentar la producción de CO₂ por las micobacterias presentes en el cultivo. De acuerdo con esta realización, se pueden usar los sustratos o intermedios del ciclo del ácido cítrico, la glucólisis o la ruta del glioxilato. Se pueden usar sustratos o cofactores de enzimas que producen CO₂, o los intermedios, precursores o derivados de los mismos, en el medio de cultivo. Por ejemplo, pueden ser útiles los intermedios del ciclo del ácido cítrico, tales como piruvato, citrato, cis-aconitato, isocitrato, oxalosuccinato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato, oxalacetato. En otra variación, se puede incluir uno o más de α -cetoglutarato, un precursor de α -cetoglutarato, y/o un derivado de α -cetoglutarato en el medio de cultivo descrito en la presente memoria (se usa α -cetoglutarato en la presente invención). Los precursores o derivados de α -cetoglutarato pueden incluir, pero sin limitación, glutamato, isocitrato, oxalosuccinato, o las mezclas de los mismos. El α -cetoglutarato, precursor(es) de α -cetoglutarato, y/o derivado(s) de α -cetoglutarato puede(n) estar presente(s) en el medio de cultivo a una concentración final de alrededor de 0,1 g/L a alrededor de 50 g/L, de alrededor de 0,5 g/L a alrededor de 20 g/L, o de alrededor de 1 g/L a alrededor de 20 g/L. Como se discute adicionalmente en la presente memoria, el α -cetoglutarato, el precursor de α -cetoglutarato, y/o el derivado de α -cetoglutarato se pueden incluir en un suplemento de nutrientes que se puede añadir por separado a los medios de cultivo.

En otro aspecto de la presente invención, el medio de cultivo de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más agentes o sustancias antimicrobianas. Un antimicrobiano es un agente o sustancia que destruye, reduce, o inhibe de otra manera el crecimiento de los microbios. En general, se puede usar cualquier agente antimicrobiano conocido, tal como fármacos, productos químicos, u otras sustancias que destruyen, reducen, o ralentizan el crecimiento de los microbios. Los agentes antimicrobianos útiles incluyen, pero sin limitación, antibióticos, bacteriostáticos, bactericidas, antibacterianos, antivirales, antifúngicos, antiprotazoarios y antiparasitarios. En general, el antimicrobiano se usa en una cantidad suficiente para destruir, reducir, o inhibir el crecimiento de las bacterias contaminantes que pueden estar presentes en el medio de cultivo. Por ejemplo, como entendería un experto en la técnica, se puede preferir inhibir el crecimiento de la flora respiratoria contaminante (FRC) en el medio de cultivo. La FRC puede interferir con el crecimiento de las micobacterias, agotar los nutrientes necesarios para el crecimiento micobacteriano y/o conducir a falsos positivos. La flora respiratoria contaminante (FRC) puede incluir, pero sin limitación, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *C. tropicalis*, *S. aureus* resistente a metilicina (es decir, SARM), *E. faecalis* resistente a vancomicina (es decir, ERV).

El antimicrobiano puede ser uno o más antibióticos o fármacos sintéticos, que incluyen, pero sin limitación, polimixina B, vancomicina, azlocilina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y fosfomicina. Preferiblemente, los antibióticos útiles inhiben la flora respiratoria contaminante (FRC) sin reducir o inhibir el crecimiento micobacteriano.

55 El suplemento antimicrobiano puede comprender uno o más antibióticos antifúngicos, antibióticos para gram-negativos, antibióticos para gram-positivos, un antibiótico antifúngico, y antibióticos de amplio espectro. Por ejemplo, el suplemento antimicrobiano de la presente invención puede comprender un antifúngico (p.ej., anfotericina B), un antibiótico para gram-negativos que altera la permeabilidad de la membrana citoplasmática (p.ej., polimixina B), un antibiótico de amplio espectro que inhibe la ADN girasa (p.ej., ácido nalidíxico), un agente quimioterápico (p.ej., un agente que inhibe la dihidrofolato reductasa (p.ej., trimetoprima)) y un antibiótico de amplio espectro que inhibe la enolpiruvato transferasa (p.ej., fosfomicina). En general, se puede usar cualquier antifúngico, antibiótico para gram-negativos, antibiótico de amplio espectro, antibiótico inhibidor de la ADN Girasa, o agente quimioterápico conocidos

en la práctica de esta invención. En una realización, el suplemento antimicrobiano puede comprender anfotericina B, polimixina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y fosfomicina.

Como se muestra en la presente memoria (véanse, p.ej., los Ejemplos 3-4 y las Figuras 3-4), el uso de vancomicina y/o azlocilina puede inhibir, reducir o ralentizar el crecimiento de ciertas especies de micobacterias. Así, se puede preferir evitar el uso de vancomicina y/o azlocilina. Se ha descubierto que se puede usar fosfomicina en vez de azlocilina y vancomicina para producir un suplemento antimicrobiano (SAM) que se puede usar para mejorar el crecimiento y la detección de las micobacterias en cultivo, en comparación con el Suplemento Antimicrobiano MB/BacT[®]. Por ejemplo, sustituyendo azlocilina y vancomicina con fosfomicina, se ha descubierto que el suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) nuevo mejora o reduce el tiempo de detección (TTD) del crecimiento de micobacterias en 2-9 días, en comparación con el SAM convencional/antiguo (véanse, p.ej., el Ejemplo 5 y las Figuras 5A-5F). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se puede preferir el uso de polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y fosfomicina. Estos antibióticos se pueden usar en cantidades suficientes para inhibir el crecimiento de las bacterias contaminantes que pueden estar presentes en el medio de cultivo. Por ejemplo, el medio de cultivo puede contener una concentración final de alrededor de 400 unidades/ml a alrededor de 2000 unidades/ml de polimixina B, de alrededor de 50 µg/ml a alrededor de 400 µg/ml de anfotericina B, de alrededor de 100 µg/ml a alrededor de 1000 µg/ml de ácido nalidíxico, de alrededor de 10 µg/ml a alrededor de 100 µg/ml de trimetoprima y de alrededor de 100 µg/ml a alrededor de 1000 µg/ml de fosfomicina. En una realización, como se discute adicionalmente en la presente memoria, estos agentes antimicrobianos pueden comprender un suplemento diferente que se puede añadir a un medio de cultivo base antes de la inoculación del medio de cultivo con una muestra para la que se puede desear la determinación de la presencia o ausencia de una micobacteria.

El medio de cultivo discutido en la presente memoria puede comprender uno o más de 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 para los expertos en la técnica por ser beneficiosos para el cultivo de micobacterias. Por ejemplo, el medio de cultivo puede comprender además uno o más carbohidratos 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 la sal del mismo), ácido palmítico (p.ej., palmitato sódico), ácido oleico (p.ej., oleato sódico), albúmina de suero bovino, caseína (p.ej., digestión pancreática de caseína), catalasa, piruvato sódico, α-cetoglutarato, amaranto y agua.

Además, 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 uno o más de polimixina B, azlocilina, vancomicina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y/o fosfomicina. El medio de cultivo puede comprender además una mezcla de antibióticos que comprende polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y fosfomicina.

El medio de cultivo se puede ajustar a un pH de alrededor de 5,5 a alrededor de 7,5, un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, o un pH de alrededor de 6,5 a alrededor de 7,0. El medio de cultivo puede mejorar o reducir el tiempo de detección (TTD) del crecimiento micobacteriano en al menos alrededor de 0,5, al menos alrededor de 1, al menos alrededor de 2, al menos alrededor de 3, al menos alrededor de 5, o al menos alrededor de 7 días en comparación con el medio de cultivo micobacteriano convencional/antiguo.

Método para la Detección Mejorada de Micobacterias

En general, la presente invención también se dirige a un método para detectar el crecimiento de una o más micobacterias que pueden estar presentes en una muestra biológica. Las muestras que se pueden ensayar incluyen muestras tanto clínicas y como no clínicas, en las que se puede sospechar la presencia de una micobacteria. Las muestras clínicas que se pueden ensayar incluyen cualquier tipo de muestra ensayada en general en los laboratorios clínicos, que incluyen, pero sin limitación, sangre, esputo, aspirados, torundas y lavados de torundas, otros fluidos corporales, y similares. La muestra puede ser una muestra corporal estéril o una muestra clínica digerida-descontaminada. Las muestras no clínicas que se pueden ensayar también incluyen sustancias muy variables, que abarcan, pero sin limitación, productos alimenticios, bebidas, productos farmacéuticos, cosméticos, agua, aire, tierra, plantas, productos sanguíneos (lo que incluye plaquetas), muestras de órganos o tejidos de donantes, y similares.

En un aspecto, la presente invención se dirige a un método para el crecimiento y/o la detección mejorada de micobacterias que comprende añadir una muestra que se sospecha que contiene micobacterias a un medio de cultivo que contiene una cantidad eficaz de un aditivo que comprende α-cetoglutarato para proporcionar un medio de cultivo con una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L de α-cetoglutarato, para mejorar el crecimiento de dichas micobacterias y someter al medio de cultivo a condiciones adecuadas para el crecimiento de dichas micobacterias, lo que reduce el tiempo de detección del crecimiento de las micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α-cetoglutarato. Se ha descubierto inesperadamente que mediante el uso de α-cetoglutarato, un precursor de α-cetoglutarato o un derivado de α-cetoglutarato en el medio de cultivo y el método de la presente invención, se puede reducir el tiempo de detección (TTD) del crecimiento micobacteriano en al menos alrededor de 0,5 días, al menos alrededor de 1 día, al menos alrededor de 2 días, al menos alrededor de 3 días, al menos alrededor de 5 días, o al menos alrededor de 7 días antes que con el uso del

medio de cultivo convencional/antiguo (es decir, el medio de cultivo que no tiene α -cetoglutarato, un precursor y/o derivado de α -cetoglutarato). Como se muestra en el Ejemplo 2 y la Figura 2, el tiempo de detección (TTD) de las cepas de micobacterias en un medio de cultivo que contiene α -cetoglutarato se mejora o reduce en aproximadamente dos días en comparación con el TTD en un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato.

5 La presente invención también se dirige a un método para el diagnóstico de una infección provocada por una especie de micobacteria, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo; (b) añadir un suplemento de nutrientes a dicho medio de cultivo, y dicho aditivo de suplemento de nutrientes comprende el sustrato de ruta metabólica α -cetoglutarato para proporcionar un medio de cultivo con una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L de α -cetoglutarato; (c) añadir una muestra en la se va a determinar la presencia o ausencia de dicha especie de micobacteria; y (d) analizar en dicho cultivo la presencia de dicha especie de micobacteria, en el que un hallazgo de la presencia de dicha especie de micobacteria indica un diagnóstico positivo para dicha infección, y en el que dicho aditivo de α -cetoglutarato reduce el tiempo de detección del crecimiento de micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato. Como se discutió anteriormente en la presente memoria, el uso de α -cetoglutarato, un precursor de α -cetoglutarato y/o un derivado de α -cetoglutarato en el medio de cultivo y el método de la presente invención puede reducir el TTD en al menos alrededor de 0,5 días, al menos alrededor de 1 día, al menos alrededor de 2 días, al menos alrededor de 3 días, al menos alrededor de 5 días, o en al menos alrededor de 7 días. De acuerdo con este método, el suplemento de nutrientes (SN) puede usar opcionalmente ASB sin ácidos grasos, y comprende además uno o más ácidos grasos de cadena larga (p.ej., ácidos grasos que tienen 10 o más átomos de carbono). Se ha descubierto que el uso de ASB sin ácidos grasos y uno o más ácidos grasos de cadena larga en el SN da como resultado una reducción sustancial de las lecturas de falsos positivos. Además, como se muestra en la presente memoria (véase el Ejemplo 1 y las Figuras 1A-1C), el uso de una ASB sin ácidos grasos y la complementación del medio de cultivo con ácidos grasos de cadena larga dio como resultado una mejora en el tiempo de detección (TTD) 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).

También se describe en la presente memoria un método para inhibir la contaminación bacteriana en un cultivo de micobacterias, y el método 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 las bacterias contaminantes en condiciones adecuadas para el crecimiento de dichas micobacterias. De acuerdo con este método, se pueden añadir uno o más agentes o sustancias antimicrobianas al medio de cultivo antes o de manera concurrente con la inoculación del medio de cultivo con la muestra biológica a ensayar. Posteriormente, se puede cultivar el medio de cultivo y la muestra durante un tiempo suficiente y a una temperatura suficiente para permitir el crecimiento y la detección de cualquier micobacteria que pueda estar presente en la muestra de ensayo. El o los antimicrobianos se pueden incluir en un suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) que se puede añadir al medio de cultivo base antes o de manera concurrente con la inoculación del medio de cultivo con la muestra a ensayar. Como se describió anteriormente en la presente memoria, el SAM puede constar de uno o más de polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima, y fosfomicina.

En otra realización, la presente invención se dirige a un método que emplea el uso de un kit de reactivos BacT/ALERT[®] MP mejorado para el crecimiento y/o la detección de micobacterias que pueden estar presentes en una muestra biológica. De acuerdo con esta realización, como se describe con más detalle en la presente memoria, el sistema de reactivos BacT/ALERT[®] MP mejorado incluirá un frasco de cultivo MP mejorado que incluye un medio de cultivo base para el crecimiento de micobacterias, un suplemento de nutrientes (SN) nuevo que comprende α -cetoglutarato y un suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) nuevo, en el que dicho α -cetoglutarato del suplemento de nutrientes está a tal concentración que después de mezclar el suplemento de nutrientes y el suplemento antimicrobiano con el medio de cultivo base contenido en el frasco de cultivo, dicho aditivo de α -cetoglutarato presente en el medio de cultivo está a una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L, y en el que dicho aditivo de α -cetoglutarato reduce el tiempo de detección del crecimiento de micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato. El suplemento de nutrientes (SN) y/o suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) se pueden añadir al medio de cultivo base del frasco antes, o de manera concurrente con la inoculación del medio de cultivo con la muestra biológica a ensayar en busca de la presencia de micobacterias. El frasco inoculado se cultivará durante un tiempo suficiente y a una temperatura suficiente para permitir el crecimiento y/o la detección de cualquier micobacteria que pueda estar presente en la muestra biológica. En una realización, el medio de cultivo del frasco de cultivo MP nuevo no incluirá ningún componente termolábil, y de ese modo permitirá que el frasco de cultivo MP nuevo sea autoclavable.

