

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 373**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2016 PCT/EP2016/001848**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17092842**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2016 E 16794211 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3384001**

54 Título: **Medios químicamente definidos para la detección de microorganismos**

30 Prioridad:

03.12.2015 EP 15197739

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

01.09.2020

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt , DE**

72 Inventor/es:

**RAYNER, MICHAEL, HOWARD;
KELLY, SVEN;
ANTHES, BETTINA;
SONNTAG, UTE y
HEDDERICH, REINER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 781 373 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

Medios químicamente definidos para la detección de microorganismos

La presente invención se refiere a medios de cultivo químicamente definidos que comprenden al menos glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro (III) para la detección de una amplia gama de microorganismos seleccionados de procariotas, levaduras y hongos.

Desde el siglo diecinueve, han estado disponibles medios complejos, de uso general para el crecimiento y cultivo de bacterias, levaduras y mohos. El procedimiento para fabricar estos medios y los componentes principales ha cambiado muy poco, sorprendentemente, en su naturaleza fundamental desde ese momento. La base principal de estos medios microbiológicos son las peptonas que contienen.

La(s) peptona(s) empleada(s) se diseña(n) para estar presente(s) en combinaciones y a concentraciones que permiten el crecimiento de una muy amplia variedad de bacterias, levaduras y mohos. Por tanto, mezclas de estas peptonas son una fuente de nutrientes bioquímicamente rica y bien equilibrada y se complementan habitualmente mediante la adición de sales, tampones y otras materias primas necesarias para optimizar el crecimiento rápido y/o seleccionar microorganismos con propiedades bioquímicas particulares. Además, la forma sólida del medio es generalmente muy soluble en agua. Tras disolverse, el medio puede esterilizarse y puede proporcionarse en un recipiente adecuadamente conveniente para evitar la contaminación pero al mismo tiempo permitir la entrada de oxígeno, si esto se requiere, después de la inoculación con células procariotas, de levaduras y/o fúngicas. Posteriormente, el recipiente con medio y células se incuba a una temperatura adecuada y durante un tiempo adecuado para permitir la determinación (o ausencia) de crecimiento celular.

Sin embargo, solo una selección cuidadosa de los tipos de peptonas por individuos altamente experimentados familiarizados con la técnica producirá un medio con una base nutricional adecuada lo suficientemente amplia y los suficientemente equilibrada en su composición bioquímica como para permitir el cultivo de una gama muy amplia de procariotas así como levaduras y hongos. La calidad de la peptona varía entre tipos de peptonas, entre diferentes fabricantes de la misma peptona, varía entre diferentes calidades del mismo fabricante e incluso varía significativamente entre lotes de la misma calidad de un único fabricante. Sin embargo, la naturaleza bioquímica de esta calidad variable se entiende mal, más especialmente al nivel de variación de lote a lote. Sin embargo, la variación bioquímica se debe sin duda en parte a la calidad variable de las materias primas naturales usadas para fabricar peptonas. Por tanto, no todos los lotes de peptonas son siempre adecuados para su uso en recetas de medios particulares, debido a deficiencias nutricionales o desequilibrios nutricionales en tales materias primas y por tanto cada lote debe seleccionarse cuidadosamente para un medio particular para permitir el crecimiento de una amplia gama de procariotas y eucariotas, es decir soportar el crecimiento aceptable de una amplia variedad de bacterias, levaduras y mohos.

Se desconoce la composición química precisa de las peptonas. Esto significa que los factores nutricionales críticos proporcionados por tales materias primas naturales que dan como resultado la promoción del crecimiento celular se entienden hasta cierto punto, pero no bien. Mal entendidas e igualmente difíciles de controlar son las interacciones fisicoquímicas negativas de tales materias primas dentro de un medio que hacen que precipite, por ejemplo. La precipitación es una propiedad no deseada de los medios, ya que oculta ópticamente el crecimiento de microorganismos, es decir, idealmente, la mayoría de los medios deben ser transparentes. La complejidad del problema aumenta cuando una peptona se mezcla con otros tipos de peptona además de las sales, tampones y otros componentes normalmente presentes en un medio tradicional. La fabricación de medios de crecimiento generales bien equilibrados es una cuestión de ensayo, error y larga experiencia. La variación de lote a lote de las peptonas individuales añadidas debe controlarse adecuadamente de manera que los lotes inadecuados para producir el intervalo completo de crecimiento celular deseado de las cepas procariotas (bacterianas) y de levadura y fúngicas de prueba, ya sea solas o en combinación con otros tipos de peptonas, puedan eliminarse de los procesos de producción para fabricar tales medios.

Incluso después de estas medidas, tales medios generales para el crecimiento de una amplia gama de cepas celulares no están o son necesariamente lo suficientemente equilibrados bioquímicamente o nutritivos como para hacer crecer todas las cepas bacterianas, de levaduras y fúngicas sometidas a prueba en un panel de prueba amplio normalmente usado para confirmar la idoneidad de los medios para aplicaciones de monitorización medioambiental. Por un lado, determinados tipos de células son muy sensibles al equilibrio correcto de productos bioquímicos ofrecidos en el medio. Por otro lado, y además, las células particularmente exigentes necesitan suplementos extra como sangre fresca o extractos de sangre para reforzar su rendimiento de crecimiento. Sin embargo, incluso estos medios no tienen una composición de nutrientes suficiente para determinados tipos de células muy exigentes y necesitan una adición adicional de suplemento(s) para soportar el crecimiento o acelerar el crecimiento con el fin de hacerlos eficaces para su uso para una amplia gama de células procariotas y de levadura y fúngicas que se encuentran normalmente en muestras medioambientales.

Últimamente, se han desarrollado medios de cultivo celular químicamente definidos. Sin embargo, hasta la fecha, los productores de medios químicamente definidos para el cultivo de microorganismos se han concentrado en soportar el crecimiento de o bien procariotas (por ejemplo, bacterias) o bien eucariotas (por ejemplo, levaduras u hongos o células de insectos o mamíferos) lo más a menudo de una selección particular de microorganismos.

El documento WO 2007/135385, por ejemplo, da a conocer un medio químicamente definido para el crecimiento de bacterias, especialmente especies de *Neisseria*.

El documento GB 2464203 da a conocer un medio químicamente definido para la enumeración de *Campylobacter*.

5 I. Van de Rijn *et al.*, Infection and Immunity, vol. 27, n.º 2, febrero de 1980, págs. 444-448, dan a conocer un medio químicamente definido para el crecimiento de estreptococos exigentes.

El documento WO 2009/026635 da a conocer un medio de cultivo celular para hacer crecer *Streptococcus*.

S. Socransky *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, vol. 22, n.º 2, 1 de agosto de 1985, páginas 303-305 dan a conocer un medio de cultivo celular para hacer crecer y detectar microorganismos orales exigentes.

10 Los documentos WO 2014/019696 y WO 01/44278 dan a conocer suplementos de medios que contienen glutamina, cistina, cisteína, adenina, guanina, PABA, NAD y sales de hierro (II) para cultivar determinados microorganismos.

15 El objetivo de la presente invención es por tanto proporcionar medios de cultivo celular basados en materias primas químicamente definidas que ofrecen una base para hacer crecer una gama muy amplia de microorganismos, seleccionados de una amplia gama de especies procariotas así como de levaduras y fúngicas comparables a los medios a base de extractos y/o peptonas bien conocidos por ejemplo, que cubren las necesidades de crecimiento de las células procariotas, de levaduras y fúngicas normalmente encontradas en diversas muestras, tales como muestras medioambientales, muestras de la industria alimentaria y de bebidas, muestras farmacéuticas o muestras clínicas.

20 Se ha encontrado que puede proporcionarse un medio de crecimiento general, no específico, químicamente definido capaz de soportar el crecimiento de una gama muy amplia de procariotas, levaduras y hongos normalmente encontrados en diversas muestras, con un potencial de crecimiento esencialmente igual que medios a base de peptona tradicionales, si están presentes determinados componentes obligatorios en el medio de cultivo celular y se combinan con otros componentes de medios típicos. El medio no solo satisface un equilibrio bioquímico apropiado para hacer crecer la mayoría de aislados típicos, procariotas, de levaduras y fúngico, sino que, al mismo tiempo, satisface los requisitos de soportar el crecimiento de células procariotas, de levaduras y fúngicas exigentes. Simultáneamente, tales medios permiten también normalmente un crecimiento mucho más rápido de levaduras y mohos que los medios complejos a base de peptona tradicionales.

