



(11) Número de Publicação: PT 672115 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
C12N001/20 A

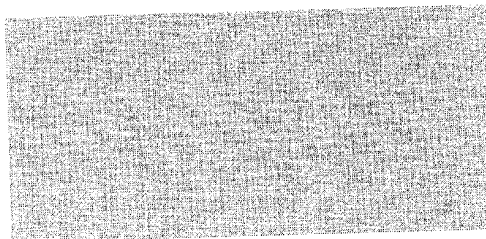
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1993.10.06	(73) Titular(es): MERCK & CO. INC. 126, EAST LINCOLN AVENUE P.O. BOX 2000 RAHWAY NEW JERSEY 07065-0900 US
(30) Prioridade: 1992.10.15 US 961587	
(43) Data de publicação do pedido: 1995.09.20	(72) Inventor(es): FRED J. BAILEY US WAYNE K. HERBER US
(45) Data e BPI da concessão: 2001.01.10	(74) Mandatário(s): ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VITOR CORDON, Nº 14 - 3º 1200 LISBOA PT

(54) Epígrafe: MÉTODO DE CRESCIMENTO CLONAL DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

(57) Resumo:

MÉTODO DE CRESCIMENTO CLONAL DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE



DESCRIÇÃO

"MÉTODO DE CRESCIMENTO CLONAL DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*"

FUNDAMENTOS DO INVENTO

Produção de compostos com significado farmacêutico por cultura de bactérias e isolamento de produtos produzidos em cultura constituem um campo da ciência em expansão. Um impedimento para a obtenção de aprovação reguladora para produtos produzidos deste modo existe sempre que o organismo bacteriano a ser cultivado necessite de componentes animais complexos para o seu crescimento. Por exemplo, a cultura de *Streptococcus pneumoniae* (pneumococos), para produzir polissacarídeos pneumocócicos para produção de vacinas, particularmente no estágio de desenvolvimento de inóculo, é tipicamente realizada em meios contendo produtos derivados de complexo bovino ou ovino tais como peptonas, gelatinas, caseínas, ou produtos derivados do sangue. É sabido que *S. pneumoniae* é exigente, tendo necessidades nutricionais de colina [Rave et al., J. Bact., 40, 695-704 (1940)], vitaminas [Adams et al., J. Bact., 49 401-409 (1945)], e biotina [Bohonos and Saborow, Arch. Biochem. 3, 257-259 (1943)]. Mesmo quando se conseguiu uma subsequente cultura de bactérias em meios livres de produtos derivados de complexo bovino ou ovino, o desenvolvimento inicial do inóculo de cultura de *S. pneumoniae* foi realizado em meios com produtos contendo sangue ou derivados de bovino/ovino. Este invento demonstra a praticabilidade de desenvolvimento de inóculo num meio desprovido desses componentes complexos e potencialmente prejudiciais.

Alberto C. Mendes

Um meio comercialmente disponível útil para cultura de bactérias é conhecido como PYG. PYG contem:

peptona	5 g
tripticase	5 g
extrato de levedura	10 g
solução de resazurina	4 ml
solução salina	40 ml
água destilada	1000 ml
solução de hemina	10 ml
vitamina K	0,2 ml
cisteína HCl•H ₂ O	0,5 g
glucose	10 g

(ver Anaerobe Laboratory Manual, 4th Edition, 1977, Holdman et al. eds; Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061, p13). S. pneumoniae pode ser cultivado neste meio, mas visto que o meio contem peptona de carne de vaca, não é desejável para a produção de componentes de vacina.

Uma razão significativa para a utilização de um meio de cultura sem produtos animais ou sanguíneos consiste em reduzir ou evitar a possibilidade de contaminação por agentes que causem encefalopatias espongiformes, tais como a Doença dos Priões [ver, por exemplo, The Lancet, vol. 336, p 21-22, July 7, 1990, e referências aqui citadas]. Pensa-se que o agente etiológico de doenças tais como "scrapie" em animais, doença de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler, e kuru no ser humano, seja transmissível por produtos de sangue animal, particularmente por produtos derivados de bovinos ou ovinos.