55 *Kit de Reactivos MP*

En un aspecto, la presente invención se dirige a un kit de reactivos MP para el crecimiento y la detección mejorada de micobacterias. El kit de reactivos MP incluirá un frasco de cultivo que tiene un medio de cultivo base de micobacterias, un suplemento de nutrientes (SN) que comprende α -cetoglutarato, y un suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM), en el que dicho α -cetoglutarato del suplemento de nutrientes está a tal concentración que después de mezclar el suplemento de nutrientes y el suplemento antimicrobiano con el medio de cultivo base contenido en el frasco de cultivo, dicho aditivo de α -cetoglutarato presente en el medio de cultivo está a una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L, y en el que dicho aditivo de α -cetoglutarato reduce el tiempo de

detección del crecimiento de micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato.

Frasco de Cultivo

5 En la presente memoria se describe un frasco o recipiente (es decir, un frasco de cultivo) que contiene un medio de cultivo de micobacterias nuevo y mejorado. 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 la detección de micobacterias. El frasco de cultivo puede comprender caldo Middlebrook 7H9 y/o agua como medio de cultivo base. El frasco MP convencional/antiguo usa un medio de cultivo líquido con un pH de alrededor de 6,8 para el crecimiento y la detección de *Mycobacterium*. De forma similar, el frasco de cultivo MP nuevo y mejorado 10 tiene un medio de cultivo base líquido o caldo al que se puede añadir un suplemento de nutrientes nuevo y/o un suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) nuevo. El medio de cultivo se puede ajustar a un pH de alrededor de 5,5 a alrededor de 7,5, un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, o un pH de alrededor de 6,5 a alrededor de 7,0. Opcionalmente, el medio de cultivo del frasco de cultivo MP tiene un pH de alrededor de 6,8.

15 Se ha descubierto sorprendentemente que eliminando ciertos nutrientes de crecimiento del frasco de medio de cultivo, que incluyen, por ejemplo, albúmina de suero bovino, catalasa de hígado bovino y/o caseína, el frasco se puede esterilizar de manera terminal. Por ejemplo, eliminando los componentes termolábiles, el frasco se puede esterilizar en autoclave. Las mejoras relacionadas con la esterilización terminal del frasco incluyen el almacenamiento y envío mejorados. Por ejemplo, el frasco esterilizado de manera terminal (p.ej., frasco esterilizado en autoclave) se puede almacenar y enviar a temperatura ambiente, lo que da como resultado una reducción de 20 costes considerable. El frasco esterilizado de manera terminal puede dar como resultado además una duración de almacenamiento mejorada y/o un nivel de esterilidad (SAL) incrementado.

Suplemento de Nutrientes (SN)

25 En la presente memoria se describe un suplemento de nutrientes (SN) mejorado que se puede añadir al frasco de cultivo para mejorar el crecimiento y la detección de micobacterias. En general, el suplemento de nutrientes (SN) se añade a un frasco de cultivo que contiene un medio de cultivo base para el crecimiento de micobacterias, antes de la inoculación del frasco y del medio de cultivo con una muestra para la que se desea la detección de la presencia de una micobacteria.

30 El suplemento de nutrientes (SN) mejorado puede incluir cualquier nutriente o suplemento conocido beneficioso para el crecimiento de micobacterias. Por ejemplo, el suplemento de nutrientes puede incluir una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, carbohidratos, sales, nutrientes, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, y/u otros nutrientes conocidos para los expertos en la técnica.

35 En ciertos casos, el suplemento de nutrientes puede comprender además α -cetoglutarato, un precursor de α -cetoglutarato y/o un derivado de α -cetoglutarato. En general, se puede usar cualquier precursor o derivado de α -cetoglutarato conocido, que incluye, pero sin limitación, glutamato, isocitrato, oxalosuccinato, o mezclas de los mismos. El α -cetoglutarato, precursor(es) de α -cetoglutarato, y/o derivado(s) de α -cetoglutarato puede(n) estar presente(s) en el suplemento de nutrientes en una cantidad suficiente, de forma que tras la adición al medio de cultivo del frasco de cultivo, la concentración final de α -cetoglutarato, precursor de α -cetoglutarato y/o derivado de α -cetoglutarato sea de alrededor de 0,1 g/L a alrededor de 50 g/L.

40 El suplemento de nutrientes puede comprender además uno o más ácidos grasos de cadena larga saturada o insaturada, o sales de los mismos. Se puede preferir utilizar uno o más ácidos grasos de cadena larga que tengan 10 o más átomos de carbono. En general, se puede usar cualquier ácido graso de cadena larga conocido, que incluye, pero sin limitación, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, y las sales de los mismos. A veces se puede preferir evitar el uso de ácidos grasos de cadena corta, o media. Por ejemplo, se debería evitar el uso de ácidos grasos que tengan 8 o menos átomos de carbono (p.ej., ácido caprílico).

45 Como se mencionó anteriormente en la presente memoria, se puede preferir usar albúmina de suero bovino (ASB) sin ácidos grasos en el suplemento de nutrientes descrito en la presente memoria. Como se mencionó previamente, el uso de ASB sin ácidos grasos puede reducir o eliminar sustancialmente los falsos positivos basados en el reactivo.

50 El suplemento de nutrientes (SN) puede comprender glicol, uno o más ácidos grasos de cadena larga, albúmina de suero bovino (ASB) sin ácidos grasos, digestión pancreática de caseína, piruvato sódico, amaranto y α -cetoglutarato. El suplemento de nutrientes se puede añadir al frasco de cultivo junto con el medio de cultivo base, o se puede añadir al frasco de cultivo justo antes de la inoculación con una muestra de ensayo. De manera alternativa, el suplemento de nutrientes se puede usar para resuspender el suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) y después añadirlo al frasco de medio de cultivo.

55 Suplemento Antimicrobiano Micobacteriano (SAM)

También se describe en la presente memoria un suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) mejorado que se

puede añadir al frasco de cultivo para mejorar el crecimiento y la detección de micobacterias. Se ha desarrollado un suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) mejorado que aumenta el crecimiento de las micobacterias en cultivo. El SAM mejorado es eficaz para reducir o inhibir el crecimiento de la flora respiratoria contaminante (FRC) sin reducir o inhibir el crecimiento micobacteriano. La flora respiratoria contaminante (FRC) puede incluir, pero sin limitación, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *C. tropicalis*, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *E. faecalis* resistente a vancomicina (ERV). El suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) se puede añadir directamente a un frasco de cultivo que comprende un medio de cultivo base para el crecimiento de micobacterias, antes de la inoculación del frasco y del medio de cultivo con una muestra para la que se desea la detección de la presencia de una micobacteria. El suplemento de nutrientes (SN) se puede usar para resuspender el suplemento antimicrobiano (SAM), antes de añadirlo al frasco de medio de cultivo.

En general, se puede usar cualquier agente o sustancia antimicrobiana conocida, que incluye, pero sin limitación, antibióticos, bacteriostáticos, bactericidas, antibacterianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios y/o antiparasitarios. Sin embargo, los agentes antimicrobianos preferidos incluyen cualquier antimicrobiano que reduzca o inhiba el crecimiento de la flora respiratoria contaminante (FRC) sin reducir o inhibir el crecimiento de las micobacterias. El SAM puede comprender 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 incluyen, por ejemplo, los antibióticos que reducen o inhiben el crecimiento de la FRC, que incluyen, pero sin limitación, polimixina B (POLI B), vancomicina (VAN), azlocilina (AZL), anfotericina B (AMP B), ácido nalidíxico (NA), trimetoprima (TMP) y fosfomicina (FOS). Los antibióticos usados para tratar las infecciones micobacterianas y que pueden destruir, reducir o inhibir el crecimiento de las micobacterias no son útiles en el suplemento antibiótico descrito en la presente memoria, e incluyen, por ejemplo, isoniazida, rifampina, pirazinamida, estreptomina y etambutol. Como se discutió previamente en la presente memoria, el presente cesionario comercializa y vende un Suplemento Antimicrobiano MB/BacT[®] que es un suplemento 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), trimetoprima (0,00105% p/v), y vancomicina (0,0005% p/v). Sin embargo, se ha descubierto inesperadamente que la fosfomicina se puede complementar con azlocilina y vancomicina para producir un suplemento antimicrobiano (SAM) que se puede usar para el crecimiento y la detección mejorada de micobacterias en cultivo, en comparación con el Suplemento Antimicrobiano MB/BacT[®] convencional/antiguo.

Como tal, el suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) mejorado comprende un suplemento liofilizado formulado para contener anfotericina B (AMP B), polimixina B (POLI B), trimetoprima (TMP), ácido nalidíxico (NA) y fosfomicina (FOS). El suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) se puede formular de forma que el medio de cultivo final contendrá una concentración final de alrededor de 400 unidades/ml a alrededor de 2000 unidades/ml de polimixina B, de alrededor de 50 µg/ml a alrededor de 400 µg/ml de anfotericina B, de alrededor de 100 µg/ml a alrededor de 800 µg/ml de ácido nalidíxico, de alrededor de 10 µg/ml a alrededor de 100 µg/ml de trimetoprima y de alrededor de 100 µg/ml a alrededor de 1000 µg/ml de fosfomicina.

El suplemento de nutrientes (SN) y el suplemento antimicrobiano (SAM) pueden formar un kit diferente que se puede añadir después a un frasco de medio de cultivo esterilizado de manera terminal. En este caso, el kit de SN/SAM se puede comercializar y vender por separado como aditivo para el frasco BacT/ALERT MP.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente las características de los medios y los métodos descritos en la presente memoria.

Ejemplos

EJEMPLO 1. TTD de diversas cepas de micobacterias con y sin complementación de ácidos grasos

Para estudiar el efecto de los ácidos grasos (AG) de cadena larga sobre el crecimiento de las micobacterias, se seleccionó ASB sin ácidos grasos (SAG) de Proliant, Inc. (Ames, Iowa). Se identificaron cinco 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 suplementos de AG basándose en el perfil de AG y el rendimiento del crecimiento. Se preparó una formulación nueva de suplemento con ASB SAG y se ensayó con y sin los cinco AG (véase la Tabla 1 para la formulación nueva de suplemento). Los niveles objetivo de la complementación de AG se basaron en el contenido de AG obtenido de las determinaciones previas. La concentración de ASB SAG usada fue 10 g/L. La pérdida de AG durante la filtración del suplemento nuevo se determinó mediante análisis de éster metílico de ácidos grasos (EMAG). Se observó que la recuperación de AG fue >80% tras la filtración con un filtro de 0,45 µm. El análisis de esta formulación demostró que los niveles mayores de ASB mejoraron la solubilización y la estabilidad de AG mediante la unión ASB-AG (datos no mostrados). El análisis también demostró que cuanto menor fue el contenido de ASB, menor fue la unión de AG, lo que dio como resultado una pérdida mayor de AG durante la filtración.

Se ideó un frasco de cultivo nuevo autoclavable transfiriendo los componentes termolábiles del medio de cultivo presente en el frasco convencional o antiguo al FR convencional/antiguo. El frasco de cultivo nuevo autoclavable comprendió Middlebrook 7H9. El suplemento de FR nuevo se preparó mediante el uso de la composición de FR

convencional o antiguo, pero modificándola para acomodar los componentes termolábiles transferidos desde la formulación del frasco MP antiguo. La Tabla 1 siguiente muestra la composición de un frasco MP nuevo autoclavable (como se describió anteriormente en la presente memoria) y un suplemento nuevo. El ASB usado en este suplemento nuevo fue ASB sin ácidos grasos (SAG) (Proliant Inc., Ames, Iowa) en vez del ASB convencional usado en el FR convencional/antiguo.

5

Tabla 1 - Frasco MP nuevo y formulaciones nuevas de suplemento

Frasco MP Nuevo		FR Modificado o Suplemento Nuevo	
Frasco de Cultivo MP		Fluido de Reconstitución	
Materia Prima	g/L	Materia Prima	g/L
Middlebrook 7H9	4,7	Albúmina de Suero Bovino	210
		Digestión pancreática de Caseína	20
		Catalasa de Hígado Bovino	0,86
		Glicerol	50
		Ácido oleico	0,475
		Piruvato sódico	20
		Amaranto	0,04

Para el rendimiento del crecimiento, se ensayaron cinco organismos (*M. tuberculosis*, *M. avium*, y *M. intracellulare*). Se usó la formulación de SAM convencional para estos experimentos. Se usó el suplemento nuevo con/sin complementación con AG y FR convencional/antiguo para rehidratar un polvo liofilizado del suplemento antibiótico MB BacT convencional o antiguo (SAM convencional/antiguo) (bioMérieux, Inc.). El SAM convencional/antiguo contuvo 1000 unidades/ml de polimixina B (POLI B), 180 µg/ml de anfotericina B (AMP B), 400 µg/ml de ácido nalidíxico (NA), 10,5 µg/ml de trimetoprima (TMP), 34 µg/ml de Azlocilina (AZL) y 5 µg/ml de Vancomicina (VAN).