25 En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para cultivar procariotas, levaduras y hongos en un medio de cultivo celular químicamente definido, caracterizado porque el medio de cultivo celular comprende glutamina de 0,01 a 10 g/l, cisteína y/o cistina de 0,01 a 3 g/l, adenina de 0,1 a 300 mg/l, guanina de 0,01 a 100 mg/l, ácido aminobenzoico de 0,01 a 10 g/l, nicotinamida adenina dinucleótido y de 0,01 a 100 mg/l de una sal de hierro (III).

30 En una realización preferida el medio de cultivo celular comprende uno o más componentes de sacárido, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas o precursores de vitaminas, una o más sales, uno o más componentes de tampón, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico.

En otra realización preferida, el medio de cultivo celular comprende un agente gelificante.

En otra realización, el medio de cultivo celular comprende además al menos un sustrato cromogénico o fluorogénico.

35 En una realización preferida, los procariotas comprenden una o más de las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*.

En una realización preferida, las levaduras y los hongos comprenden una o más de las siguientes cepas: *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En una realización preferida, los procariotas, levaduras y hongos comprenden al menos una cepa exigente.

40 La presente invención se refiere además a un método para detectar simultáneamente, en un ensayo, procariotas, levaduras y hongos en una muestra

a) incubando la muestra en un medio de cultivo celular químicamente definido que comprende glutamina de 0,01 a 10 g/l, cisteína y/o cistina de 0,01 a 3 g/l, adenina de 0,1 a 300 mg/l, guanina de 0,01 a 100 mg/l, ácido aminobenzoico de 0,01 a 10 g/l, nicotinamida adenina dinucleótido y de 0,01 a 100 mg/l de una sal de hierro (III)

45 b) detectando la presencia de las procariotas, levaduras y hongos.

En una realización preferida, la incubación en la etapa a) se realiza durante menos de 30 horas.

En una realización adicional preferida, la presencia de las procariotas, levaduras y hongos se detecta por medio de su crecimiento, ópticamente, por ejemplo pero sin limitarse a una presencia de turbidez y/o formación de colonias y/o por medio de un cambio en el color por ejemplo, pero sin limitarse a, un color inducido por un desplazamiento del pH debido a la presencia de los procariotas, levaduras y/u hongos.

- Además, pueden emplearse pruebas serológicas y/o pruebas bioquímicas para confirmar la presencia microbiana usando tinciones o colorantes (como cromógenos y/o fluorógenos) y/o usando pruebas enzimáticas y/o identificando la presencia de microorganismos usando PCR o técnicas genéticas relacionadas, por ejemplo, pero sin limitarse a técnicas de transferencia, y/o examen microscópico y/o detección de ATP y/o sus derivados en una prueba de bioluminiscencia y/o secuenciación masivamente en paralelo y/o citometría de flujo. Los microbiólogos conocen muchas otras técnicas. Obsérvese que puede añadirse una etapa de preconcentración, por ejemplo, pero sin limitarse a, centrifugación y/o filtración con el fin de permitir una identificación más fácil y/o más rápida de la presencia/ausencia microbiana y/o para ayudar en la identificación.
- La presente invención se refiere además a un suplemento de medio de cultivo químicamente definido que comprende glutamina de 0,01 a 10 g/l, cisteína y/o cistina de 0,01 a 3 g/l, adenina de 0,1 a 300 mg/l, guanina de 0,01 a 100 mg/l, ácido aminobenzoico de 0,01 a 10 g/l, nicotinamida adenina dinucleótido y de 0,01 a 100 mg/l de una sal de hierro (III).
- La presente invención se refiere además al uso de un medio de cultivo celular químicamente definido que comprende glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro (III) tal como se definió anteriormente para cultivar simultáneamente procariotas, levaduras y hongos.
- Preferiblemente, el medio de cultivo celular químicamente definido se usa para pruebas de carga biológica, esterilidad, medioambientales o de llenado de medios.
- Se encontró que un medio de cultivo celular químicamente definido que comprende glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro (III) permite generar un medio de cultivo universal químicamente definido y completamente sintético que promueve el crecimiento rápido de diversos microorganismos procariotas, de levaduras y fúngicos como cultivos mixtos o axénicos.
- Un cultivo celular es cualquier configuración en la que se cultivan células.
- Un cultivo celular puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para el cultivo de células, tales como una placa de Petri, placa de contacto, botella, tubo, pocillo, vaso, bolsa, frasco y/o tanque. Normalmente el recipiente se esteriliza antes de su uso. El cultivo se realiza normalmente mediante incubación de las células en un medio de cultivo acuoso en condiciones adecuadas tales como temperatura, osmolalidad, aireación, agitación, etc. adecuadas que limitan la contaminación con microorganismos foráneos del entorno. Un experto en la técnica es consciente de las condiciones de incubación adecuadas para soportar o mantener el crecimiento/cultivo de células.
- Un medio de cultivo celular (usado de manera sinónima: medio de cultivo) según la presente invención es cualquier mezcla de componentes que mantenga y/o soporte el crecimiento *in vitro* de células y/o soporte un estado fisiológico particular. También es adecuado para cultivos de enriquecimiento previo así como para su uso como medio de mantenimiento.
- Es un medio químicamente definido. El medio de cultivo celular puede comprender todos los componentes necesarios para mantener y/o soportar el crecimiento *in vitro* de células o puede usarse para la adición de componentes seleccionados en combinación con o no en combinación con componentes adicionales que se añaden por separado (suplemento de medios). Preferiblemente, el medio de cultivo celular comprende todos los componentes necesarios para mantener y/o soportar el crecimiento *in vitro* de células.
- Los medios de cultivo celular según la presente invención están diseñados para ser adecuados para hacer crecer o mantener/soportar el crecimiento de células procariotas como células bacterianas así como células de levaduras y fúngicas. También se dan a conocer medios de cultivo celular diseñados para ser adecuados para hacer crecer o mantener/soportar el crecimiento de algas, células vegetales, de insectos y/o mamíferos y, opcionalmente, arqueas. Los procariotas, levaduras y hongos se denominan también a continuación microorganismos o células.
- Un microorganismo exigente es un microorganismo que sólo crecerá si están presentes varios nutrientes especiales en su medio de cultivo celular. Ejemplos de microorganismos exigentes son especies de *Legionella*, especies de *Brucella*, *Francisella tularensis*, especies de *Leptospira*, *Borrelia burgdorferi*, especies de *Bartonella* y especies de *Bordetella*.
- Los microorganismos cuyo crecimiento debe mantenerse o soportarse mediante los métodos y medios de la presente invención se encuentran normalmente en:
- muestras medioambientales durante la monitorización medioambiental de relevancia farmacéutica
 - muestras obtenidas de materias primas, productos intermedios y/o productos terminados de relevancia farmacéutica
 - muestras clínicas durante exámenes hospitalarios
 - muestras veterinarias
 - muestras de agua para el examen de agua potable y/o residual y/o agua de piscinas

- muestras de alimentos para el examen de la contaminación microbiana
- muestras cosméticas

Ejemplos de células cuyo crecimiento se mantiene/soporta/detecta mediante los medios y métodos según la presente invención son:

- 5 - Bacterias:
 - Achromobacter* sp. de tipo natural
 - Acinetobacter lwoffii* (ATCC® 17925™)
 - Bacillus clausii* (ATCC® 700160)
 - Bacillus halodurans* de tipo natural
- 10 *Bacillus okuhidensis* de tipo natural
 - Bacillus pumilus* de tipo natural
 - Bacillus subtilis* (ATCC® 6633™)
 - Bacillus subtilis* de tipo natural
 - Burkholderia* sp. de tipo natural
- 15 *Clostridium sporogenes* (ATCC® 11437™)
 - Clostridium sporogenes* (ATCC® 19404™)
 - Corynebacterium tuberculostearicum* de tipo natural
 - Escherichia coli* (ATCC® 25922™)
 - Escherichia coli* (ATCC® 8739™)
- 20 *Kocuria rhizophila* (ATCC® 9341™)
 - Leifsonia* sp. de tipo natural
 - Methylobacterium extorquens* (ATCC® 43645™)
 - Methylobacterium extorquens* (NBRC 15911)
 - Methylobacterium fujisawaense* de tipo natural
- 25 *Methylobacterium mesophilicum* (ATCC® 29983™)
 - Methylobacterium* ssp. de tipo natural
 - Micrococcus luteus* (ATCC® 10240™)
 - Micrococcus lilae* de tipo natural
 - Paenibacillus lautus* de tipo natural
- 30 *Pantoea* sp. de tipo natural
 - Propionibacterium acnes* (ATCC® 6919™)
 - Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™)
 - Ralstonia pickettii* (ATCC® 27511™)
 - Ralstonia pickettii* de tipo natural
- 35 *Salmonella typhimurium* (ATCC® 14028™)
 - Serratia marcescens* de tipo natural
 - Sphingomonas parapaucimobilis* de tipo natural

- Sphingomonas paucimobilis* (ATCC® 29837™)
- Sphingomonas paucimobilis* de tipo natural
- Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™)
- Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™)
- 5 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228™)
- Staphylococcus epidermidis* de tipo natural
- Staphylococcus hominis* (ATCC® 27844™)
- Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC® 13637™)
- Streptococcus pyogenes* (ATCC® 12344™)
- 10 *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 21059™)
- Levaduras:
- Candida albicans* (ATCC® 10231™)
- Debaryomyces hansenii* (DSM 3428)
- Exophiala* sp. de tipo natural
- 15 - Mohos:
- Aspergillus brasiliensis* (ATCC® 16404™)
- Aspergillus brasiliensis* de tipo natural
- Aspergillus sydowii* (DSM 63373)
- Penicillium commune* (ATCC® 10428™)
- 20 Por ejemplo, el medio de cultivo químicamente definido según la presente invención puede soportar el crecimiento de levaduras y hongos, y de procariotas como microorganismos Gram-positivos y microorganismos Gram-negativos, tales como contaminantes de la piel humana, contaminantes del agua, levaduras y mohos, por ejemplo *Bacillus subtilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium sporogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Apergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Paenibacillus lautus*, *Ralstonia pickettii*, *Staphylococcus epidermidis*.
- 25 Medios de cultivo celular químicamente definidos son medios de cultivo celular que comprenden materias primas químicamente bien 'definidas'. Esto significa que la composición química de todos los productos químicos usados en los medios se conoce. Los medios químicamente definidos no comprenden sustancias químicamente mal definidas como tejidos vegetales, animales o de levaduras químicamente mal definidos; no comprenden peptonas, células alimentadoras, suero, digestos o extractos mal definidos u otros componentes que pueden aportar proteínas y/o péptidos y/o hidrolizados químicamente apenas definidos a los medios. Componentes químicos químicamente no definidos, mal definidos o apenas definidos son aquellos cuya composición comercial y estructura no se conoce bien, están presentes en composición variable y apenas definida o solo pudieron definirse con un enorme esfuerzo experimental científico. En algunos casos el medio químicamente definido puede comprender proteínas o péptidos que están químicamente definidos, un ejemplo es la insulina (véanse otros a continuación).
- 30 Medios de cultivo celular químicamente definidos son medios de cultivo celular que comprenden materias primas químicamente bien 'definidas'. Esto significa que la composición química de todos los productos químicos usados en los medios se conoce. Los medios químicamente definidos no comprenden sustancias químicamente mal definidas como tejidos vegetales, animales o de levaduras químicamente mal definidos; no comprenden peptonas, células alimentadoras, suero, digestos o extractos mal definidos u otros componentes que pueden aportar proteínas y/o péptidos y/o hidrolizados químicamente apenas definidos a los medios. Componentes químicos químicamente no definidos, mal definidos o apenas definidos son aquellos cuya composición comercial y estructura no se conoce bien, están presentes en composición variable y apenas definida o solo pudieron definirse con un enorme esfuerzo experimental científico. En algunos casos el medio químicamente definido puede comprender proteínas o péptidos que están químicamente definidos, un ejemplo es la insulina (véanse otros a continuación).
- 35 Un medio de cultivo celular en polvo o un medio en polvo seco o un medio de cultivo deshidratado es un medio de cultivo celular que resulta normalmente de un proceso de molienda o un proceso de liofilización. Eso significa que el medio de cultivo celular en polvo es normalmente un medio particulado, finamente granular, no un medio líquido. El término "polvo seco" puede usarse de manera intercambiable con el término "polvo"; sin embargo, "polvo seco" tal como se usa en el presente documento simplemente se refiere al aspecto macroscópico del material granulado y no pretende significar que el material esté completamente libre de disolvente complejo o aglomerado a menos que se indique lo contrario. Un medio de cultivo celular en polvo también puede ser un medio de cultivo celular granulado, por ejemplo granulado en seco mediante compactación con rodillos o granulado en húmedo mediante granulación por pulverización en lecho fluidizado. Un medio de este tipo también puede prepararse mediante secado por pulverización.
- 40 Los medios de la presente invención para soportar el crecimiento general de procariotas, levaduras y hongos muestran características de crecimiento comparables (visibles) a los medios convencionales usados para este fin. Por tanto, normalmente
- 45

a. contienen un equilibrio de productos bioquímicos para promover el crecimiento celular de la mayoría de las células que tienden a detectarse

i) contienen productos bioquímicos específicos suficientes para suministrar las necesidades de una gama muy amplia de procariotas, levaduras y hongos pero al mismo tiempo

5 ii) no contienen concentraciones de un producto bioquímico específico que pueda ser tan alta como para inhibir significativamente el crecimiento de determinadas cepas celulares sensibles

b. contienen una base de nutrientes rica para llenar los vacíos auxótrofos presentes en muchas especies procariotas, de levaduras y fúngicas

10 c. contienen determinados productos bioquímicos complejos capaces de alimentar a células de manera que el crecimiento no se retrasa innecesariamente por una síntesis enzimática *de novo* extensa. Tales síntesis enzimática *de novo* extensa, no deseada puede conducir a una

i) fase de latencia significativamente prolongada o

ii) muerte de las células puesto que no son capaces de recuperar suficiente actividad metabólica como para superar el daño celular crítico y/o equilibrar una actividad anabólica celular excesiva.

15 Un medio de cultivo celular que comprende todos los componentes necesarios para mantener y/o soportar el crecimiento *in vitro* de células normalmente comprende al menos uno o más componentes de sacárido, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas o precursores de vitaminas, una o más sales, uno o más componentes de tampón, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico (bases nitrogenadas) o sus derivados. Puede comprender también productos bioquímicos químicamente definidos tales como proteínas recombinantes, por ejemplo insulina r, BSA r, transferrina r, citocinas r, etc. (véase anteriormente).

20 Los medios pueden comprender también piruvato de sodio, extractos altamente purificados y por tanto químicamente bien definidos, ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos y/o componentes de productos plurónicos (copolímeros de bloque basados en óxido de etileno y óxido de propileno) en particular Poloxamer 188 algunas veces denominado Pluronic F 68 o Kolliphor P 188 o Lutrol F 68 y/o componentes tensioactivos tales como tensioactivos no iónicos químicamente preparados. Un ejemplo de tensioactivos no iónicos adecuados son tensioactivos de copolímeros de bloque difuncionales que terminan en grupos hidroxilo primarios también denominados poloxámeros, por ejemplo disponibles con el nombre comercial Pluronic® de BASF, Alemania. Tales componentes de productos plurónicos se denominan tan solo a continuación plurónico. También pueden añadirse quelantes, hormonas y/o factores de crecimiento.