Descobrimos um meio de cultura completamente desprovido de derivados animais complexos o qual todavia suporta o crescimento de pneumococos, tais como estirpes de Streptococcus pneumoniae (nomenclatura Dinamarquesa tendo como base o serotipo) 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F. O meio não contém produtos derivados de bovinos ou de ovinos, nem contém sangue. Além disso, os inóculos derivados deste novo meio podem ser usados para iniciar a produção do polissacarídeo capsular do pneumococo o qual pode ser armazenado e usado para preparar vacinas, tal como é descrito por exemplo na Patente dos E.U.A. No. 4.695.624.

A vantagem deste novo meio consiste na eliminação de componentes animais (especialmente produtos derivados de bovinos ou ovinos) do processo de produção do produto. Ao eliminar componentes animais, os perigos de contaminação com substancias reactivas do grupo sanguíneo ou com agentes accidentais são reduzidos, e é eliminada a necessidade de remoção desses agentes de contaminação durante a purificação. Torna-se também menos necessário demonstrar a ausencia desses agentes de contaminação no produto final para vacina.

Assim, de acordo com este invento, é proporcionado uma nova composição de meio para a cultura de bactérias. É também proporcionado um método para a utilização da referida composição, particularmente para o desenvolvimento de inóculo. O invento irá permitir a produção de bacterias exigentes tais como S. pneumoniae, e de seus lotes congelados de sementeira que não tenham tido contacto com materiais derivados de bovinos ou de ovinos. Isto irá facilitar o processo de revisão regulador para os produtos farmacêuticos derivados da cultura desses organismos. Assim, de acordo com este invento, o crescimento da cultura e o desenvolvimento do inóculo poderão ser obtidos num meio sem produtos derivados de bovinos ou de ovinos. Além disso, o invento

proporciona um meio de cultura alternativo e preferido e um método para a produção de inóculos para produção de polissacarídeos capsulares de pneumococos.

SUMÁRIO DO INVENTO

É proporcionado um meio de cultura que não contém produtos derivados de bovinos, ovinos ou de sangue crú, mas que é eficaz para suportar o desenvolvimento de inóculo para crescimento de Streptococcus pneumoniae e produção de polissacarídeo capsular de pneumococos para produção de vacina. Numa formulação preferida do meio, o meio compreende: base de levedura peptona modificada, solução salina, resazurina, vitamina K, hemina, bicarbonato de sódio, L-cisteína HCl, glucose, e tampão HEPES.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Uma formulação preferida do meio deste invento contém os ingredientes que se seguem por litro:

Extrato de Levedura	10 g
Peptona de Soja	10 g
Solução Salina	20 ml
Resazurina	1 mg
Vitamina K	0,5 mg
Hemina	5 mg
Bicarbonato de Sódio	0,4 mg
L-cisteína HCl	0,85 mg
Glucose	10 g
Tampão HEPES (pH 7,3 - 7,8)	47,66 g

Esta formulação específica foi denominada meio SYG. Contudo, deve ser tomado em consideração que quantidades muito precisas de ingredientes acima proporcionados podem ser optimizadas, ou modificadas contanto que não sejam introduzidos produtos animais. O aspecto fundamental do meio é a ausência de sangue, de produtos derivados de bovinos ou ovinos e a capacidade do meio para suportar o crescimento de Streptococcus pneumoniae e desse modo a produção de polissacarídeos pneumocócicos úteis para a produção de vacina.

A peptona de soja modificada e a base de levedura são hidrolisados da levedura e proteínas da soja. Encontram-se disponíveis várias fontes comerciais para estes componentes. Verificámos que extracto de levedura Difco e Sheffield HY-SOY PEPTONE são completamente aceitáveis para esta finalidade.