10

Para el suplemento nuevo, se usó el frasco BacT/ALERT® MP nuevo autoclavable (como se describió anteriormente en la presente memoria), y para el FR convencional/antiguo se usó el frasco MP convencional/antiguo. Antes de la inoculación de los frascos de cultivo MP nuevos y convencionales/antiguos (bioMérieux, Inc.) con cultivos de micobacterias, se añadieron 0,5 ml de suplemento nuevo con/sin AG o 0,5 ml de FR convencional/antiguo a un grupo de frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. El SAM convencional rehidratado (con el uso del suplemento nuevo con/sin AG y FR convencional/antiguo) se añadió al segundo grupo de frascos de cultivo MP. El crecimiento (como TTD del crecimiento) se comparó en estos frascos para los cultivos de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium tuberculosis* tras inocularlos con aproximadamente $0,5 \times 10^3$ UFC/ml. También se llevaron a cabo recuentos de colonias mediante el uso de placas de agar Middlebrook 7H10 para verificar los niveles de los inóculos y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron en un sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) a 35-37 °C sin balanceo durante 35 días. Los datos del tiempo de detección (TTD) se recogieron cuando el instrumento BacT/ALERT® declaró los frascos positivos. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en las Figuras 1A-1C.

15

20

25

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

Organismo	Suplemento	ASB	Ácidos Grasos	TTD Med.	TTD Desv. Est.	TTD Min.	TTD Máx.	Nº de Positivos	Nº Ensayado
<i>M. avium</i> 25291	Medio solo	Convencional	Sin AG	15,1	0,7	14,3	16,0	5	5
		SAG	AG	15,3	0,5	14,8	15,8	5	5
		SAG	Sin AG	17,0	0,6	16,2	17,7	5	5
	Medio+ SAM	Convencional	Sin AG	18,1	0,9	16,7	19,0	5	5
		SAG	AG	16,8	0,9	15,8	17,7	5	5
		SAG	Sin AG	21,0	0,8	20,3	22,0	5	5
<i>M. intracellulare</i> 13950	Medio solo	Convencional	Sin AG	8,3	0,3	7,8	8,7	5	5
		SAG	AG	7,9	0,3	7,5	8,2	5	5
		SAG	Sin AG	12,5	0,5	11,7	12,8	5	5
	Medio+ SAM	Convencional	Sin AG	18,7	2,7	16,0	22,5	5	5

Organismo	Suplemento	ASB	Ácidos Grasos	TTD Med.	TTD Desv. Est.	TTD Min.	TTD Máx.	Nº de Positivos	Nº Ensayado
		SAG	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	Medio solo	Convencional	Sin AG	19,3	0,4	18,7	19,7	5	5
		SAG	AG	18,7	0,8	17,7	19,5	5	5
			Sin AG	19,9	0,5	19,3	20,3	5	5
	Medio+ SAM	Convencional	Sin AG	25,6	4,0	20,2	31,5	5	5
		SAG	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 muestra los resultados de TTD para *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos que contenían ASB sin AG (SAG) con y sin complementación de ácidos grasos de cadena larga. Como se muestra en la Figura 1A, se observó una reducción en el TTD en las muestras que contenían ASB sin AG complementado con AGs en comparación con las muestras que contenían ASB sin complementación con AG.

La Figura 1B muestra los resultados de TTD para *Mycobacterium intracellulare* en los cultivos que contenían ASB sin AG (SAG) con y sin complementación de ácidos grasos de cadena larga. Como se muestra en la Figura 1B, se observó una reducción en el TTD en las muestras que contenían ASB sin AG complementado con AGs en comparación con las muestras que contenían ASB sin complementación con AG.

10 La Figura 1C muestra los resultados de TTD para *Mycobacterium avium* en los cultivos que contenían ASB sin AG (SAG) con y sin complementación de ácidos grasos de cadena larga. Como se muestra en la Figura 1C, se observó una reducción en el TTD en las muestras que contenían ASB sin AG complementado con AGs en comparación con las muestras que contenían ASB sin complementación con AG.

15 Los resultados demostraron una mejora en el TTD de *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, y *M. avium* de 2 a 2,5 días en presencia del suplemento antimicrobiano micobacteriano (SAM) y del suplemento de nutrientes (SN) nuevo. Como se discutió anteriormente en la presente memoria, el SN nuevo comprende ASB sin ácidos grasos y complementado con ácidos grasos de cadena larga.

EJEMPLO 2. TTD de cepas de micobacterias con y sin α -cetoglutarato

20 Para mejorar adicionalmente el TTD de las micobacterias, se seleccionaron sustratos y/o cofactores de enzimas productoras de CO₂ de las rutas de las células micobacterianas para su estudio adicional, lo que incluye α -cetoglutarato, isocitrato, L-malato, ácido oxalacético, lactato y L-arginina. Se preparó el suplemento nuevo con AG y se esterilizó mediante filtración como se explicó anteriormente. Los sustratos se añadieron a diferentes concentraciones en el suplemento nuevo.

25 Se ensayaron cuatro especies de micobacterias a $0,5 \times 10^3$ UFC/ml. Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de α -cetoglutarato sobre el crecimiento (como TTD del crecimiento) de cultivos de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium tuberculosis*. Se usó un frasco de cultivo BacT/ALERT[®] MP nuevo autoclavable (como se describió anteriormente en la presente memoria). Antes de la inoculación de los frascos de cultivo MP con los cultivos de micobacterias, se añadieron 0,5 ml de suplemento nuevo con diversas cantidades de α -cetoglutarato a los frascos de cultivo BacT/ALERT[®] MP nuevos. También se llevaron a cabo recuentos de colonias mediante el uso de placas de agar Middlebrook 7H10 para verificar los niveles de los inóculos y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37 °C en un sistema BacT/ALERT[®] 3D sin balanceo durante 35 días. Los datos del tiempo de detección (TTD) se recogieron cuando el instrumento BacT/ALERT[®] declaró los frascos positivos.

35 Los resultados para el TTD de las especies de micobacterias clave con la inclusión de dos concentraciones de α -cetoglutarato de 5 y 15 g/L se presentan en la Tabla 3 y la Figura 2. La Tabla 3 y la Figura 2 muestran que la adición de α -cetoglutarato (5 g/L o 15 g/L) a un medio de cultivo dio como resultado una reducción aproximada de dos días en el tiempo de detección (TTD) del crecimiento en cultivos de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium tuberculosis* en comparación con un medio de cultivo que no contenía α -cetoglutarato.

40 Se llevaron a cabo experimentos similares mediante el uso de diferentes concentraciones de isocitrato, L-malato, ácido oxalacético, lactato y L-arginina, sin embargo, a diferencia de α -cetoglutarato, estos otros sustratos no mostraron una reducción en el TTD (datos no mostrados).

Tabla 3 - TTD de especies de micobacterias con y sin α -cetoglutarato

Organismo	Sustrato	TTD Med.	TTD Desv. Est.	TTD Min.	TTD Máx.	Nº de positivos	Nº ensayado
<i>M. avium</i> 25291	Sin α -ceto glutarato	15,6	0,2	15,5	15,8	3	3
	α -ceto glutarato-5 g	13,8	1,1	12,7	14,8	3	3
	α -ceto glutarato-15 g	13,5	1,3	12,2	14,8	3	3
<i>M. intracellulare</i> 13950	Sin α -ceto glutarato	11,6	1,3	10,7	13,0	3	3
	α -ceto glutarato-5 g	9,0	0,3	8,7	9,2	3	3
	α -ceto glutarato-15 g	8,8	0,4	8,5	9,2	3	3
MTB 27294	Sin α -ceto glutarato	15,7	0,8	14,8	16,2	3	3
	α -ceto glutarato-5 g	14,3	0,8	13,8	15,2	3	3
	α -ceto glutarato-15 g	13,9	0,2	13,7	14,0	3	3

EJEMPLO 3. TTD de especies de micobacterias con SAM convencional

5 La eficacia del SAM convencional hacia el crecimiento de micobacterias se determinó estudiando el efecto de seis fármacos que incluían polimixina B (POLI B), anfotericina B (AMP B), ácido nalidíxico (NA), trimetoprima (TMP), Azlocilina (AZL) y Vancomicina (VAN). Estos estudios se llevaron a cabo también para identificar los fármacos y las concentraciones que tuvieron efectos adversos sobre el crecimiento de las micobacterias.

10 Para el rendimiento del crecimiento, se preparó FR convencional/antiguo, y se añadieron diferentes concentraciones de seis antimicrobianos. Las concentraciones se seleccionaron como niveles 25-50% menores o mayores que las concentraciones del SAM convencional que son 1000 unidades/ml de polimixina B (POLI B), 180 μ g/ml de anfotericina B (AMP B), 400 μ g/ml de ácido nalidíxico (NA), 10,5 μ g/ml de trimetoprima (TMP), 34 μ g/ml de Azlocilina (AZL) y 5 μ g/ml de Vancomicina (VAN).

15 Se determinó el crecimiento (como TTD del crecimiento) para *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, y *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de azlocilina en el medio de cultivo. También se estudió la inhibición de gram-positivos, gram-negativos y levaduras que podrían estar presentes en una muestra de esputo (denominada flora respiratoria contaminante, o FRC) en paralelo con las mismas formulaciones (datos no mostrados).

20 Para este estudio, se usó la formulación MP convencional o antigua (bioMérieux, Inc.). Antes de la inoculación de los frascos de cultivo MP con micobacterias u otros cultivos bacterianos/de levaduras, se añadieron 0,5 ml de FR convencional/antiguo con diferentes fármacos a los frascos de cultivo BacT/ALERT[®] MP convencionales (bioMérieux, Inc.). También se llevaron a cabo recuentos de colonias mediante el uso de placas de agar Middlebrook 7H10 o agar-sangre de oveja o agar-triptona de soja para verificar los niveles del inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37 °C en un sistema BacT/ALERT[®] 3D (bioMérieux, Inc.) sin balanceo durante 35 días para los cultivos de micobacterias y hasta 15 días para otros cultivos. Los datos del tiempo de detección (TTD) se recogieron cuando el instrumento BacT/ALERT declaró los frascos positivos. Los resultados se muestran en las Tablas 4-5 y las Figuras 3-4.

30 Como se muestra en la Tabla 4 y la Figura 3, el uso de azlocilina en un medio de cultivo tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento (como se determinó mediante el TTD del crecimiento) de *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, y *Mycobacterium tuberculosis*, en comparación con un medio de cultivo que no contuvo agentes antimicrobianos.

Se determinó el crecimiento (como TTD del crecimiento) para *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, y *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de vancomicina en el medio de cultivo.

35 Como se muestra en la Tabla 5 y la Figura 4, el uso de vancomicina en un medio de cultivo tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento (como se determinó mediante el TTD del crecimiento) de *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, y *Mycobacterium tuberculosis*, en comparación con un medio de cultivo que no contuvo agentes antimicrobianos.

40 El uso de otros fármacos en un medio de cultivo no tuvo ningún impacto adverso sobre el crecimiento de las micobacterias (datos no mostrados) incluso a las concentraciones superiores ensayadas. Las concentraciones superiores de los fármacos fueron capaces de inhibir la mayoría de FRC durante 10-15 días, con algunas excepciones de gram-negativos (datos no mostrados).

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

Organismo	Suplemento	TTD Medio	TTD Desv. Est.	TTD Min.	TTD Máx.	Nº de Positivos	Nº Ensayado
<i>M. avium</i> 25291	Medio+ AZL 12	20,1	2,2	17,8	22,8	4,0	4,0
	Medio+ AZL 24	22,2	1,8	20,7	24,3	4,0	4,0
	Medio+ AZL 48	21,2	1,6	19,8	23,0	4,0	4,0
	Medio- Sin fárm.	18,6	0,9	17,7	19,5	3,0	3,0
<i>M. fortuitum</i> 6841	Medio+ AZL 12	4,0	0,2	3,8	4,2	4,0	4,0
	Medio+ AZL 24	4,2	0,3	3,8	4,5	4,0	4,0
	Medio+ AZL 48	4,1	0,2	3,8	4,3	4,0	4,0
	Medio- Sin fárm.	3,8	0,3	3,5	4,0	3,0	3,0
<i>M. intracellulare</i> 13950	Medio+ AZL 12	16,4	1,1	15,3	18,0	4,0	4,0
	Medio+ AZL 24	19,8	4,7	16,8	26,8	4,0	4,0
	Medio+ AZL 48	20,0	1,1	19,2	20,8	2,0	4,0
	Medio- Sin fárm.	8,5	0,2	8,3	8,7	3,0	3,0
<i>M. kansasii</i> 12478	Medio+ AZL 12	18,5	1,1	17,7	19,7	3,0	4,0
	Medio+ AZL 24	18,9	1,8	16,5	20,5	4,0	4,0
	Medio+ AZL 48	20,5	#DIV/0!	20,5	20,5	1,0	4,0
	Medio- Sin fárm.	14,8	1,8	13,0	16,5	3,0	3,0
<i>M. scrofulaceum</i> 19981	Medio+ AZL 12	24,2	0,2	24,0	24,3	2,0	4,0
	Medio+ AZL 24						4,0
	Medio+ AZL 48	21,7	#DIV/0!	21,7	21,7	1,0	3,0
	Medio- Sin fárm.	15,4	0,5	15,0	16,0	3,0	3,0
<i>M. tuberculosis</i> 27294	Medio+ AZL 12	15,4	0,8	14,7	16,5	4,0	4,0
	Medio+ AZL 24	16,0	0,9	15,3	17,3	4,0	4,0
	Medio+ AZL 48	15,4	0,5	14,7	15,8	4,0	4,0
	Medio- Sin fárm.	15,5	0,8	14,7	16,2	3,0	3,0
<i>M. tuberculosis</i> 25177	Medio+ AZL 12	22,4	3,7	17,0	24,8	4,0	4,0
	Medio+ AZL 24	23,8	4,2	20,8	26,8	2,0	4,0
	Medio+ AZL 48	24,8	0,1	24,7	24,8	2,0	4,0
	Medio- Sin fárm.	23,6	1,3	22,2	24,8	3,0	3,0