30 Otros componentes que puede comprender con los compuestos puros, sales, conjugados y/o derivados de ácido láctico, ácido tioglicólico, tiosulfatos, tetratiónato, diaminobutano, mioinositol, fosfatidilcolina (lecitina), esfingomielina, compuestos que contienen hierro (incluyendo compuestos con agrupaciones de hierro-azufre), ácido úrico, fosfato de carbamoilo, ácido succínico, tiorredoxina(s), ácido orótico, ácido fosfatídico, poliaminas (tales como putrescina, espermidina, espermina y/o cadaverina), triglicéridos, esteroides (incluyendo pero sin limitarse a colesterol), metalotionina, oxígeno, glicerol, urea, alfa-cetoglutarato, amoniaco, glicerofosfatos, almidón, glucógeno, glioxilato, isoprenoides, metanol, etanol, propanol, butanol, acetona, lípidos (incluyendo pero sin limitarse a aquellos en micelas), tributirina, butirina, ácido cólico, ácido desoxicólico, polifosfato, acetato, tartrato, malato y/o oxalato.

35 Componentes de sacárido son todos los mono o disacáridos, como glucosa, galactosa, ribosa o fructosa (ejemplos de monosacáridos) o sacarosa, lactosa o maltosa (ejemplos de disacáridos) o derivados de los mismos como alcoholes de azúcar. Componentes de sacárido pueden ser también oligo o polisacáridos.

40 Ejemplos de aminoácidos son particularmente los aminoácidos proteinogénicos, especialmente los aminoácidos esenciales, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, así como los aminoácidos no proteinogénicos tales como D-aminoácidos.

Tirosina significa L- o D- tirosina, preferiblemente L-tirosina.

45 Cisteína significa L- o D-cisteína, preferiblemente L-cisteína.

También se incluyen precursores y análogos de aminoácidos.

50 Ejemplos de vitaminas son vitamina A (retinol, retinal, diversos retinoides y cuatro carotenoides), vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina B₃ (niacina, niacinamida), vitamina B₅ (ácido pantoténico), vitamina B₆ (piridoxina, piridoxamina, piridoxal), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₉ (ácido fólico, ácido folínico), vitamina B₁₂ (cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina), vitamina C (ácido ascórbico) (incluyendo fosfatos de ácido ascórbico), vitamina D (ergocalciferol, colecalciferol), vitamina E (tocoferoles, tocotrienoles) y vitamina K (filoquinona, menaquinonas). También se incluyen precursores y análogos de vitaminas.

- Ejemplos de sales son componentes que comprenden iones inorgánicos tales como bicarbonato, calcio, cloruro, magnesio, fosfato, potasio y sodio u oligoelementos tales como Co, Cu, F, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Ni, Bi, V y Zn. Ejemplos son sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), cloruro de potasio (KCl), sulfato de hierro (II), fosfato de sodio monobásico anhidro (NaH_2PO_4), sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4), fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).
- Ejemplos de tampones son carbonato, citrato, fosfato, HEPES, PIPES, ACES, BES, TES, MOPS y TRIS.
- Ejemplos de cofactores son compuestos, sales, complejos y/o derivados de tiamina, biotina, vitamina C, calciferol, colina, NAD/NADP (reducido y/u oxidado), cobalamina, vitamina B12, flavina mononucleótido y derivados, flavina adenina dinucleótido y derivados, glutatión (reducido y/u oxidado y/o como dímero), hemo, hemina, hemoglobina, ferritina, fosfatos de nucleótidos y/o derivados (por ejemplo fosfatos de adenosina), coenzima F420, S-adenosilmetionina, coenzima B, coenzima M, coenzima Q, acetil Co-A, molibdopterina, pirroloquinolinquinona, tetrahidrobiopterina.
- Componentes de ácido nucleico son las nucleobases, como citosina, guanina, adenina, timina, uracilo, xantina y/o hipoxantina, los nucleósidos como citidina, uridina, adenosina, xantosina, inosina, guanosina y timidina, y los nucleótidos tales como monofosfato de adenosina o difosfato de adenosina o trifosfato de adenosina, incluyendo pero sin limitarse a los derivados de desoxi y/o fosfato y/o dímeros, trímeros y/o polímeros de los mismos, como ARN y/o ADN.
- Pueden añadirse compuestos que mejoran las propiedades fisicoquímicas de los medios, como, pero sin limitarse a, que aumentan la claridad y/o solubilidad de los medios y/o uno o más de sus componentes, sin afectar negativamente de manera significativa a las propiedades de crecimiento celular a las concentraciones usadas. Tales compuestos incluyen pero no se limitan a agentes quelantes (por ejemplo EDTA), antioxidantes, detergentes, tensioactivos, emulsionantes (como polisorbato 80), agentes neutralizantes, (como polisorbato 80), agentes formadores de micelas, agentes inhibidores de micelas y/o propilenglicol, alcohol de polietileno y/o carboximetilcelulosa.
- El medio contiene normalmente hidratos de carbono tales como azúcares y/o mezclas de azúcares y/o dímeros de azúcares y/o polímeros de azúcares y/o sus derivados. Normalmente, glucosa y/o lactosa y/o galactosa pueden ser los componentes de azúcar de hidrato de carbono principal. Habitualmente se incluye glucosa en el medio a una concentración de 0,001 mM a 250 mM en la disolución de medio acuoso, más preferiblemente de 1 mM a 100 mM, incluso más preferiblemente de 5 mM a 50 mM.
- Normalmente, el medio comprende cada aminoácido en un intervalo de desde 10 mg hasta 3 g por litro, preferiblemente en un intervalo de desde 40 mg hasta 1 g por litro.
- El medio comprende normalmente vitaminas. Una cantidad típica de una vitamina en el medio está en el intervalo de 5 μg a 10 mg por litro, preferiblemente en el intervalo de 50 μg a 6 mg por litro.
- Normalmente, el medio comprende sales. La cantidad de un tipo de sal está normalmente en el intervalo de 2 μg a 5 mg por litro, preferiblemente en el intervalo de 10 μg a 1,5 mg por litro. También pueden estar presentes sales específicas en cantidades mucho más altas; la concentración de NaCl puede ser por ejemplo de hasta 5 g por litro.
- La cantidad típica de un ácido nucleico comprendido en el medio está en el intervalo de 0,5 a 10 mg por litro, preferiblemente en el intervalo de 1 a 5 mg por litro.
- El medio contiene normalmente todos los aminoácidos proteogénicos (y/o sus derivados y/o sus conjugados y/o dímeros (puros y/o mixtos) de los mismos). Debe indicarse que las concentraciones de los componentes en el medio sólido pueden diferir significativamente de las medidas de manera práctica tras la disolución. Esto es porque, por ejemplo, determinados aminoácidos pueden reaccionar en el medio acuoso con otros componentes para formar productos que entonces contienen indirectamente los aminoácidos por lo que el aminoácido puro en disolución se empobrece de ese modo. Este proceso también puede producirse con otros constituyentes fácilmente reactivos, por ejemplo, pero sin limitarse a vitamina C y/o de hecho los aminoácidos pueden reaccionar con cada uno de los otros o consigo mismo.
- Este proceso puede ser un proceso oxidativo dependiente de las concentraciones de oxígeno y la presencia de oligoelementos y/o ultraoligoelementos, en particular los iones de metales de transición como los de cobre y/o hierro añadidos directamente como componentes y/o presentes como contaminantes.
- Pueden añadirse también otros componentes definidos para ayudar en la detección o identificación de microorganismos como indicadores.
- El medio de cultivo químicamente definido según la presente invención puede comprender además al menos un sustrato cromogénico o fluorogénico. Sustratos fluorogénicos son moléculas complejas que, en contacto con enzimas sintetizadas por microorganismos, se escinden y se vuelven fluorescentes. La fluorescencia emitida puede detectarse visualmente y/o con un instrumento analítico como un espectrofotómetro iluminando el medio de crecimiento usando radiación en el espectro UV o visible. Ejemplos de sustratos fluorogénicos son derivados de fluoresceína (CFA, CFDA), derivados de metilumbeliferona o los AldolsTM (desarrollados por la empresa Biosynth).

Sustratos cromogénicos son sustratos que cambian su color cuando se modifican, por ejemplo, mediante una enzima específica de un microorganismo. Ejemplos de sustratos cromogénicos son ONPG (orto-nitrofenil-p-D-galactopiranosido) o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido). En este caso el color del medio tras el crecimiento de determinados microorganismos de interés cambiará de color y será indicativo de tales microorganismos.