A solução salina pode conter:

CaCl ₂ (anidro)	0,2 g
MgSO ₄ (anidro)*	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
NaHCO ₃	10,0 g
NaCl	2,0 g

(Misturar CaCl₂ e MgSO₄ em 300 ml de água destilada até dissolução. Adicionar 500 ml de água e, enquanto em torvelinho, adicionar lentamente os restantes sais. Continuar o torvelinho até todos estes sais se dissolverem. Adicionar 200 ml de água destilada, misturar e armazenar a 4° C. * Alternativamente, usar 0,48 g de

MgSO₄.7H₂O). Outras composições para a solução salina podem também ser aceitáveis, na medida em que sejam mantidos suficiente tamponamento e osmolaridade.

Resazurina é completamente facultativo e pode ser eliminado ou substituído com outro indicador como seja desejado. A sua única finalidade é indicar o potencial redox do meio. Caso seja incluído, ele poderá ser preparado como se segue: Dissolver 25 mg de resazurina em 100 ml de água destilada. Resazurina encontra-se disponível em forma em pó a partir de Fisher, Difco and Baker.

Pode ser necessária Vitamina K, dependendo do organismo a ser cultivado. Caso seja fornecida, ela poderá ser preparada como se segue: Vitamin K₁ Stock Solution (a ser adicionada ao meio): Dissolver 0,15 ml de Vitamina K₁ em 30 ml de etanol a 95%. Não esterilizar visto ser adicionada ao meio antes do autoclave. Adicionar 0,02 ml de solução do lote/100 ml de meio depois do meio ter sido submetido a ebulição mas antes de ser fornecido e submetido a autoclave. Concentração final no meio = 1 nl/ml (concentração final é de cerca de 1,0 µg/ml). Manter a solução do lote de Vitamina K₁ refrigerada e no escuro. Descartar a solução do lote após cerca de um mês.

A hemina é um componente necessário para a cultura de Streptococcus pneumoniae e pode ser necessária para outros organismos, especialmente num meio não contendo produtos sanguíneos. Visto que a hemina é um produto de baixo peso molecular, purificado, pode ser assegurada a ausência de agentes de contaminação. Pode ser preparada como se segue: Dissolver 50 mg de hemina em 1 ml de NaOH 1 N; levar até 100 ml com água

destilada. Autoclave a 121° C durante 15 minutos. Adicionar 1 ml desta solução a 100 ml de meio.

Bicarbonato de sódio é proporcionado como um agente de estimulação para crescimento de organismos exigentes.

L-cisteína pode ser ou pode não ser requerida, dependendo do organismo cultivado. Se se desejar um meio bem reduzido para cultura anaeróbica, a adição de L-Cisteína irá ajudar a manter o meio ambiente reduzido.

A glucose é proporcionada como uma fonte de carbono, e pode ser reabastecida após depleção. Fontes alternativas de carbono, tais como glicerol, podem também ser usadas com vantagem.

Tampão HEPES é adicionado para manter o controlo do pH. Outros tampões, tais como Tris, podem também ser usados, dependendo do pH preferido da cultura. Verificou-se que HEPES 0,2 M com um pH de cerca de 7,7 era aceitável para cultura de Streptococcus pneumoniae.

A descrição anterior proporciona uma base para modificação da formulação específica do meio deste invento, mantendo-se entretanto o principal aspecto que consiste em não existir sangue ou produtos derivados de bovino/ovino. O método de utilização do meio deste invento compreende os passos de

- (a) preparar uma cultura do lote numa placa de agar SYG;
- (b) seleccionar uma única colónia para expansão numa cultura de meio SYG, e facultativamente preparar um lote congelado da cultura;

- (c) fazer crescer a cultura em SYG, a 37° C, durante cerca de 5-24 horas, com o tempo de cultura variando de acordo com a espécie cultivada.