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

Organismo	Suplemento	TTD Medio	TTD Desv. Est.	TTD Min.	TTD Máx.	Nº de Positivos	Nº Ensayado
<i>M. avium</i> 25291	Medio+VAN 1,75	20,6	2,2	18,5	22,8	3,0	4,0
	Medio+VAN 3,5	21,2	1,6	19,8	22,7	4,0	4,0
	Medio+VAN 7	20,6	2,0	18,3	23,2	4,0	4,0
	Medio-Sin fárm.	19,4	0,4	19,0	19,8	3,0	3,0
<i>M. fortuitum</i> 6841	Medio+VAN 1,75	4,7	0,3	4,5	5,2	4,0	4,0
	Medio+VAN 3,5	4,1	0,3	3,7	4,5	4,0	4,0

Organismo	Suplemento	TTD Medio	TTD Desv. Est.	TTD Min.	TTD Máx.	Nº de Positivos	Nº Ensayado
	Medio+VAN 7	4,8	0,5	4,3	5,3	4,0	4,0
	Medio-Sin fárm.	4,2	0,3	4,0	4,5	3,0	3,0
<i>M. intracellulare</i> 13950	Medio+VAN 1,75	9,4	0,1	9,2	9,5	4,0	4,0
	Medio+VAN 3,5	9,7	0,3	9,5	10,2	4,0	4,0
	Medio+VAN 7	10,3	0,7	9,7	11,2	4,0	4,0
	Medio-Sin fárm.	9,3	0,2	9,2	9,5	3,0	3,0
<i>M. kansasii</i> 12478	Medio+VAN 1,75	17,7	0,8	17,0	18,8	4,0	4,0
	Medio+VAN 3,5	21,5	0,4	21,2	21,8	2,0	4,0
	Medio+VAN 7						4,0
	Medio-Sin fárm.	16,5	0,2	16,3	16,7	3,0	3,0
<i>M. scrofulaceum</i> 19981	Medio+VAN 1,75	14,2	1,0	12,8	15,3	4,0	4,0
	Medio+VAN 3,5	14,0	1,2	12,2	15,0	4,0	4,0
	Medio+VAN 7	15,3	-	15,3	15,3	1,0	1,0
	Medio-Sin fárm.	13,9	0,8	13,2	14,8	3,0	3,0
MTB 25177	Medio+VAN 1,75	23,7	0,9	23,0	24,3	2,0	4,0
	Medio+VAN 3,5						4,0
	Medio+VAN 7						4,0
	Medio-Sin fárm.	22,6	0,8	21,8	23,3		3,0
MTB 27294	Medio+VAN 1,75	16,3	0,7	15,3	16,8	4,0	4,0
	Medio+VAN 3,5	16,0	0,6	15,5	16,8	4,0	4,0
	Medio+VAN 7	18,3	0,9	17,2	19,0	4,0	4,0
	Medio-Sin fárm.	15,4	1,1	14,7	16,7	3,0	3,0

EJEMPLO 4. TTD de diversas especies de micobacterias con diversas formulaciones de SAM

Para mejorar el TTD de micobacterias, se cribaron diversos fármacos por su capacidad de inhibir la flora respiratoria contaminante (FRC). A partir de estas determinaciones, se consideró que la fosfomicina fue la mejor elección para la inhibición de la FRC.

Se llevó a cabo un estudio para determinar la mejor formulación posible para un cóctel de SAM nuevo, se ensayaron diversas formulaciones que contenían diferentes concentraciones de TMP, NA, FOS y POLI B. Se evaluaron las siguientes fórmulas: (1) SN: Frasco nuevo + Suplemento de Nutrientes (SN); (2) FR: Frasco MP convencional/antiguo + Fluido de Recon. convencional/antiguo; (3) Fórmula 1: SN + TMP (30 µg/ml), NA (600 µg/ml), POLI B (1250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Amp B (180 µg/ml-PI o IFU); (4) Fórmula 2: SN + TMP (30 µg/ml), NA (400 µg/ml-PI o IFU), POLI B (1250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Amp B (180 µg/ml-PI o IFU); (5) Fórmula 3: SN + TMP (30 µg/ml), NA (400 µg/ml-PI o IFU), POLI B (1500 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Amp B (180 µg/ml-PI o IFU); (6) Fórmula 4: SN + TMP (30 µg/ml), NA (600 µg/ml), POLI B (1250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Amp B (180 µg/ml-PI o IFU); y (7) Fórmula 5: SN + TMP (50 µg/ml), NA (400 µg/ml-PI o IFU), POLI B (1250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Amp B (180 µg/ml-PI o IFU); En los que TMP es trimetoprima, NA es ácido nalidíxico, POLI B es polimixina B, FOS es fosfomicina, y Amp B es anfotericina B.

El suplemento nuevo que contenía ASB sin ácidos grasos (SAG), 5 ácidos grasos de cadena larga y α-cetoglutarato, denominado suplemento de nutrientes (SN), se preparó y se esterilizó mediante filtración como se explicó previamente. Se usó el frasco de cultivo MP nuevo autoclavable (como se describió anteriormente en la presente memoria) para este estudio. La Tabla 6 muestra la composición del frasco de cultivo MP nuevo y del suplemento de nutrientes (SN).

Tabla 6 - Frasco de cultivo nuevo y formulaciones nuevas de suplemento de nutrientes

Frasco de cultivo BacT/ALERT MP nuevo		Suplemento de Nutrientes (SN)	
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 de Ácido Mirístico nº 2	0,167 g
		Palmitato Sódico nº 3	0,088 g
		Oleato Sódico nº 4	0,113 g
		Ácido Linoleico Sodio nº 5	0,111 g
		Albúmina de Suero Bovino (ASB)	210 g
		Catalasa	0,064 g
		Digestión pancreática de Caseína	20 g
		Piruvato Sódico	20 g
		Amaranto	0,04 g
		α-Ceto-glutarato	5 g

5 Para el SN nuevo, se usó un frasco BacT/ALERT® MP esterilizado en autoclave o nuevo (como se describió anteriormente en la presente memoria), y para el FR convencional/antiguo, se usó un frasco MP convencional/antiguo (bioMérieux, Inc.). Antes de la inoculación de los frascos de cultivo MP antiguos o nuevos con micobacterias u otros cultivos bacterianos/de levaduras, se añadieron 0,5 ml del suplemento de nutrientes (SN nuevo) o 0,5 ml de FR convencional/antiguo con diferentes fármacos a un grupo de los frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. Las fórmulas del SAM convencional (con el uso de FR convencional/antiguo) y del SAM nuevo (con el uso de SN) se añadieron al segundo grupo de 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. También se llevaron a cabo recuentos de colonias mediante el uso de placas de agar Middlebrook 7H10 o agar-sangre de oveja o agar-triptona de soja para verificar los niveles del inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron a 35-37 °C en un sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) sin balanceo durante 35 días para los cultivos de micobacterias y hasta 15 días para otros cultivos. Los datos del tiempo de detección (TTD) se recogieron cuando el instrumento BacT/ALERT® declaró los frascos positivos. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y en las Figuras 5A-5F.

Todas las fórmulas nuevas de SAM consiguieron una mejor inhibición de las bacterias gram-negativas en comparación con el SAM convencional/antiguo. Hubo un crecimiento intercurrente de especies de estafilococos y enterococos con las fórmulas nuevas en comparación con el SAM convencional/antiguo.

20 La Tabla 7 y la Figura 5A muestran el TTD de *M. tuberculosis* 18283 con diversas formulaciones de SAM. Las 5 formulaciones nuevas mostraron una mejora en el TTD en comparación con la formulación convencional/antigua para el SAM. La mejora en el TTD para *M. tuberculosis* 18283 con la formulación nueva de SAM fue de aproximadamente 6-8 días.

25 La Tabla 7 y la Figura 5B muestran el TTD de *M. tuberculosis* 27294 con diversas formulaciones de SAM. Las 5 formulaciones nuevas mostraron una mejora en el TTD en comparación con la formulación convencional/antigua para el SAM. La mejora en el TTD para *M. tuberculosis* 27294 con la formulación nueva de SAM fue de aproximadamente 3-4 días.

30 La Tabla 7 y la Figura 5C muestran el TTD de *M. avium* 569 con diversas formulaciones de SAM. Las 5 formulaciones nuevas mostraron una mejora en el TTD en comparación con la formulación convencional/antigua para el SAM. La mejora en el TTD para *M. avium* 569 con la formulación nueva de SAM fue de aproximadamente 6-7 días.

35 La Tabla 7 y la Figura 5D muestran el TTD de *M. intracellulare* 13950 con diversas formulaciones de SAM. Las 5 formulaciones nuevas mostraron una mejora en el TTD en comparación con la formulación convencional/antigua para el SAM. La mejora en el TTD para *M. intracellulare* 13950 con la formulación nueva de SAM fue de aproximadamente 8-9 días.

La Tabla 7 y la Figura 5E muestran el TTD de *M. scrofulaceum* 19981 con diversas formulaciones de SAM. Las 5

formulaciones nuevas mostraron una mejora en el TTD en comparación con la formulación convencional/antigua para el SAM. La mejora en el TTD para *M. scrofulaceum* 19981 con la formulación nueva de SAM fue de aproximadamente 6-7 días. En particular, 2 de las 5 muestras ensayadas para *M. scrofulaceum* 19981 no mostraron crecimiento con la formulación de SAM convencional/antigua.

- 5 La Tabla 7 y la Figura 5F muestran el TTD de *M. kansasii* 12478 con diversas formulaciones de SAM. Las 5 formulaciones nuevas mostraron una mejora en el TTD en comparación con la formulación convencional/antigua para el SAM. La detección en el TTD para *M. kansasii* 12478 fue de aproximadamente 13-14 días con el SAM nuevo en comparación con la ausencia de crecimiento detectada con la formulación de SAM convencional/antigua.

Tabla 7 - TTD de diversas especies

Organismo	FR	Suplemento	TTD Medio	TTD Desv. Est.	TTD Min.	TTD Máx.	Nº de Positivos	Nº Ensayado
<i>M. avium</i> 569	1	SN-sin fármacos	9,2	0,5	8,7	9,7	3,0	3,0
	3	SN+Fórmula 1	9,0	0,6	8,5	10,0	5,0	5,0
	4	SN+Fórmula 2	9,3	0,6	8,8	10,3	5,0	5,0
	5	SN+Fórmula 3	8,4	0,3	8,0	8,7	5,0	5,0
	6	SN+Fórmula 4	8,5	0,2	8,3	8,8	5,0	5,0
	7	SN+Fórmula 5	9,2	0,3	8,7	9,5	5,0	5,0
	8	FR-sin fármacos	9,4	0,4	9,0	9,7	3,0	3,0
	9	FR+SAM ant.	14,6	0,4	14,3	15,0	3,0	3,0
<i>M. intracellulare</i> 13950	1	SN-sin fármacos	9,2	0,1	9,2	9,3	3,0	3,0
	3	SN+Fórmula 1	9,5	0,3	9,0	9,7	5,0	5,0
	4	SN+Fórmula 2	9,4	0,1	9,3	9,5	5,0	5,0
	5	SN+Fórmula 3	9,4	0,3	9,0	9,7	5,0	5,0
	6	SN+Fórmula 4	10,0	0,2	9,7	10,3	5,0	5,0
	7	SN+Fórmula 5	9,2	0,2	9,0	9,5	5,0	5,0
	8	FR-sin fármacos	8,1	0,1	8,0	8,2	3,0	3,0
	9	FR+SAM ant.	17,2	1,3	15,8	18,2	3,0	3,0
<i>M. kansasii</i> 12478	1	SN-sin fármacos	12,3	0,6	11,7	12,8	3,0	3,0
	3	SN+Fórmula 1	13,7	0,3	13,3	14,2	5,0	5,0
	4	SN+Fórmula 2	13,4	0,7	12,7	14,3	5,0	5,0
	5	SN+Fórmula 3	13,4	0,5	13,0	14,2	5,0	5,0
	6	SN+Fórmula 4	13,9	0,6	13,2	14,8	5,0	5,0
	7	SN+Fórmula 5	14,0	0,8	13,0	15,3	5,0	5,0
	8	FR-sin fármacos	17,3	0,5	16,7	17,7	3,0	3,0
	9	FR+SAM ant.						3,0
<i>M. scrofulaceum</i> 19981	1	SN-sin fármacos	12,3	0,4	12,0	12,7	3,0	3,0
	3	SN+Fórmula 1	11,0	0,5	10,3	11,5	5,0	5,0
	4	SN+Fórmula 2	11,1	0,1	11,0	11,3	5,0	5,0
	5	SN+Fórmula 3	11,1	0,3	10,5	11,3	5,0	5,0
	6	SN+Fórmula 4	11,3	0,2	11,2	11,5	5,0	5,0
	7	SN+Fórmula 5	10,8	0,3	10,5	11,2	5,0	5,0
	8	FR-sin fármacos	12,3	0,2	12,2	12,5	3,0	3,0
	9	FR+SAM ant.	17,5	1,1	16,7	18,3	2,0	3,0

Organismo	FR	Suplemento	TTD Medio	TTD Desv. Est.	TTD Min.	TTD Máx.	Nº de Positivos	Nº Ensayado
MTB 18283	1	SN-sin fármacos	9,3	0,1	9,2	9,3	3,0	3,0
	3	SN+Fórmula 1	10,1	0,9	9,2	11,3	5,0	5,0
	4	SN+Fórmula 2	9,5	0,4	9,0	10,0	5,0	5,0
	5	SN+Fórmula 3	9,7	0,3	9,5	10,3	5,0	5,0
	6	SN+Fórmula 4	10,8	0,3	10,5	11,2	5,0	5,0
	7	SN+Fórmula 5	10,1	0,6	9,5	10,8	5,0	5,0
	8	FR-sin fármacos	11,3	0,5	10,8	11,7	3,0	3,0
	9	FR+SAM ant.	17,5	0,9	16,5	18,2	3,0	3,0
MTB 27294	1	SN-sin fármacos	13,6	0,6	13,3	14,3	3,0	3,0
	3	SN+Fórmula 1	12,9	0,1	12,8	13,0	5,0	5,0
	4	SN+Fórmula 2	13,1	0,3	12,7	13,5	5,0	5,0
	5	SN+Fórmula 3	13,0	0,3	12,8	13,5	5,0	5,0
	6	SN+Fórmula 4	13,2	0,4	12,7	13,7	5,0	5,0
	7	SN+Fórmula 5	12,5	0,3	12,2	13,0	5,0	5,0
	8	FR-sin fármacos	12,6	0,4	12,2	13,0	3,0	3,0
	9	FR+SAM ant.	14,8	0,8	14,0	15,5	3,0	3,0

EJEMPLO 5. Comparación de la formulación anterior de SAM frente a la formulación nueva de SAM para el TTD del crecimiento del complejo *M. tuberculosis*

5 Se seleccionó la fórmula del frasco MP nuevo y del suplemento de nutrientes y la fórmula 5 del SAM nuevo para los ensayos adicionales. Este estudio se llevó a cabo con cepas del complejo *M. tuberculosis* que incluyen *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, y *Mycobacterium tuberculosis*. La composición de la fórmula 5 fue: SN + TMP (50 µg/ml), NA (400 µg/ml-PI o IFU), POLI B (1250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Amp B (180 µg/ml- PI o IFU).