- 5 Un medio de cultivo celular líquido normalmente adecuado tiene una composición típica de 2 a 50 g/l, más preferiblemente de 5 a 30 g/l. Un medio con un agente gelificante tiene normalmente un peso adicional debido al agente gelificante de entre 1 y 50 g/l, más preferiblemente entre 2 y 30 g/l.

La osmolalidad del medio es normalmente de entre 50 mOsm y 1000 mOsm, más preferiblemente entre 150 mOsm y 500 mOsm.

- 10 Puesto que los medios de cultivo celular adecuados están libres de peptonas derivadas de animales y plantas, representan una probabilidad altamente reducida de ser una fuente de contaminación por agentes adventicios en su punto de uso tal como en aplicaciones farmacéuticas de pruebas medioambientales. Tales contaminantes infecciosos que estarán muy significativamente reducidos en su presencia incluyen, pero no se limitan a:

- contaminantes proteínicos como encefalopatía espongiforme bovina (BSE),

- 15 - contaminantes virales como virus diminuto del ratón (MVM),

- procariotas que forman esporas resistentes al calor,

- contaminantes eucariotas,

- células que se sabe que son capaces de penetrar en poros de membranas durante la filtración estéril debido a su tamaño extremadamente pequeño en determinadas condiciones tales como micoplasmas como *Burkholderia cepacia*.

20

Se da a conocer un medio de cultivo celular químicamente definido que comprende, además de un medio de cultivo celular químicamente definido típico por ejemplo para el cultivo de células CHO, los siguientes componentes y/o sus sales y/o sus derivados y/o conjugados y/o dímeros (puros o mixtos).

Tabla 1

Componente	Normalmente	Preferido	Más preferido	Incluso más
Glutamina	0,001 - 50 g/l	0,01 - 10 g/l	0,02 - 2 g/l	0,1 g/l
Cisteína y/o cistina	0,001 - 10 g/l	0,01 - 3 g/l	0,05 - 1 g/l	0,5 g/l
Adenina	0,01 - 1000 mg/l	0,1 - 300 mg/l	2 - 50 mg/l	10 mg/l
Guanina	0,001 - 500 mg/l	0,01 - 100 mg/l	0,05 - 5 mg/l	0,5 mg/l
Ácido aminobenzoico	0,001 - 100 g/l	0,01 - 10 g/l	0,02 - 2 g/l	0,1 g/l
Nicotinamida adenina dinucleótido	0,001 - 500 mg/l	0,1 - 100 mg/l	0,5 - 25 mg/l	2,5 mg/l
Concentración de Fe por ejemplo a partir de nitrato de Fe (III)	0,001 - 500 mg/l	0,01 - 100 mg/l	0,05 - 5 mg/l	0,5 mg/l

- 25 Ejemplos dados a conocer de sales de hierro adecuadas con sulfato de amonio y hierro (II) hexahidratado, sulfato de hierro (II) heptahidratado o nitrato de hierro (III) nonahidratado. También pueden usarse quelatos de hierro y/o proteínas o péptidos que contienen hierro.

Podría añadirse cisteína y/o cistina como L-cisteína, clorhidrato de L-cisteína, L-cistina, N-acetil-cisteína.

Puede añadirse glutamina como el compuesto puro y/o l-analil-l-glutamina o las sales de ácido clorhídrico, por ejemplo.

- 30 Pueden añadirse adenina y guanina como los compuestos puros o como las sales de ácido clorhídrico, por ejemplo.

Puede añadirse ácido aminobenzoico como el producto químico puro o como una sal por ejemplo con sodio.

Puede añadirse nicotinamida adenina dinucleótido como el derivado oxidado o reducido para y/o como el derivado de fosfato y/o como otros derivados conocidos por los expertos en la técnica.

- 35 El medio de cultivo celular puede ser un medio en polvo seco, un medio líquido o un medio semisólido. En el caso de un medio semisólido, el medio comprende además de los componentes químicamente definidos un agente gelificante. Un ejemplo de un agente gelificante adecuado es agar-agar y/o agarosa.

- Los medios de cultivo celular en polvo se producen preferiblemente mezclando todos los componentes y moliéndolos. El mezclado de los componentes lo conoce un experto en la técnica de producción de medios de cultivo celular en polvo secos mediante molienda. Preferiblemente, todos los componentes se mezclan concienzudamente de modo que todas las partes de la mezcla tienen casi la misma composición. Cuanto mayor sea la uniformidad de la composición, mejor será la calidad del medio resultantes con respecto a la homogeneidad.
- La molienda puede realizarse con cualquier tipo de molino adecuado para producir medios de cultivo celular en polvo. Ejemplos típicos son molinos de bolas, molinos de clavijas, molinos Fitz o molinos de chorro. Se prefiere un molino de clavijas, un molino Fitz o un molino de chorro, muy preferido es un molino de clavijas. Incluso más preferido es un molino de clavijas en el que la cámara de molienda se enfría con nitrógeno.
- Preferiblemente, todos los componentes de las mezclas que se somete a molienda están secos. Esto significa que, si comprenden agua, solo comprenden agua de cristalización pero no más del 10%, preferiblemente no más del 5%, lo más preferido no más del 2% en peso de moléculas de agua no unidas o no coordinadas. También pueden contener líquidos unidos dentro de los medios de manera que las propiedades del polvo no sufran un impacto significativo.
- También pueden usarse medios de cultivo celular en polvo seco como materiales compactados para facilitar la manipulación. Normalmente los medios compactados tienen buenas propiedades de disolución y son más fáciles de manipular debido a la formación reducida de polvo.
- Los medios en polvo se compactan preferiblemente en una prensa de rodillos.
- Para el uso de los medios en polvo seco, se añade un disolvente, preferiblemente agua (lo más particularmente agua destilada y/o desionizada o agua purificada o agua para inyección) o un tampón acuoso a los medios y los componentes se mezclan hasta que el medio se disuelve totalmente en el disolvente.
- El disolvente puede comprender también solución salina, iones de bases o ácidos solubles que proporcionan un intervalo de pH adecuado (normalmente en el intervalo de entre pH 1 y pH 10), estabilizadores, tensioactivos, conservantes y alcoholes u otros disolventes orgánicos polares así como agentes gelificantes para la producción de medios semisólidos.
- Los medios se tratan preferiblemente para reducir significativamente la carga biológica antes de su uso hasta un nivel tal que están presentes contaminantes biológicos de manera extremadamente improbable en el medio final, tratado antes de su uso. Este tratamiento puede realizarse preferiblemente en el estado líquido mediante filtración y/o mediante tratamiento térmico (por ejemplo 121°C durante 15 minutos) y/o mediante tratamiento con UV.
- El pH del medio disuelto antes de la adición de las células es normalmente de entre pH 2 y 12, más preferible entre pH 4 y 10, incluso más preferiblemente entre pH 6 y 8 y lo más preferible entre pH 6,5 y 7,5 e idealmente entre pH 7,0 y 7,5.
- El medio de cultivo según la presente invención puede usarse en condiciones de crecimiento aerobio así como anaerobio. El experto en la técnica está familiarizado con las respectivas medidas que van a tomarse para el crecimiento aerobio o anaerobio. Normalmente, para condiciones de cultivo anaerobio se retira el oxígeno, por ejemplo mediante un aditivo que reduce o preferiblemente elimina el oxígeno en el medio acuoso y/o mediante un medio físico a vacío y/o eliminando por ebullición el gas oxígeno. Si se usa un aditivo, entonces preferiblemente el aditivo reacciona con el oxígeno disuelto en el medio para eliminarlo químicamente y por tanto crear un entorno anaerobio. Mediante cualquiera que sea el medio, entonces el recipiente que contiene el medio agotado en oxígeno debe evitar que entre oxígeno en el medio de cultivo. El aditivo puede comprender un agente reductor, o puede ser también un absorbente o eliminador de oxígeno tal como un catalizador de paladio, o una enzima, por ejemplo una mono- y/o di-oxigenasa, y/o succinato.
- Se ha encontrado que medios de cultivo celular químicamente definidos que comprenden glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro (III) soportan el crecimiento de procariotas, levaduras y hongos. Los medios pueden variar ampliamente en su composición siempre que comprendan dichos componentes en las cantidades reivindicadas.
- En consecuencia, pueden añadirse glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro (III) a y/o incorporarse en una amplia variedad de medios de cultivo celular químicamente definidos para mejorar la aplicabilidad de esos medios para el fin de hacer crecer una amplia gama de procariotas, levaduras y hongos.
- La presente invención se refiere además por tanto a un suplemento de medio de cultivo celular que comprende glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro (III) en las cantidades reivindicadas, e indicadas como cantidades preferidas en la tabla 1.
- Según la invención, el suplemento de medio de cultivo celular contiene glutamina de 0,01 a 10 g/l, cisteína y/o cistina de 0,01 a 3 g/l, adenina de 0,1 a 300 mg/l, guanina de 0,01 a 100 mg/l, ácido aminobenzoico de 0,01 a 10 g/l, nicotinamida adenina nucleótido y de 0,01 a 100 mg/l de una sal de hierro (III).