Agar SYG é meio SYG com 20 g/L de agar. Glicerol ou outros crioprotectores de conservação conhecidos nesta técnica podem ser adicionados a culturas a fim de manter a viabilidade de lotes congelados. De preferência, glicerol é adicionado numa concentração final variando entre cerca de 15 e 25%, e de preferência 17%.

Os Exemplos que se seguem demonstram a produção e utilização do meio deste invento para suportar o desenvolvimento do inóculo e crescimento de Streptococcus pneumoniae de vários serotipos, e a produção por essas culturas de polissacarídeo. O polissacarídeo assim produzido é útil para a preparação de vacinas conjugadas, tais como as descritas na Patente dos E.U.A. No. 4.695.624, aqui incorporada como referência. Métodos para a quantificação de polissacarídeo de pneumococos, incluindo imunodifusão e radioimunoensaio são bem conhecidos nesta técnica (ver por exemplo Heidelberger, J. Exp. Med., 55 p 555 (1932); Ouchterlony, Handbook of Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis, Ann Arbor Publishers (1968); EP 0 497 525 A2).

EXEMPLO 1

Crescimento de S. Pneumoniae 9V

Este exemplo demonstra o desenvolvimento de um meio desprovido de produtos derivados de bovinos ou ovinos que suporta bom crescimento da estirpe 9V de Streptococcus pneumoniae. Trabalhos anteriores deram origem

ao crescimento de S. pneumoniae 9V no meio PYG comercialmente disponível. Para este exemplo, peptona de soja foi usada em vez de peptona animal e tripticase para produzir meio PYG modificado, que foi sob outros aspectos idêntico ao meio PYG. Um lote deste meio, referido como W001, foi preparado usando peptona Sheffield HySoy. Um segundo lote, referido como W002, foi preparado usando peptona de soja Deltown SE50M. S. pneumoniae 9V a partir de lotes congelados idênticos foi inoculado em ambas as formulações. Tubos de cultura foram incubados a 37° C durante 14 horas. Ambas as formulações suportaram o crescimento de S. pneumoniae 9V. Contudo, a formulação Sheffield HySoy suportou um crescimento muito mais intenso do que a formulação Deltown SE50M. Outros detalhes deste trabalho são apresentados mais abaixo:

PYG modificado (W001) - Inóculo HySoy-100 µL a partir de um frasco congelado.

PYG modificado (W002) - Inóculo Deltown-100 µL a partir de um frasco congelado.

PYG-HySoy Mod. Líquido	0 - Nenhum crescimento
	100 µl - Crescimento Denso, Turvação, Uniforme, sem sedimento
PYG-Deltown Mod. Líquido	0 - Sem crescimento
	100 µl - crescimento muito ligeiro 1/10 de Hy-Soy

Para desenvolvimento em relação a estas observações as culturas que cresceram em caldo líquido foram inoculadas em #W001 e #W002 para sub-cultura e determinação da melhor formulação líquida:

Alberto Carlos

#W001 (HySoy)				#W002 (Deltown)			
<u>Inoculado</u>				<u>Inoculado</u>			
10µl	100µl	10µl	100µl	10µl	100µl	10µl	100µl
em				em			
#W001	#W001	#W002	#W002	#W001	#W001	#W002	#W002

MEIO

Fonte de Inóculo	#W001	#W002	Resultado
HySoy líquido 10 µl	+		bom crescimento
HySoy líquido 100µl	+		bom crescimento
HySoy líquido 10 µl		+	muito fraca turvação
HySoy líquido 100µl		+	muito fraca turvação
Deltown líquido 10µl	+		bom crescimento
Deltown líquido 100µl	+		bom crescimento
Deltown líquido 10µl		+	fraco crescimento
Deltown líquido 100µl		+	ligeiro crescimento

Conclusões/Resultados

1. Transferência de líquido para líquido foi coroada de êxito para crescimento de 9V.
2. Em todos os casos, meios preparados com Hy-Soy proporcionam um crescimento mais luxuriante, mais turvo do que os meios com peptona de soja Deltown SE50m.