10 Para las fórmulas nuevas de SAM y SN, se usó un frasco BacT/ALERT® MP nuevo, esterilizado en autoclave (como se describió anteriormente en la presente memoria), y para FR convencional/antiguo, se usó un 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 del suplemento de nutrientes (SN nuevo) o 0,5 ml de FR convencional/antiguo con diferentes fármacos a un grupo de los frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. Las fórmulas del SAM convencional (con el uso de FR convencional/antiguo) y del SAM nuevo (con el uso de SN) se añadieron al
15 segundo grupo de frascos de cultivo MP.

20 El inóculo de micobacterias fue $0,5 \times 10^3$ UFC/ml. También se llevaron a cabo recuentos de colonias mediante el uso de placas de agar Middlebrook 7H10 o agar-sangre de oveja o agar-triptona de soja para verificar los niveles del inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron en un sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) a 35-37 °C sin balanceo durante 35 días para los cultivos de micobacterias. Los datos del tiempo de detección (TTD) se recogieron cuando el instrumento BacT/ALERT declaró los frascos positivos.

25 Se determinó el crecimiento (como TTD del crecimiento) para las cepas del complejo *M. tuberculosis* comparando el FR convencional/antiguo y SAM (FR + SAM convencional/antiguo) y el suplemento de nutrientes nuevo y SAM nuevo (SN + SAM Nuevo). Se determinó el TTD para cuatro de cinco cepas del complejo *M. tuberculosis*, es decir, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, y *Mycobacterium tuberculosis* en un medio de cultivo de FR + SAM Convencional/antiguo y medio de cultivo SN + SAM Nuevo. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y la Figura 6.

30 Como se muestra en la Tabla 8 y la Figura 6, SN + SAM nuevo muestra una mejora aproximada de 1-10 días en el TTD para el crecimiento de las cepas del complejo *M. tuberculosis* en comparación con FR + SAM convencional/antiguo.

Tabla 8 - TTD del complejo *M. tuberculosis*

Organismo	Suplemento	TTD Medio (días)	TTD Desv. Est. (días)	TTD Min. (días)	TTD Máx. (días)	Nº de Positivos	Nº Ensayado
<i>M. africanum</i> 25420	SN+Fórmula 5	14,2	0,3	13,8	14,7	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	15,5	0,8	14,8	16,3	3,0	3,0
<i>M. bovis</i> 8131	SN+Fórmula 5	18,4	1,3	17,2	19,7	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	20,4	2,1	18,2	22,3	3,0	3,0
<i>M. microti</i> 19422	SN+Fórmula 5	15,0	1,4	12,8	16,3	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	16,6	0,3	16,2	16,8	3,0	3,0
MTB 18283	SN+Fórmula 5	10,1	0,2	9,7	10,2	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	20,9	1,8	19,2	22,7	3,0	3,0
MTB 25177	SN+Fórmula 5	19,9	1,3	18,3	21,2	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	32,4	1,6	31,3	34,2	3,0	3,0
MTB 27294	SN+Fórmula 5	14,1	0,4	13,7	14,7	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	16,8	0,5	16,3	17,3	3,0	3,0

EJEMPLO 6. Comparación de la formulación anterior de SAM frente a la formulación nueva de SAM para el TTD del crecimiento de micobacterias distintas del bacilo tuberculoso (MOTT)

- 5 Se seleccionó la fórmula del frasco MP nuevo, del suplemento de nutrientes (SN) y la fórmula 5 del SAM nuevo para los ensayos adicionales. Este estudio se llevó a cabo mediante cepas de micobacterias distintas del bacilo tuberculoso (MOTT) que incluyen *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, y *Mycobacterium scrofulaceum*. La composición de la fórmula 5 fue: SN + TMP (50 µg/ml), NA (400 µg/ml-PI o IFU), POLI B (1250 unidades/ml), FOS (600 µg/ml), Amp B (180 µg/ml- PI o IFU).
- 10 Para las fórmulas nuevas y SN, se usó un frasco BacT/ALERT® MP esterilizado en autoclave o nuevo (como se describió anteriormente en la presente memoria), y para FR convencional/antiguo, se usó un 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 del suplemento de nutrientes (SN nuevo) o 0,5 ml de FR convencional/antiguo con diferentes fármacos a un grupo de los frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. Las fórmulas del SAM convencional (con el uso de FR convencional/antiguo) y del SAM nuevo (con el uso de SN) se añadieron al segundo grupo de frascos de cultivo MP.

15 El inóculo de micobacterias fue $0,5 \times 10^3$ UFC/ml. También se llevaron a cabo recuentos de colonias mediante el uso de placas de agar Middlebrook 7H10 o agar-sangre de oveja o agar-triptona de soja para verificar los niveles del inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron en un sistema BacT/ALERT 3D (bioMérieux, Inc.) a 35-37 °C sin balanceo durante 35 días para los cultivos de micobacterias. Los datos del tiempo de detección (TTD) se recogieron cuando el instrumento BacT/ALERT® declaró los frascos positivos. Los resultados se muestran en la Tabla 9 y la Figura 7.

20 Como se muestra en la Tabla 9 y la Figura 7, SN + SAM nuevo muestra una mejora aproximada de 1-12 días en el TTD para las micobacterias distintas del bacilo tuberculoso (MOTT) en comparación con FR + SAM convencional/antiguo.

Tabla 9 - TTD de micobacterias distintas del bacilo tuberculoso (MOTT)

Organismo	Suplemento	TTD Medio (días)	TTD Desv. Est. (días)	TTD Min. (días)	TTD Máx. (días)	Nº de Positivos	Nº Ensayado
<i>M. avium</i> 25291	SN+Fórmula 5	11,8	0,4	11,5	12,5	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	12,9	0,7	12,3	13,7	3,0	3,0
<i>M. avium</i> 569	SN+Fórmula 5	14,2	1,3	12,7	15,7	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	20,0	1,8	18,7	21,2	2,0	3,0

Organismo	Suplemento	TTD Medio (días)	TTD Desv. Est. (días)	TTD Min. (días)	TTD Máx. (días)	Nº de Positivos	Nº Ensayado
<i>M. intracellulare</i> 13950	SN+Fórmula 5	8,6	0,3	8,2	9,0	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	16,0	0,9	15,0	16,8	3,0	3,0
<i>M. intracellulare</i> 644	SN+Fórmula 5	13,8	1,0	12,7	14,7	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	29,9	2,6	28,0	31,7	2,0	3,0
<i>M. kansasii</i> 12478	SN+Fórmula 5	13,6	0,6	12,8	14,5	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	31,5	2,6	30,0	34,5	3,0	3,0
<i>M. scrofulaceum</i> 19981	SN+Fórmula 5	10,0	0,3	9,7	10,5	5,0	5,0
	FR+SAM Ant.	17,9	0,3	17,7	18,2	3,0	3,0

EJEMPLO 7. Comparación de la formulación anterior de SAM frente a dos formulaciones nuevas de SAM con diferentes concentraciones de FOS para el TTD de cepas de *M. tuberculosis*

5 La fórmula 5 del SAM nuevo se refinó adicionalmente para conseguir una mejor inhibición de la FRC incrementando la concentración de FOS de 600 µg/ml a 800 µg/ml. Se llevó a cabo el siguiente estudio con 10 cepas de *M. tuberculosis* a $0,5 \times 10^3$ UFC/ml. Diez cepas de *M. tuberculosis* constituidas por cuatro aislamientos del CDC, cinco cepas virulentas de la ATCC y una cepa de referencia de QC.

10 Para las fórmulas nuevas y SN nuevo, se usó un frasco BacT/ALERT® MP esterilizado en autoclave o nuevo (como se describió anteriormente en la presente memoria), y para FR convencional/antiguo, se usó un 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 del suplemento de nutrientes (SN nuevo) o 0,5 ml de FR convencional/antiguo con diferentes fármacos a un grupo de los frascos de cultivo BacT/ALERT® MP. Las fórmulas del SAM convencional (con el uso de FR convencional/antiguo) y del SAM nuevo (con el uso de SN nuevo) se añadieron al segundo grupo de frascos de cultivo MP.

15 El inóculo de micobacterias fue $0,5 \times 10^3$ UFC/ml. También se llevaron a cabo recuentos de colonias mediante el uso de placas de agar Middlebrook 7H10 o agar-sangre de oveja o agar-triptona de soja para verificar los niveles del inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron en un sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) a 35-37 °C sin balanceo durante 35 días para los cultivos de micobacterias. Los datos del tiempo de detección (TTD) se recogieron cuando el instrumento BacT/ALERT® declaró los frascos positivos. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

20 Como se muestra en la Tabla 10, las fórmulas nuevas de SAM mostraron una mejora aproximada de 2-8 días en el TTD para las cepas de *M. tuberculosis* en comparación con el FR + SAM convencional/antiguo.

Tabla 10 - TTD de diversas cepas de *M. tuberculosis* con fórmulas nuevas de SAM que contienen 600 µg/ml (SAM 5) y 800 µg/ml (Fórmula 5+ FOS 200 µg/ml)

Organismo	ID de la cepa	Suplemento	TTD Medio (días)	TTD Desv. Est. (días)	TTD Min. (días)	TTD Máx. (días)	Nº de Positivos	Nº Ensayado
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2663	SN+Fórmula 5	15,1	0,8	14,0	16,0	5,0	5,0
		SN+Fórmula 5+FOS 200	15,3	0,3	14,8	15,7	5,0	5,0
		FR+SAM Ant.	17,9	0,2	17,7	18,3	5,0	5,0
	2677	SN+Fórmula 5	17,3	0,5	16,7	18,0	5,0	5,0
		SN+Fórmula 5+FOS 200	17,2	0,6	16,5	18,0	5,0	5,0
	18283	FR+SAM Ant.	22,1	0,6	21,3	22,8	5,0	5,0
		SN+Fórmula 5	8,9	0,5	8,3	9,5	5,0	5,0
		SN+Fórmula 5+FOS 200	9,5	0,3	9,0	9,7	5,0	5,0
	18292	FR+SAM Ant.	17,0	0,8	16,0	18,2	5,0	5,0
		SN+Fórmula 5	13,9	0,7	13,3	14,7	5,0	5,0
		SN+Fórmula 5+FOS 200	14,1	0,3	13,7	14,5	5,0	5,0
	25177	FR+SAM Ant.	15,8	0,8	15,2	17,2	5,0	5,0
		SN+Fórmula 5	16,0	0,4	15,5	16,3	5,0	5,0
		SN+Fórmula 5+FOS 200	16,3	0,8	15,2	17,3	5,0	5,0
	27294	FR+SAM Ant.	19,1	0,3	18,8	19,5	5,0	5,0
SN+Fórmula 5		14,1	0,4	13,5	14,5	5,0	5,0	
SN+Fórmula 5+FOS 200		14,5	0,5	13,8	15,2	5,0	5,0	
35822	FR+SAM Ant.	16,3	0,4	15,7	16,7	5,0	5,0	
	SN+Fórmula 5	15,0	0,8	13,7	16,0	5,0	5,0	
	SN+Fórmula 5+FOS 200	15,7	0,3	15,3	16,2	5,0	5,0	
35837	FR+SAM Ant.	17,9	0,6	17,2	18,8	5,0	5,0	
	SN+Fórmula 5	14,8	1,0	13,5	16,3	5,0	5,0	
	SN+Fórmula 5+FOS 200	15,2	0,2	15,0	15,3	5,0	5,0	
35838	FR+SAM Ant.	17,8	0,4	17,2	18,2	5,0	5,0	
	SN+Fórmula 5	15,5	0,6	14,8	16,2	5,0	5,0	
	SN+Fórmula 5+FOS 200	15,7	0,4	15,2	16,2	5,0	5,0	
		FR+SAM Ant.	17,0	0,6	16,2	17,5	5,0	5,0

EJEMPLO 8. Comparación de la formulación anterior de SAM frente a dos formulaciones nuevas de SAM con diferentes concentraciones de FOS para la inhibición de la flora respiratoria contaminante (FRC)

La fórmula 5 del SAM nuevo se refinó adicionalmente para conseguir una mejor inhibición de la FRC incrementando la concentración de FOS de 600 µg/ml a 800 µg/ml. Se determinó el crecimiento o no crecimiento (NC) para diversos cultivos bacterianos gram-positivos o gram-negativos y de levaduras comparando el FR convencional/antiguo y SAM (FR + SAM convencional/antiguo) y las formulaciones nuevas de suplemento de nutrientes y de SAM (SN + SAM nuevo). Las formulaciones nuevas de SAM contuvieron la fórmula 5 + 200 µg/ml de FOS (un total de 800 µg/ml de FOS). Se ensayó la FRC a $0,6 \times 10^4$ UFC/ml. También se llevaron a cabo recuentos de colonias mediante el uso de placas de agar Middlebrook 7H10 o agar-sangre de oveja o agar-triptona de soja para verificar los niveles del inóculo y la pureza de los cultivos. Los frascos MP inoculados se cargaron en un sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc.) a 35-37 °C sin balanceo durante 15 días para todos los cultivos. Los datos del tiempo de detección (TTD) se recogieron cuando el instrumento BacT/ALERT® declaró los frascos positivos.