- El suplemento de medio de la presente invención se produce y se usa normalmente del mismo modo que los medios de cultivo celular de la presente invención. El suplemento podría añadirse a un medio en polvo seco y mezclarse concienzudamente con este medio antes de su disolución y uso. También podría disolverse en agua o un tampón acuoso como el propio el medio de cultivo celular y mezclarse con el medio de cultivo celular disuelto después de eso
- 5 posteriormente a o antes del tratamiento para eliminar contaminantes biológicos, por ejemplo mediante filtración.
- Los ejemplos dados a conocer de medios químicamente definidos que pueden complementarse con el suplemento del medio de la presente invención son los usados para el fin de hacer crecer células de mamífero y/o insecto.
- Medios especialmente adecuados que van a suplementarse con el suplemento de la presente invención son formulaciones de medios de cultivo celular para células CHO. Están bien documentados en la bibliografía y varios están
- 10 comercialmente disponibles por ejemplo de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).
- Pueden encontrarse bases de medios definidos típicas (sin ninguna adición de peptonas o bicarbonato de sodio) para el cultivo de cultivo de células CHO en:
- Formulación para medio F-12K, ATCC® 30-2004
 - Composición de medio libre de suero CHO-T1-SF (de: Journal of Biotechnology, 2004, 108, págs. 279-292, Schroder *et al.*, "Serum- and protein-free media formulation for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11").
 - Solicitud de patente estadounidense n.º US 2006/0148074 A1 concedida a Gorfien *et al.*, fecha de publicación 06-07-2006, "Serum-free mammalian cell culture medium, and uses thereof".
- Se da a conocer además un método de preparación de un medio de cultivo celular químicamente definido que soporta el cultivo/crecimiento de procariotas y eucariotas añadiendo un suplemento de medio de cultivo celular que comprende
- 20 glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro a un medio de cultivo celular de insectos y/o mamíferos químicamente definido.
- La esencia de la presente invención es proporciona un medio de cultivo celular que está químicamente definido y soporta el rápido cultivo/crecimiento de una amplia gama de procariotas, levaduras y hongos. Puesto que el medio tiene una formulación química exacta, la producción lote a lote presenta una variación mínima y puede garantizarse la
- 25 reproducibilidad. Puesto que los medios están sustancialmente libres de peptonas derivadas de animales y plantas, representan una probabilidad altamente reducida de ser una fuente de contaminación por agentes adventicios en su punto de uso tal como en aplicaciones farmacéuticas o pruebas medioambientales.
- La presente invención se refiere además a un método para cultivar microorganismos en un medio de cultivo tal como se definió anteriormente, así como al uso de un medio de cultivo celular según la presente invención para el cultivo de
- 30 microorganismos. Los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos.
- Normalmente, el medio se coloca en un recipiente adecuado y se inocula con los microorganismos o una muestra que comprende posiblemente dichos microorganismos. Los recipientes adecuados se definieron anteriormente. Una muestra puede ser cualquier entidad líquida, gaseosa o sólida que pueda ponerse en contacto con el medio de cultivo celular. La muestra puede ser una superficie que por ejemplo se pone en contacto con una placa de contacto que comprende el
- 35 medio de cultivo celular. Puede ser por ejemplo un hisopo que se pone en contacto con el medio de cultivo celular o cualquier líquido o sólido que se ponga en o sobre el medio.
- La temperatura de incubación del medio para permitir el crecimiento de células es normalmente de entre 0°C y 100°C, más normalmente entre 15°C y 50°C, todavía más normalmente entre 20 y 45°C. Las muestras pueden incubarse por ejemplo a temperatura ambiente (alrededor de 20°C), por ejemplo a 22,5°C o a 32,5°C.
- Generalmente, tras la inoculación, el medio se incuba durante un periodo de tiempo para permitir algo de crecimiento de los microorganismos de modo que puedan detectarse fácilmente. Para métodos tradicionales, este tiempo puede oscilar entre un mínimo de horas y semanas. Generalmente, el tiempo de incubación es de entre aproximadamente 1 y 14 días. Los medios fabricados con este método permiten la detección de determinados microorganismos tras menos de 24
- 40 horas, incluso de microorganismos que tradicionalmente tardan dos días en crecer. En particular las levaduras y los mohos muestran una velocidad de crecimiento que es inusualmente rápida en comparación con los medios tradicionales fabricados con peptonas.
- La presente invención se refiere además a un método para detectar simultáneamente, en un ensayo, procariotas, levaduras y hongos en una muestra
- 50 a) poniendo en contacto la muestra con un medio de cultivo celular químicamente definido que comprende glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro (III)
- b) incubar el medio de cultivo celular inoculado de la etapa a)
- c) detectar la presencia de los procariotas, levaduras y hongos en dicho medio de cultivo celular.

Las etapas a) y b) se realizan tal como se describió anteriormente para cultivar los microorganismos. La detección en la etapa c) puede hacerse mediante cualquier método conocido. Ejemplos son detección visual de colonias formadas sobre un medio semisólido o de turbidez en un medio líquido, detección de un cambio en el color o la fluorescencia resultante de un sustrato cromogénico o fluorogénico que está presente en el medio. El crecimiento puede discernirse usando cambios de pH resultantes de transformaciones bioquímicas ocasionadas por la actividad enzimática de los microorganismos que produce ácidos orgánicos, por ejemplo, o producción de amonio que provoca que el pH aumente significativamente. Otros métodos para la detección incluyen análisis de PCR. Los expertos en la técnica son capaces de identificar muchos otros métodos que pueden usarse en combinación con tales medios que son capaces de detectar directa o indirectamente la presencia de microorganismos incluso si no hay crecimiento visible.

Los medios químicamente definidos según la presente invención pueden reemplazar a los medios de cultivo complejos tradicionales en diversas aplicaciones, por ejemplo en el campo biofarmacéutico o medioambiental, en la industria alimentaria y de bebidas o en diagnóstico. A continuación se enumeran aplicaciones a modo de ejemplo:

Pruebas de esterilidad y carga biológica

Los medios según la presente invención pueden usarse en pruebas de esterilidad y carga biológica. Las pruebas de esterilidad de material en proceso y productos finales deben demostrarse durante la fabricación de productos farmacéuticos y dispositivos médicos. El control microbiológico regular de bebidas o agua potable también es de gran importancia.

Un método típico para someter a prueba los niveles de carga biológica o la esterilidad de una muestra es filtrar una muestra líquida sobre un filtro de membrana que retiene los posibles contaminantes de la muestra e incubar el filtro en el medio de cultivo. Si la muestra no es filtrable, la muestra puede inocularse directamente en el medio de cultivo. En el caso de que estén presentes uno o más contaminantes, el medio transparente se vuelve turbio debido al desarrollo de las células.

A este respecto, el uso de un medio de cultivo químicamente definido según la presente invención es ventajoso ya que es preferiblemente un medio transparente en el que incluso puede detectarse fácilmente una baja turbidez. Una ventaja es que el color medio puede ajustarse más fácilmente para ayudar a la detección visible.