O pH dos meios #W001 é de cerca de 6,7 e o de #W002 é de cerca de 6,65. É provável que um pH mais elevado (cerca de 7,5) com tamponamento, por exemplo com HEPES a 0,1 M ou 0,2 M vá suportar um crescimento ainda melhor que os meios sem tamponamento.

EXEMPLO 2

Produção de Polissacarídeo Extracelular de S. Pneumoniae 9V

O meio "SYG" suporta um excelente crescimento de Streptococcus pneumoniae 9V. O meio "SYG" utiliza peptona Sheffield Hy-Soy em vez de peptona e tripticase, e contém HEPES 0,2 M.

Neste exemplo, 9V foi cultivado em PYG como um controle positivo, com e sem HEPES, pH de cerca de 7,5 e SYG com e sem HEPES pH de cerca de 7,5 e o caldo de cultura foi ensaiado para produção de polissacarídeo de S. pneumoniae 9V (Pn9VPs) usando imunodifusão e taxa de nefelometria.

Materiais: Caldo de sementeira de S. pneumoniae 9V glicerol;
Tampão HEPES 1 M pH 7,70 filtrado estéril; PYG, Scott 3100-4807.
#R7320, (cerca de 4,75 ml/tubo); SYG (PYG mod.); #W001 (~4,6 ml/tubo);
Fenol; Columbia Blood Agar Plates (CBA).

Método:

10 µl de inóculo de S. pneumoniae 9V foram adicionados a tubos 5, 10, 11 e 12, misturados bem e incubados num frasco GasPak com CO₂, a 37° durante 10 horas.

Tubo #	Meio	9V inco. 10µl	0,2M HEPES	vol IM HEPES	fenol	fenil µl tubo	pH pré inoc.	pH final	A600 pré inoc.	A600 final	observação visual
1	PYG	-	-	-	-	-	6,7		0,059		
2	PYG	-	-	-	+	56	6,7		0,059		
3	PYG	-	+	0,95 ml	-	-	7,52		0,068		
4	PYG	-	+	0,95 ml	+	66	7,52		0,068		
11	PYG	+	-	-	+	56	6,7	6,7	0,060	0,060	sem crescimento visível
5	PYG	+	+	0,95 ml	+	66	7,52	6,63	0,068	4,31	crescimento denso, não tão denso como #10
6	SYG	-	-	-	-	-	6,6		0,128		
7	SYG	-	-	-	+	56	6,6		0,128		
8	SYG	-	+	0,92 ml	-	-	7,46		0,120		
9	SYG	-	+	0,92 ml	+	66	7,46		0,120		
12	SYG	+	-	-	+	56	6,7	5,05	0,128	0,95	crescimento ligeiro-razoável
10	SYG	+	+	0,92 ml	+	66	7,46	5,38	120	6,03	crescimento muito denso algum sedimento

Alberto Mendes

Os tubos foram examinados quanto ao crescimento, e o pH, A600 foram medidos. Foi adicionado fenol a cada tubo, foram bem misturados e transferidos para tubos Oak Ridge estéreis com 50 ml limpos. Os tubos foram regulados para agitação a 200 rpm, a 37° C durante 2 horas.

Após 2 horas morte com fenol , (Nota: após morte com fenol - 200 ml de caldo morto com fenol 1:100 foram pipetados para a superfície de 2 placas CBA por amostra. As placas foram incubadas a 37° C sob CO₂ durante a noite. Nenhum crescimento em placas CBA indicou morte completa por fenol). Os tubos foram centrifugados num rotor SS-34 a 10.000 rpm, 4°C durante 20 minutos. O produto flutuante foi removido para recipientes Wheaton 4 x 2 ml para cada amostra. Os recipientes foram armazenados a 4° C. Amostras números 1-4 e 6-9 foram misturadas com as quantidades apropriadas de HEPES e/ou fenol, foram bem misturadas e divididas em porções alíquotas para recipientes Wheaton 4 x 2 ml.