La Tabla 11 muestra que la formulación nueva de SAM fue una formulación mejor para inhibir el crecimiento de la FRC en comparación con la formulación de SAM convencional/antiguo.

Tabla 11 - Tabla que muestra la inhibición de la flora respiratoria contaminante (FRC)

Organismo	ID de la cepa	Suplemento	Contaminación Intercurrente
<i>Candida albicans</i>	11006	SN + Fórmula 5	NC
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	NC
	302876	SN + Fórmula 5	NC
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	1/5
<i>Enterococcus faecalis</i>	8711	SN + Fórmula 5	5/5
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	1/5
		FR + SAM Ant.	NC
	8340 (ERV)	SN + Fórmula 5	5/5
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	3/5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	109241	SN + Fórmula 5	NC
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	NC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	SN + Fórmula 5	NC
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	1/5
	106159	SN + Fórmula 5	NC
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	NC
<i>Staphylococcus aureus</i>	12535	SN + Fórmula 5	5/5
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	NC
	25923	SN + Fórmula 5	5/5
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	2/5
		FR + SAM Ant.	NC
	13305 (SARM)	SN + Fórmula 5	5/5

ES 2 602 467 T3

Organismo	ID de la cepa	Suplemento	Contaminación Intercurrente
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	NC
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7104	SN + Fórmula 5	5/5
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	1/5
		FR + SAM Ant.	NC
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13637	SN + Fórmula 5	NC
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	NC
	106259	SN + Fórmula 5	5/5
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	2/5
<i>Streptococcus oralis</i>	12975	SN + Fórmula 5	NC
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	NC
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	SN + Fórmula 5	5/5
		SN + Fórmula 5 + FOS 200	NC
		FR + SAM Ant.	NC

REIVINDICACIONES

1. Un método para el crecimiento mejorado de micobacterias que comprende añadir una muestra que contiene micobacterias a un medio de cultivo que contiene una cantidad eficaz de un aditivo que comprende α -cetoglutarato para proporcionar un medio de cultivo con una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L de α -cetoglutarato, y someter al medio de cultivo a condiciones adecuadas para el crecimiento de dichas micobacterias, en el que dicho aditivo mejora el crecimiento de dichas micobacterias, y reduce el tiempo de detección del crecimiento de las micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho crecimiento mejorado comprende reducir la fase de latencia del crecimiento de micobacterias en al menos 1 día.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho medio de cultivo está a un pH de entre alrededor de 5,5 a alrededor de 7,5.
4. El método de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho medio de cultivo comprende además un suplemento antimicrobiano, y en el que dicho suplemento antimicrobiano comprende uno o más antimicrobianos en una cantidad suficiente para inhibir la contaminación bacteriana, por levaduras o fúngica en dicho medio de cultivo, y preferiblemente en el que dicho o dichos antimicrobianos comprenden uno o más antibióticos, y en el que dicho o dichos antibióticos se seleccionan del grupo que consiste en polimixina B, vancomicina, azlocilina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y fosfomicina.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho suplemento antimicrobiano comprende polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y fosfomicina.
6. Un método para el diagnóstico de una infección provocada por una especie de micobacteria, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo; (b) añadir un suplemento de nutrientes a dicho medio de cultivo, y dicho aditivo de suplemento de nutrientes comprende α -cetoglutarato para proporcionar un medio de cultivo con una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L de α -cetoglutarato; (c) añadir una muestra en la se va a determinar la presencia o ausencia de dicha especie de micobacteria; y (d) analizar en dicho cultivo la presencia de dicha especie de micobacteria, en el que un hallazgo de la presencia de dicha especie de micobacteria indica un diagnóstico positivo para dicha infección, y en el que dicho aditivo de α -cetoglutarato reduce el tiempo de detección del crecimiento de micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho medio de cultivo y suplemento de nutrientes reducen la fase de latencia del crecimiento de micobacterias en al menos 1 día.
8. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en el que dicho medio de cultivo comprende además un suplemento antimicrobiano, y en el que dicho suplemento antimicrobiano se añade antes de la adición de dicha muestra en la etapa (c).
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho suplemento antimicrobiano se suspende mediante el uso de dicho suplemento de nutrientes, y dicho suplemento antimicrobiano suspendido mediante el suplemento de nutrientes se añade a dicho medio de cultivo en la etapa (b), y opcionalmente en el que dicho suplemento antimicrobiano comprende uno o más antibióticos seleccionados del grupo que consiste en polimixina B, vancomicina, azlocilina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y fosfomicina.
10. Un kit para detectar el crecimiento de micobacterias en un medio de cultivo, y dicho kit comprende: (1) un frasco de cultivo que contiene un medio de cultivo base; (2) un suplemento de nutrientes que comprende α -cetoglutarato; y (3) un suplemento antimicrobiano que comprende uno o más agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de la flora respiratoria contaminante en dicho medio de cultivo, en el que dicho α -cetoglutarato del suplemento de nutrientes está a una concentración tal que después de mezclar el suplemento de nutrientes y el suplemento antimicrobiano con el medio de cultivo base contenido en el frasco de cultivo, dicho aditivo de α -cetoglutarato presente en el medio de cultivo está a una concentración final de 5 g/L a alrededor de 50 g/L, y en el que dicho aditivo de α -cetoglutarato reduce el tiempo de detección del crecimiento de micobacterias en al menos 2 días en comparación con un medio de cultivo que no contiene α -cetoglutarato.
11. El kit de la reivindicación 10, en el que dicho crecimiento mejorado comprende reducir la fase de latencia del crecimiento de micobacterias en al menos 1 día.
12. El kit de las reivindicaciones 10 o 11, en el que dicho medio de cultivo base es Middlebrook 7H9.
13. El kit de las reivindicaciones 10-12, en el que dicho medio de cultivo base no contiene componentes termolábiles, y preferiblemente en el que dicho frasco de cultivo y dicho medio de cultivo base se esterilizan en autoclave.

14. El kit de las reivindicaciones 10-13, en el que dicho suplemento antimicrobiano comprende fosfomicina y, opcionalmente, comprende además polimixina B, vancomicina, anfotericina B, ácido nalidíxico, y trimetoprima.