Los filtros que van a usarse en esta aplicación tienen un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para atrapar cualquier microorganismo en la muestra. Tales filtros tienen normalmente un tamaño de poro de desde aproximadamente 0,1 μm hasta 1,2 μm . Preferiblemente, el tamaño de poro es de 0,45 μm o menos. Los filtros pueden estar formados por cualquier material adecuado comúnmente usado para tales aplicaciones, tal como celulosa regenerada, ésteres de celulosa mixtos, acetato de celulosa, polietersulfona, poliarilsulfona y polifenilsulfona.

Los soportes para los filtros pueden ser simplemente un dispositivo inoxidable tal como un embudo. Alternativamente, pueden usarse dispositivos que contienen filtros desechables, preesterilizados y transparentes, tales como el dispositivo Steritest™ EZ (Merck Millipore), que es un dispositivo cerrado que permite realizar la prueba completa (toma de muestras, filtración, adición de medios e incubación).

Pruebas medioambientales:

Un método típico para someter a prueba los niveles medioambientales de microbios en una instalación es filtrar una muestra de aire a través de un dispositivo, reteniendo los microorganismos sobre el filtro. El filtro puede incubarse entonces en el medio de cultivo según la presente invención tal como se comentó anteriormente.

Otro método típico es el uso de tales medios en placas de contacto.

Particularmente en el presente documento, la naturaleza altamente purificada y químicamente definida de las materias primas en los medios significa que es significativamente menos probable que dichos medios contengan agentes adventicios. La superficie de una placa de contacto se compone de los medios en una forma semisólida. La superficie del medio se presiona contra, por ejemplo, una superficie del equipo con el fin de determinar si el equipo está contaminado con microorganismos. Por definición, queda entonces una pequeña cantidad de medios en la superficie de este equipo. Esto significa que la huella digital de los medios que quedan después de las pruebas sobre esta superficie crítica (por ejemplo, en un entorno farmacéutico) está ligeramente contaminada con medios. Con los medios tradicionales, entonces la superficie se contamina posteriormente con peptonas mal definidas y otras materias primas mal definidas. Tales materias primas tienen un riesgo mucho mayor de llevar consigo agentes adventicios tales como agentes y virus BSE/TSE. Frente a esto, un medio sintético químicamente definido es una opción de bajo riesgo que es mucho menos probable que albergue tales agentes adventicios.

Prueba de llenado de medios:

Las pruebas de llenado de medios se realizan de manera regular con el fin de verificar que los procesos de producción asépticos no se vean afectados por la contaminación microbiana, tal como bacterias, levaduras o mohos descomponedores, por ejemplo en la industria farmacéutica o alimentaria y de bebidas. Normalmente, en una prueba de llenado de medios, se simula todo el proceso de producción de un producto con un medio de cultivo estéril en lugar del

producto respectivo. Luego, se llenan unidades separadas con el medio que se someten a una prueba de esterilidad tal como se definió anteriormente. De nuevo, como en el caso anterior, el riesgo reducido de contaminación inadvertida con agentes adventicios es mucho menor cuando se usa un medio libre de peptonas/extractos mal definidos que se derivan de procesos y tienen un origen basado en tejidos animales y/o granjas.

5 Enriquecimiento previo antes de la identificación específica:

En otro aspecto, los medios según la presente invención pueden usarse para el enriquecimiento previo de microorganismos antes de su identificación. Para este fin, la muestra se inocula en los medios y los microorganismos se hacen crecer durante un período de tiempo suficiente. Tan pronto como se alcanza la concentración deseada, la muestra se somete a un tratamiento adicional, tal como identificación microbiológica específica.

10 Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención es un método de detección de microorganismos en una muestra para la que se busca determinar si está contaminada con un microorganismo vivo, caracterizado porque comprende una etapa de inocular la muestra en un medio de cultivo tal como se definió anteriormente y una etapa de observar el crecimiento de microorganismos.

15 La presente invención se refiere además al uso de un medio de cultivo celular según la presente invención para pruebas de carga biológica, esterilidad, medioambientales o de llenado de medios.

20 Con la presente invención, pudo demostrarse que también los medios de cultivo celular químicamente definidos son adecuados para la detección simultánea de levaduras, hongos y procariotas si dichos medios comprenden una determinada combinación de aditivos (glutamina, cisteína y/o cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y una sal de hierro (III) además de los componentes típicos de un medio de cultivo celular. Se conocen medios de cultivo celular que comprenden uno o más de dichos aditivos, pero hasta ahora no se reconoció que los medios químicamente definidos que comprenden dichos componentes son especialmente adecuados para soportar el crecimiento de una amplia gama de microorganismos. Los medios y métodos de la presente invención proporcionan por tanto la posibilidad de hacer crecer y opcionalmente también detectar tales microorganismos sin verse obligado a usar un medio de cultivo celular que comprende peptonas y/o extractos químicamente mal definidos que se sabe que albergan agentes adventicios. Los medios y métodos de la presente invención son igualmente sensibles y rápidos que los medios y métodos conocidos que comprenden el uso de peptonas.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, sin embargo, sin estar restringida a los mismos. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones.

Ejemplos

30 Procedimiento de prueba para todas las cepas:

- Se preparan medios de cultivo líquidos esterilizados por filtración de manera extemporánea o se almacenan en botellas de vidrio de 125 ml en la nevera antes de su uso.
- Se realiza la dilución en serie de una disolución de cepa almacenada en HEPES/glicerol a -80°C en disolución de cloruro de sodio al 0,9%.
- 35 - Cada botella de medio de cultivo se inocula con de 20 a 50 UFC/ml.
- Las botellas inoculadas se incuban a 22,5°C±2,5 y 32,5°C±2,5 durante 14 días como máximo dependiendo de la cepa.
- Se incuban botellas estériles en paralelo como control.
- Se observa visualmente el desarrollo de microorganismos en cada botella.

40 **Ejemplo 1**

Se seleccionan ocho cepas de células normalmente usadas para someter a prueba el crecimiento potencial de agar de soja tróptico (TSA) para examinar la idoneidad del medio sintético químicamente definido medio CHO (Cellvento™ CHO-100, número de artículo de producto 1.00899 de Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) suplementado con agar-agar como sustituto para dicho TSA. Se miden los parámetros de crecimiento de CHO-S en comparación con TSA, número de artículo 1.05458.0500 adquirido de Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania. Los precultivos se preparan en caldo de soja tróptico (TSB), número de artículo 1.05459.0500 adquirido de Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania en el que se hacen crecer de manera aerobia durante 24 horas a 37°C con la excepción del *Aspergillus spp.* se prepara directamente retirando por lavado y resuspendiendo esporas fúngicas de una placa de agar. Se diluyen los precultivos en caldo de peptona con cloruro de sodio y se siembran en placas usando un dispensador de placas en espiral. El medio CHO-S se prepara a partir de un medio CHO-100 doblemente concentrado con ajuste del pH a 7,3 usando carbonato de sodio y la disolución se esteriliza por filtración tras la adición del concentrado de suplemento acuoso. Por separado, se suspende agar en agua a concentración doble (26 g/l) y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Entonces se enfría la disolución de agar a alrededor de 46°C y se mezcla con medio CHO-S doblemente concentrado a la misma

temperatura. Se preparan placas de agar tras el mezclado suave pero concienzudo de las dos disoluciones mientras que se evita la contaminación microbiana extraña. Tras la inoculación de la superficie, las placas se incuban de manera aerobia a 32°C +/- 2,5°C y se almacenan tras 24 horas. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Cepas celulares de prueba	Parámetro de comparación	Agar de soja triptico (Control)	Medio CHO (sin suplementos)	Medio CHO-S (con suplementos)
		Lectura 24 h	Lectura 24 h	Lectura 24 h
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Recuento (UFC)	418	561	737
	% de recuperación	100%	134%	176%
	Crecimiento	4	3-4	3-4
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Recuento (UFC)	50	64	84
	% de recuperación	100%	128%	168%
	Crecimiento	3	3	3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Recuento (UFC)	564	561	571
	% de recuperación	100%	99%	101%
	Crecimiento	3-4	3-4	3-4
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 21059	Recuento (UFC)	20	0	11
	% de recuperación	100%	0%	55%
	Crecimiento	3-4	0	3-4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Recuento (UFC)	701	524	693
	% de recuperación	100%	75%	99%
	Crecimiento	3	4	4
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Recuento (UFC)	306	304	314
	% de recuperación	100%	99%	103%
	Crecimiento	3	3	3-4
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16406	Recuento (UFC)	25	15	27
	% de recuperación	100%	60%	108%
	Crecimiento	1	1	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344	Recuento (UFC)	506	4	502
	% de recuperación	100%	1%	99%
	Crecimiento	3-4	3-4	3-4

- 5 El crecimiento se facilita como el diámetro relativo de las colonias en una escala de 0 (sin crecimiento) a 5 (crecimiento exuberante para las respectivas cepas celulares) tal como se lee a las 24 horas tras la incubación a 32,5 +/- 2,5°C.

Resumen

- 10 La velocidad de crecimiento, representada por el tamaño de las colonias tras 24 horas, y el porcentaje de recuperación, tienen todas una buena comparación con TSA pero sólo tras la adición de los componentes de suplemento glutamina, cisteína/cistina, adenina, guanina, ácido aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido y sales de hierro al medio CHO. Este es el caso para casi todas las bacterias sometidas a prueba incluyendo los organismos Gram-positivos (tanto las cepas celulares de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* como *Bacillus subtilis*) así como la cepa celular Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. De hecho, este efecto positivo también puede observarse para las células eucariotas sometidas a prueba: incluyendo una mejora del porcentaje de recuperación de *Aspergillus brasiliensis* así como un ligero aumento en el tamaño de las colonias de la cepa de *Candida* sometida a prueba. Por tanto, tanto los procariotas como los eucariotas sometidos a prueba muestran una mejora del crecimiento significativa y/o tamaño de las colonias haciendo que el medio sea comparable al agar de soja triptico.

Ejemplo 2

- 20 Las siguientes 49 cepas de procariotas y eucariotas se seleccionan para las pruebas ya que pueden ser relevantes medioambientalmente o se aíslan de muestras medioambientales reales.

Los resultados de crecimiento positivo, identificados visualmente en el plazo de 14 días de la incubación a las temperaturas dadas, se muestran en la tabla 3.

Inóculo se refiere a los números de células inoculados en el medio TSB o CHO S. La preparación del medio CHO-S se describe en el ejemplo 1.

5 Tabla 3

Cepa de prueba	Inóculo	TSB		Medio CHO-S	
		22,5°C	32,5°C	22,5°C	32,5°C
<i>B. clausii</i> ATCC 700160	10	+	+	+	+
<i>B. pumilus</i> WT ARDS6V56	92	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	39	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> WT C-J	20	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	200	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 8739	22	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	96	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	185	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	38	+	+	+	+
<i>Ral. pickettii</i> ATCC 27511	59	+	+	+	+
<i>Ral. pickettii</i> WT PQK	26	+	+	+	+
<i>Sph. paucimobilis</i> ATCC 29837	34	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	34	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	16	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> WT CJ	64	+	+	+	+
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	33	+	+	+	+
<i>Steno. maltophilia</i> ATCC 13637	36	+	+	+	+
<i>Strept. pyogenes</i> ATCC 12344	32	+	+	+	+
<i>Ser. marcescens</i> WT Bb	38	+	+	+	+
<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 17925	42	+	+	+	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404		+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i> aislado medioambiental		+	+	+	+
<i>Aspergillus sydowii</i> DSM 63373		+	+	+	+
<i>Penicillium commune</i> ATCC 10428		+	+	+	+
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> WT AP-W		+	+	+	+
<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i> WT M		+	+	+	+
<i>Pantoea sp.</i> WT MT - 1661	39	+	+	+	+
<i>Achromobacter sp.</i> WT C-2929	209	+	+	+	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	21	+	+	-	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	23	-	+	+	-
<i>Debariomyces hansenii</i> DSM 3428	>50	+	+	+	+
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	40	+	+	+	+
<i>Methylobacterium extorquens</i> ATCC 43645	27	+	+	+	+
<i>Methylobacterium extorquens</i> NBRC 15911	24	+	-	+	+
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> de tipo natural	54	+	+	-	+
<i>Methylobacterium mesophilicum</i> ATCC 29983	16	+	+	+	-
<i>Methylobacterium ssp.</i> WT CJ	31	+	+	+	+

<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	40	+	+	+	+
<i>Micrococcus ssp. lilae</i> Rentschler de tipo natural	5	+	+	+	+
<i>Paenibacillus lautus</i> de tipo natural	27	+	+	+	+
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919	35	-	+	+	+
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 21059	30	+	+	+	+
<i>Exophiala sp.</i> WT MT-1570	>50	+	+	+	+
<i>Burkholderia sp.</i> WT C-2424	66	+	+	+	+
<i>Leifsonia sp.</i> WT C-2946	64	+	+	+	+
<i>Corynebact. tuberculostearicum</i> WT	25	+	+	+	+
<i>Bacillus halodurans</i> WT	32	+	+	+	+
<i>Bacillus okuhidensis</i> WT C-3745	42	+	+	+	+

Los resultados muestran que todos los procariotas y eucariotas sometidos a prueba crecen bien en TSA y en el medio de cultivo celular químicamente definido según la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Método para el cultivo de procariotas, levaduras y hongos en un medio de cultivo celular químicamente definido, caracterizado porque las células se incuban en un medio de cultivo celular que comprende glutamina de 0,01 a 10 g/l, cisteína y/o cistina de 0,01 a 3 g/l, adenina de 0,1 a 300 mg/l, guanina de 0,01 a 100 mg/l, ácido aminobenzoico de 0,01 a 10 g/l, nicotinamida adenina dinucleótido y de 0,01 a 100 mg/l de una sal de hierro (III).
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo celular comprende uno o más componentes de sacárido, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas o precursores de vitaminas, una o más sales, uno o más componentes de tampón, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico.
3. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el medio de cultivo celular comprende un agente gelificante.
4. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los procariotas que se cultivan comprenden una o más de las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*.
5. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las levaduras y hongos que se cultivan comprende una o más de las siguientes cepas: *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y/o *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los procariotas, levaduras y hongos comprenden al menos una cepa exigente.
7. Método para detectar procariotas, levaduras y hongos en una muestra
 - a) poniendo en contacto la muestra con un medio de cultivo celular químicamente definido que comprende glutamina de 0,01 a 10 g/l, cisteína y/o cistina de 0,01 a 3 g/l, adenina de 0,1 a 300 mg/l, guanina de 0,01 a 100 mg/l, ácido aminobenzoico de 0,01 a 10 g/l, nicotinamida adenina dinucleótido y de 0,01 a 100 mg/l de una sal de hierro (III)
 - b) incubando el medio de cultivo celular de la etapa a)
 - c) detectando la presencia de los procariotas, levaduras y hongos en el medio de cultivo celular.
8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque la incubación en la etapa b) se realiza durante menos de 30 horas.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque la presencia de los procariotas, levaduras y hongos se detecta por medio de su crecimiento o por medio de un cambio en el color o pH inducido por los procariotas, levaduras y hongos.
10. Método según una o más de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado porque el medio comprende un agente gelificante.
11. Uso de un medio de cultivo celular químicamente definido que comprende glutamina de 0,01 a 10 g/l, cisteína y/o cistina de 0,01 a 3 g/l, adenina de 0,1 a 300 mg/l, guanina de 0,01 a 100 mg/l, ácido aminobenzoico de 0,01 a 10 g/l, nicotinamida adenina dinucleótido y de 0,01 a 100 mg/l de una sal de hierro (III) para cultivar procariotas, levaduras y hongos para pruebas de carga biológica, esterilidad, medioambientales o de llenado de medios.
12. Suplemento de medio de cultivo celular que comprende glutamina de 0,01 a 10 g/l, cisteína y/o cistina de 0,01 a 3 g/l, adenina de 0,1 a 300 mg/l, guanina de 0,01 a 100 mg/l, ácido aminobenzoico de 0,01 a 10 g/l, nicotinamida adenina dinucleótido y de 0,01 a 100 mg/l de una sal de hierro (III).