Fig. 1A

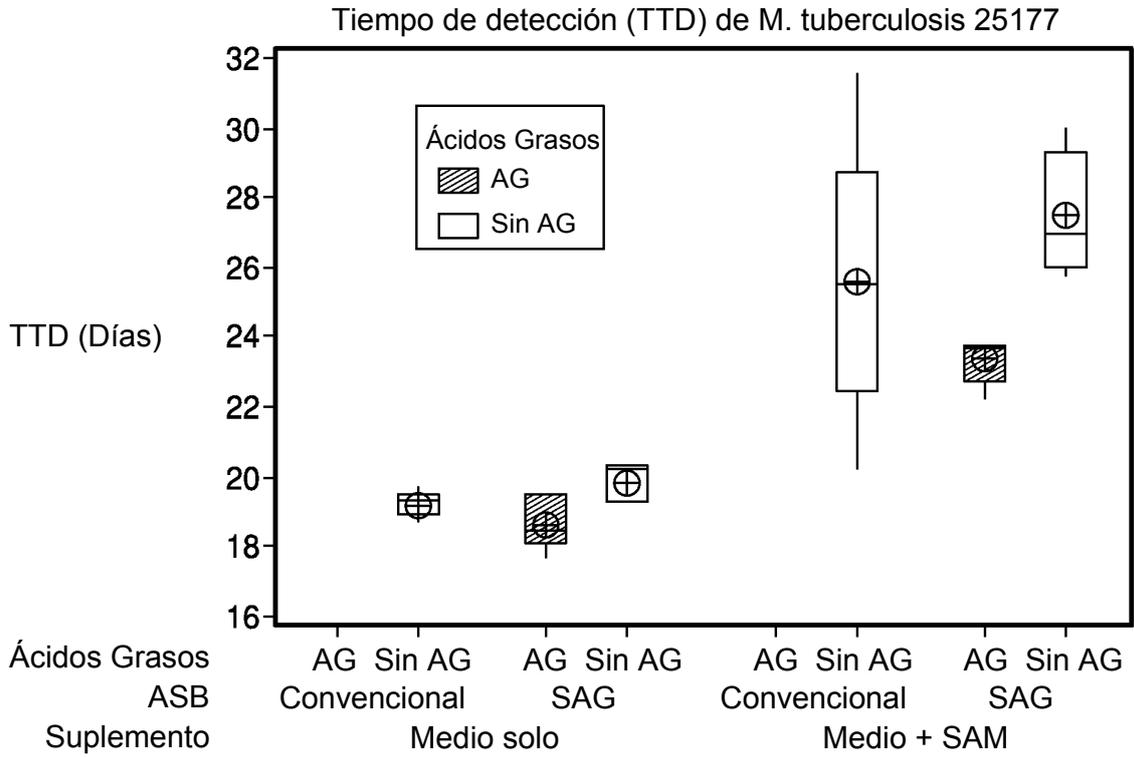


Fig. 1B

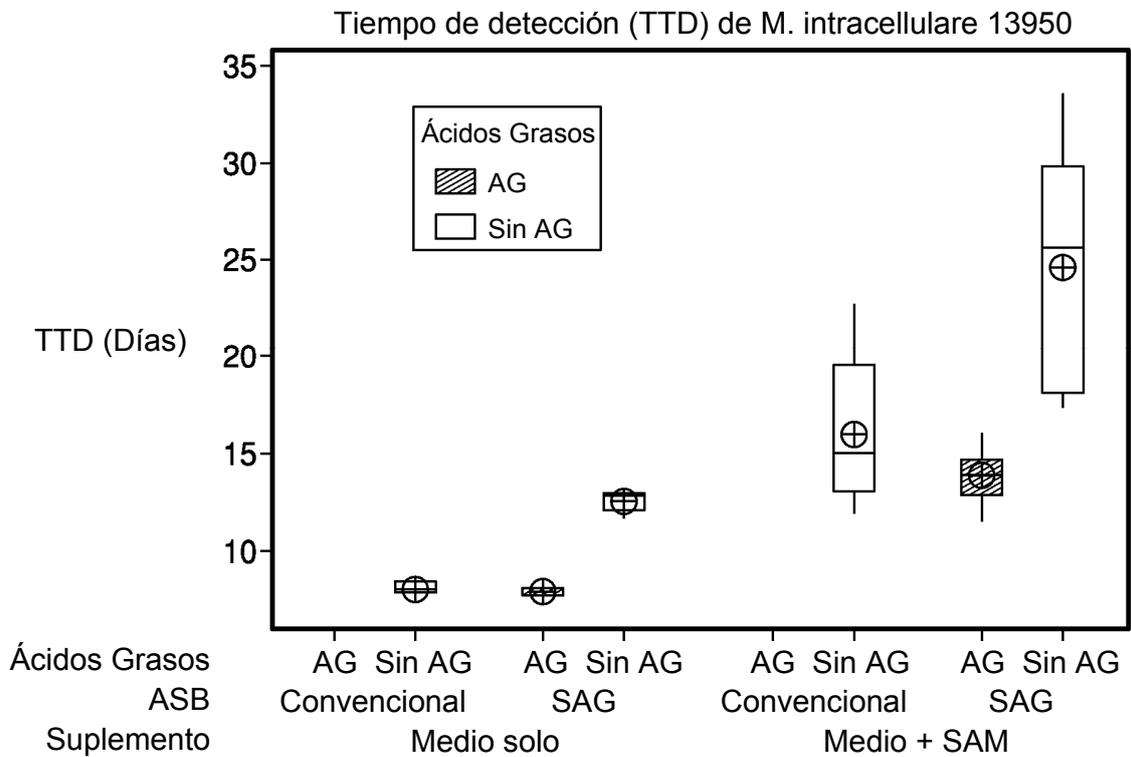


Fig. 1C

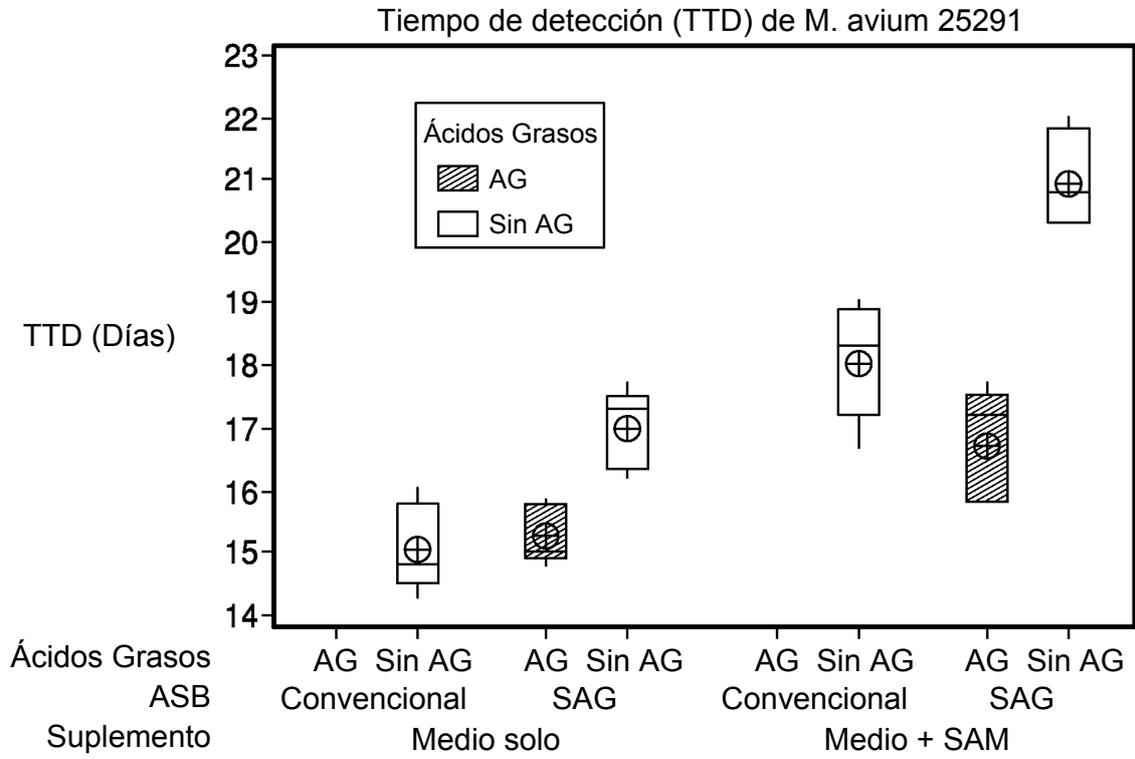


Fig. 2

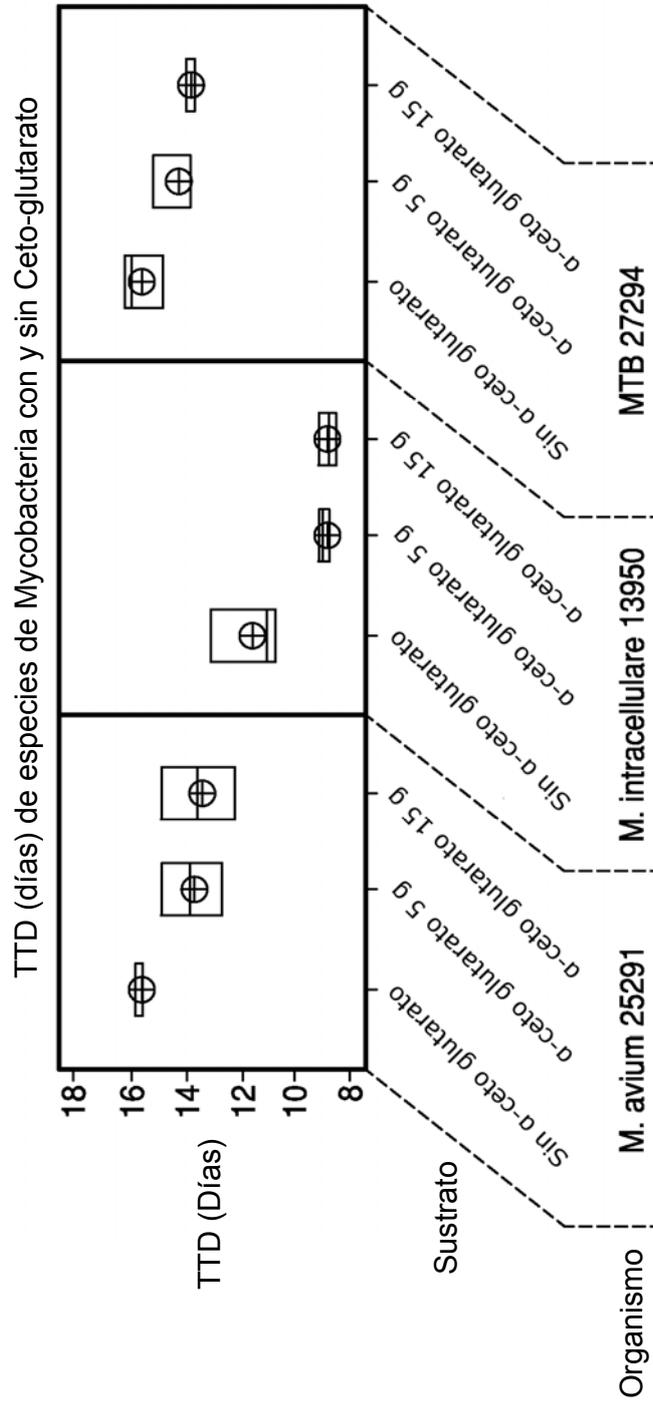


Fig. 4

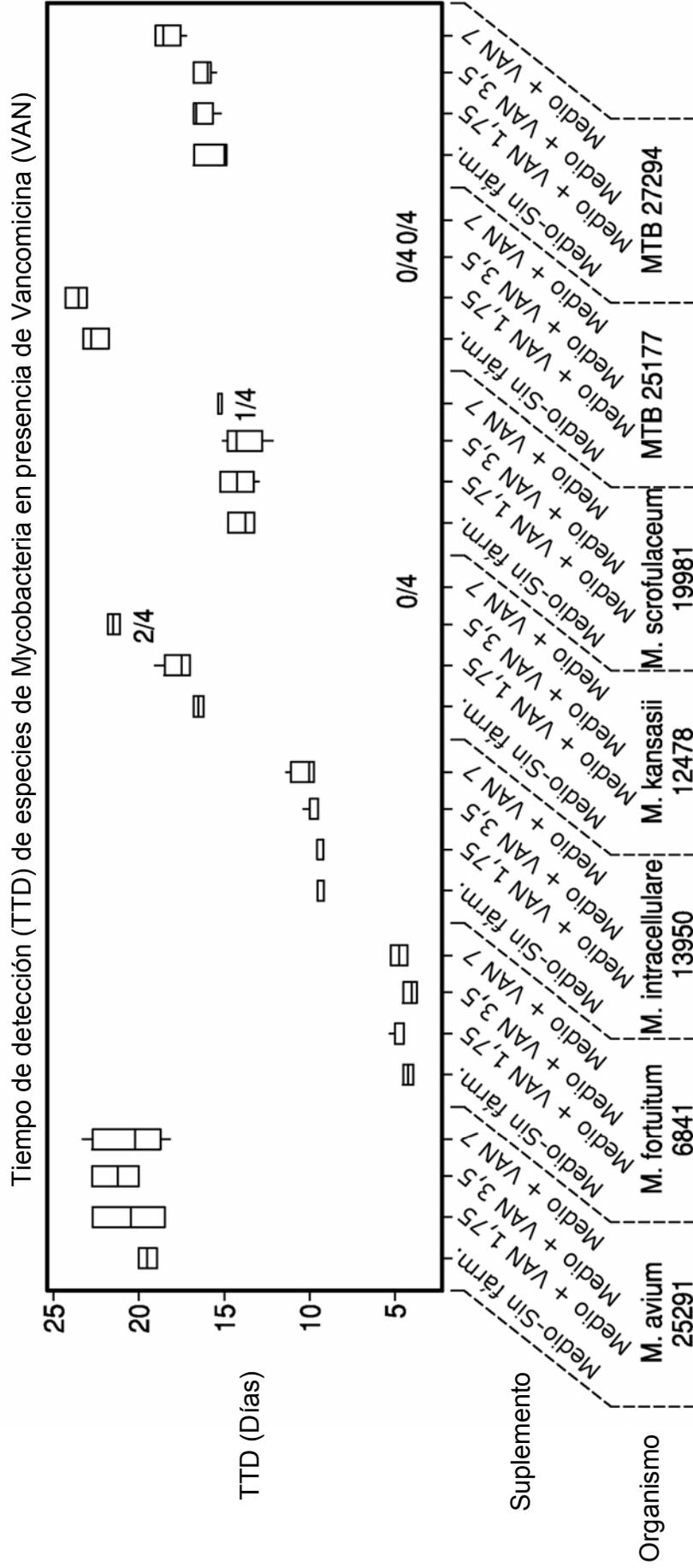


Fig. 5A

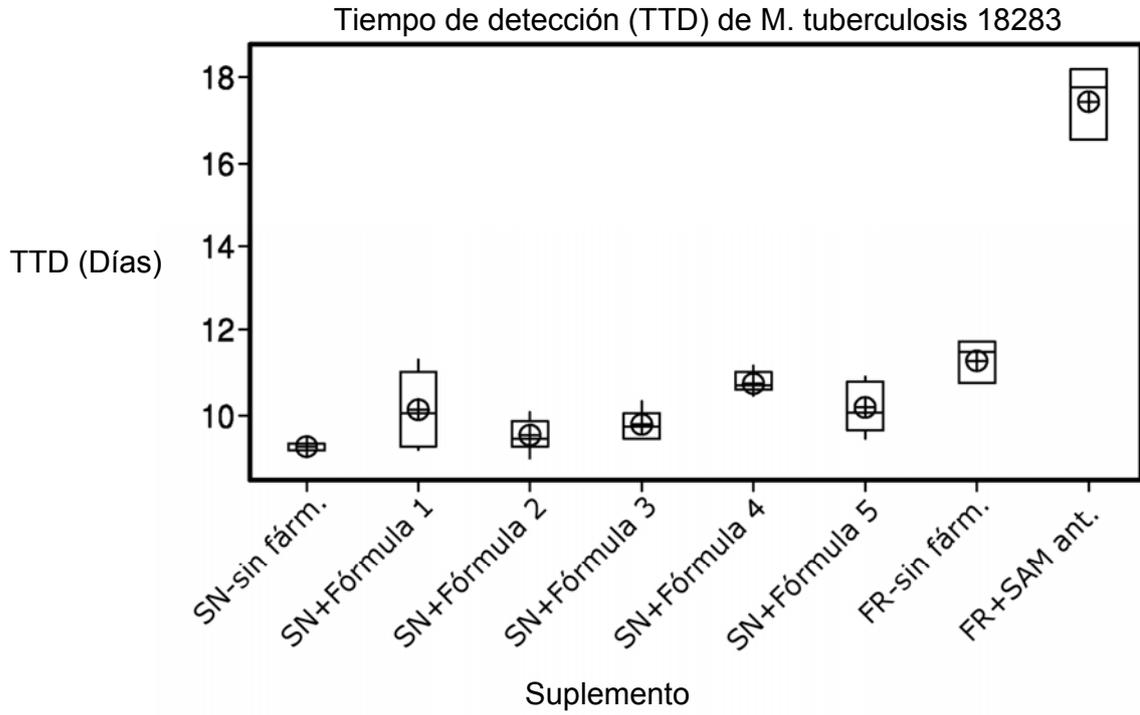


Fig. 5B

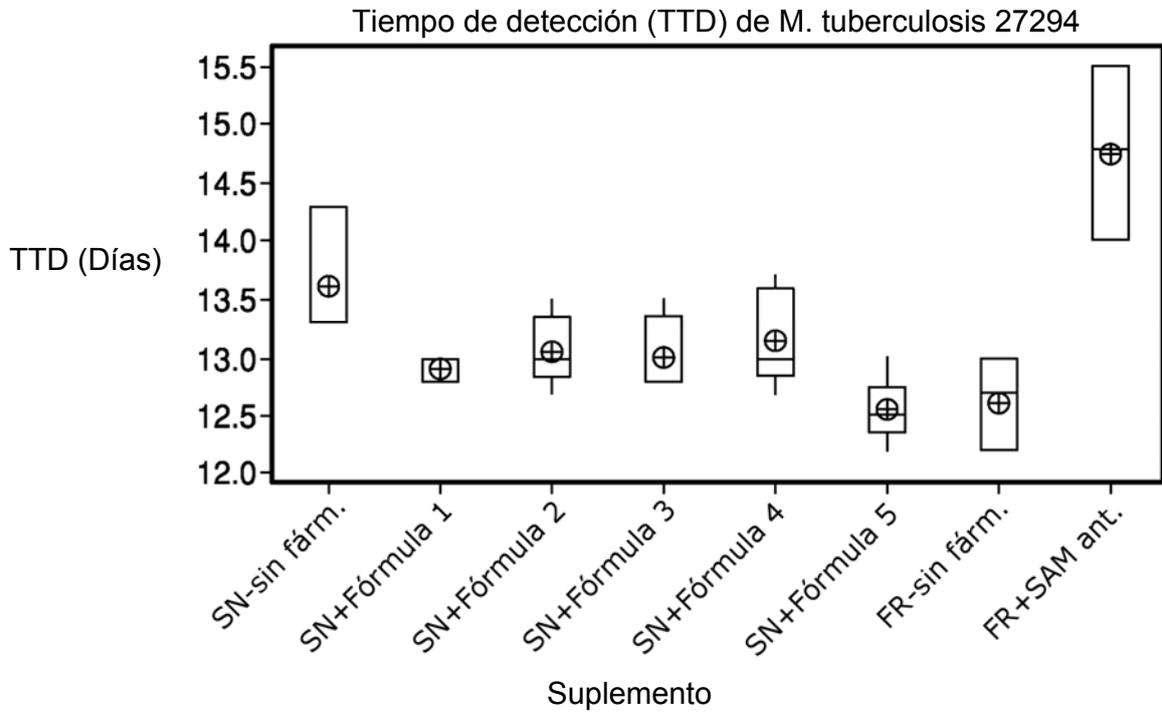


Fig. 5C

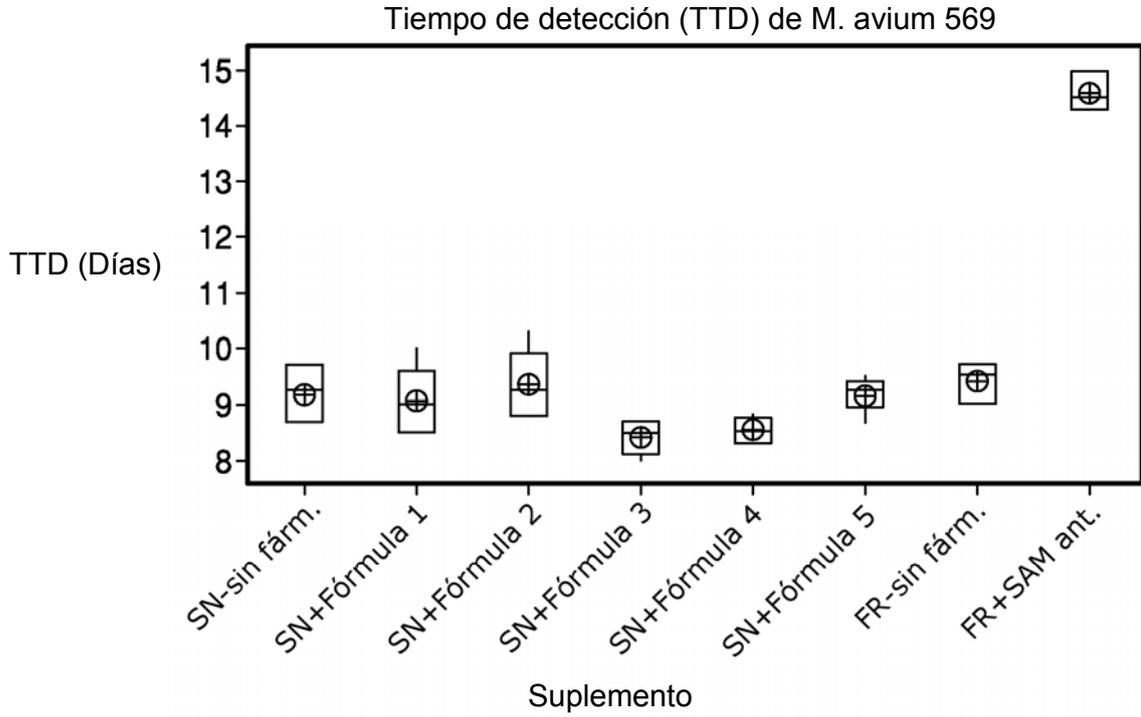


Fig. 5D

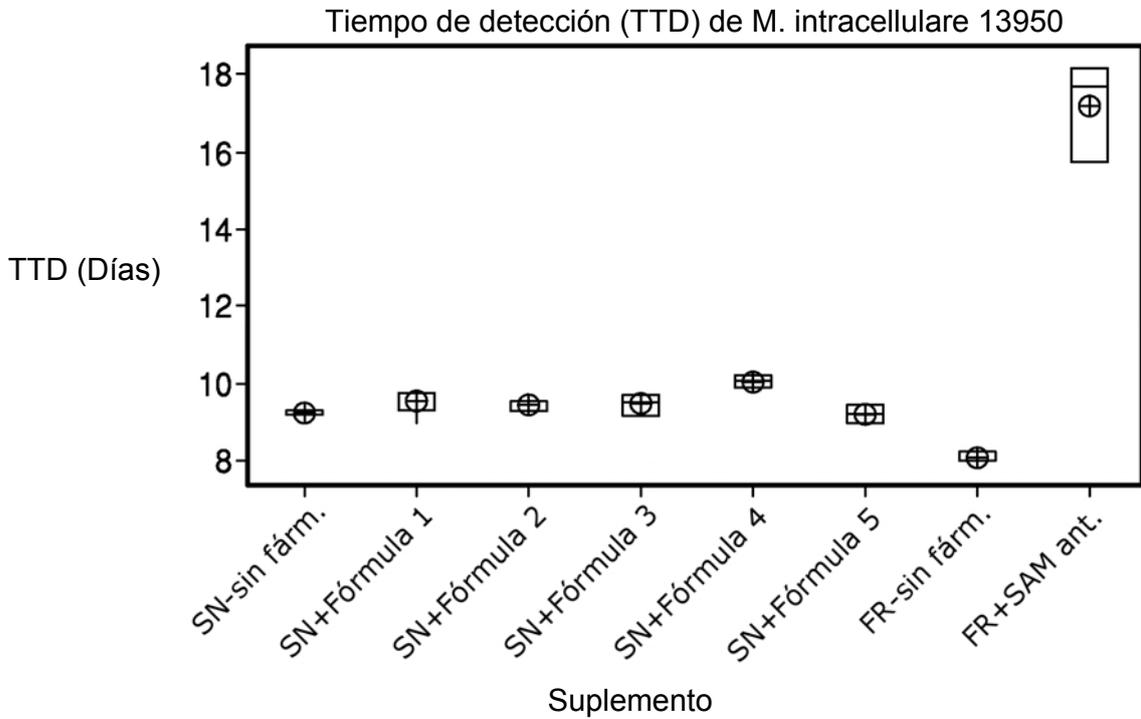


Fig. 5E

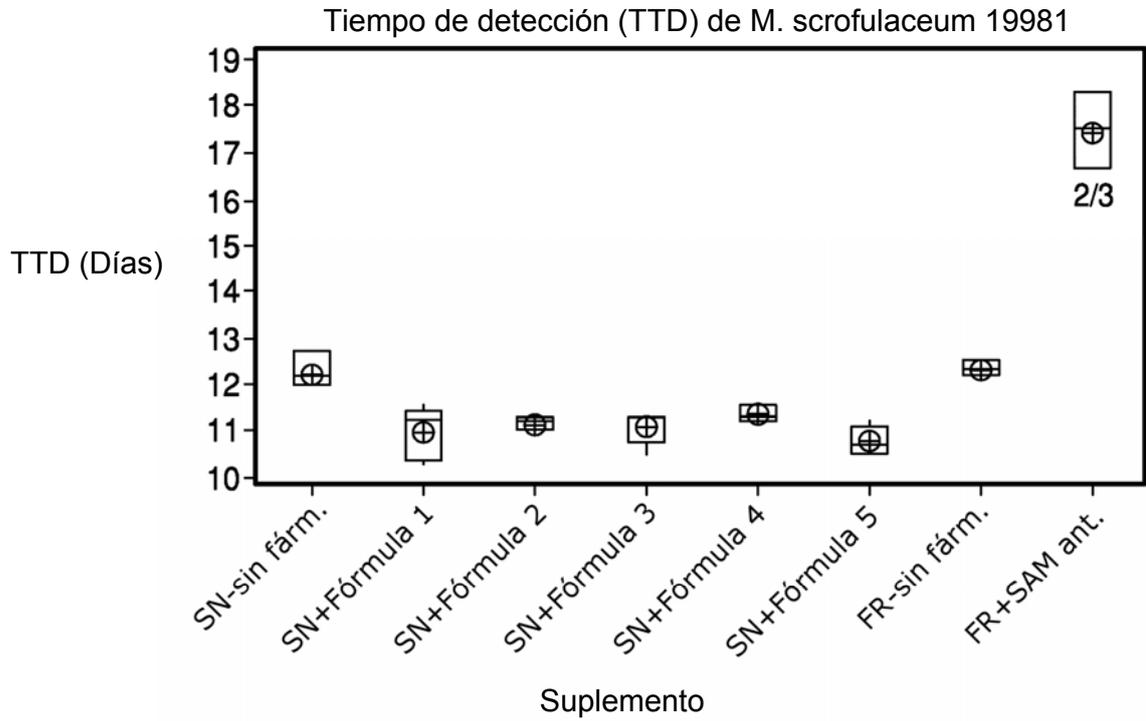


Fig. 5F

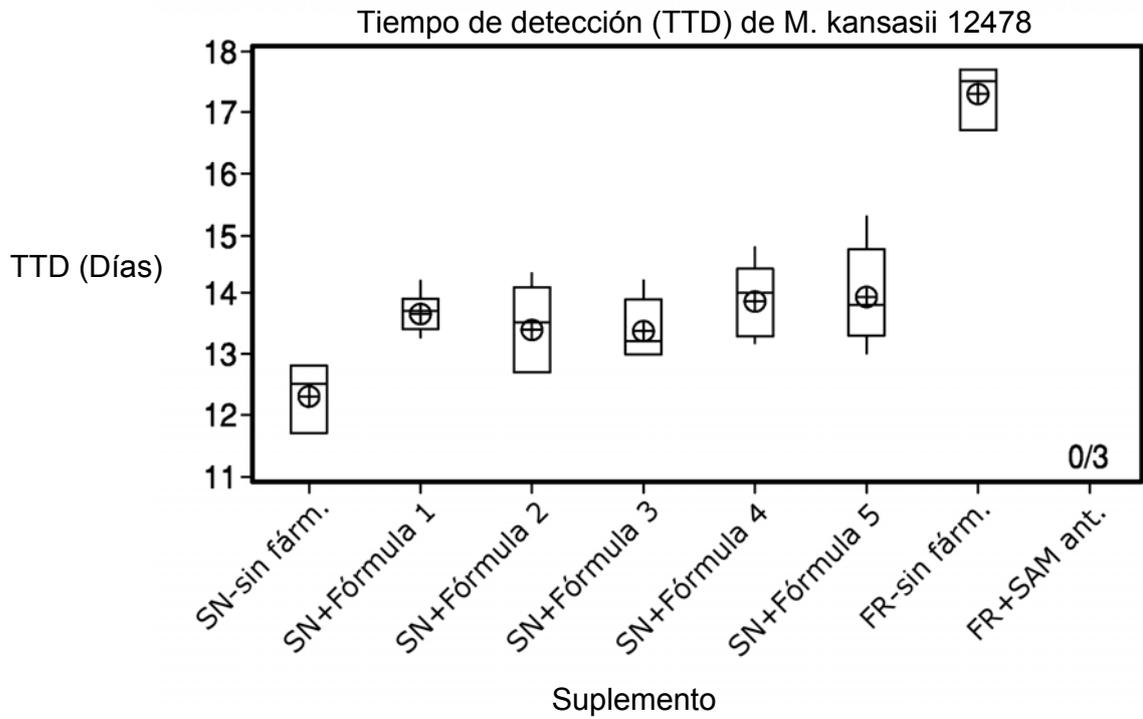


Fig. 6

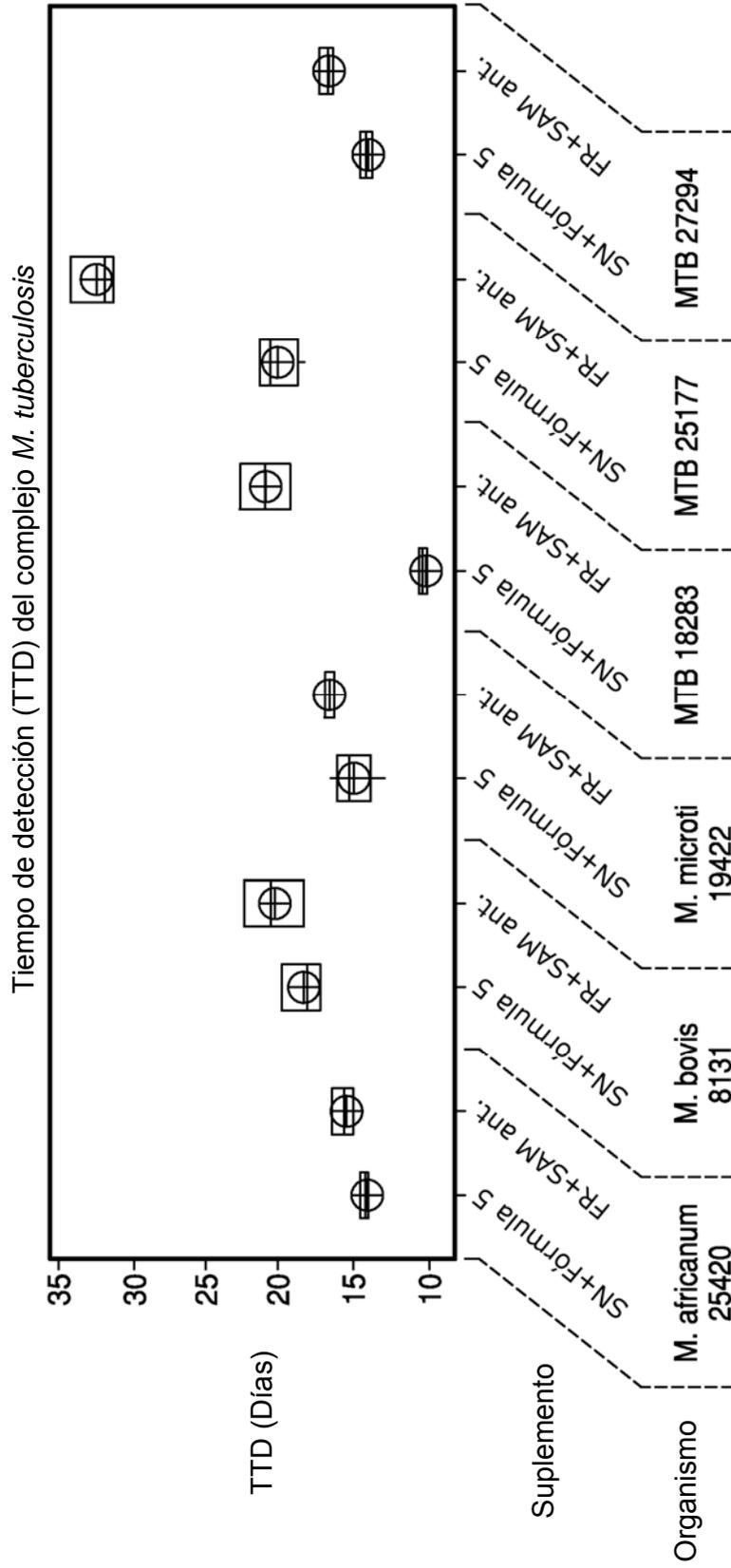


Fig. 7