As placas CBA de caldo morto com fenol, amostras #5, e #10 não revelaram qualquer crescimento. Uma porção alíquota de 1 ml de produto flutuante armazenado a 4° C das amostras #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 foi ensaiada quanto a Pn 9V Ps por imunodifusão.

Padrão Pn 9V: 1,0 mg/ml e diluído até 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,031, 0,0155 mg/ml. Bandas intensas de precipitina foram observadas em cada recipiente.

Amostras números 1, 2, 3 e 4 foram controlos do meio. Não se observou reactividade com anticorpo Pn 9V.

A amostra número 5 foi carregada não diluída (st), e a diluições 1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. Bandas fracas foram observadas nas posições não diluída e 1:2. A concentração da amostra #5 corresponde a uma intensidade de banda de ~0,05 mg/ml em comparação com o padrão 9V.

As amostras números 6, 7, 8 e 9 foram controlos do meio. Não se observou qualquer reactividade com anticorpo 9V.

A amostra 10 é 9V feita crescer em SYG mais HEPES. Uma banda forte em amostras diluídas até 1:8 corresponde a uma concentração de polissacarídeo de ~0,25 mg/ml em comparação com padrão 9V.

A amostra No. 12 deu origem a uma resposta de imunodifusão correspondendo a cerca de 0,05 mg/ml.

Todas as amostras testadas por imunodifusão foram produtos flutuantes mortos pelo fenol armazenados a 4° C.

O mesmo painel de amostras foi também analisado por um ensaio de taxa de nefelometria Pn 9V Ps.

Conclusões:

1. Todos os controlos do meio foram não reactivos.
2. Amostras 5, 10 e 12, tanto líquidas como congeladas, respondem positivamente no ensaio.
3. Amostras No. 5, 10 e 12 apresentam taxas de resposta muito diferentes no ensaio de taxa de nefelometria. Pode haver diversas razões para isto:

- a. O padrão 9V é um 9V Ps purificado e calibrado, enquanto que o PnPs no caldo é em bruto, não purificado ou calibrado.
- b. Os organismos podem produzir diferentes tamanhos de Ps dependendo do pH, A600, taxa de crescimento, tempo na fase estacionária, etc. Assim, a quantificação de Pn 9V Ps não é possível ainda devido aos factores acima referidos.

Resultados:

Tubo No.	Imunodifusão	Taxa Nefelometria
	Resultados	Resultados
1	Sem reacção com Ab	Sem reacção
2	Sem reacção com Ab	Sem reacção
3	Sem reacção com Ab	Sem reacção
4	Sem reacção com Ab	Sem reacção
11	Não submetido	Não submetido
5	pós. ~0,05 mg/ml	positivo liq.& amostras -70°C
6	Sem reacção com Ab	Sem reacção
7	Sem reacção com Ab	Sem reacção
8	Sem reacção com Ab	Sem reacção
9	Sem reacção com Ab	Sem reacção
12	pós. ~0,05 mg/ml	positivo liq.& amostras -70°C
10	pós. ~0,05 mg/ml	positivo liq.& amostras -70°C

EXEMPLO 3

Preparação de Culturas Mãe Isoladas Clonalmente de *S. pneumoniae*:

Preparámos lotes laboratoriais em SYG de *S. pneumoniae* serotipos

4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F para utilização laboratorial de rotina. Foram preparados tal como é descrito mais abaixo.

Preparação de Lote Mãe de Trabalho Laboratorial:

Culturas liofilizadas de S. pneumoniae foram suspensas de novo em caldo de infusão de coração de vaca, inoculadas para líquido SYG, e feitas crescer durante 6-12 horas. Foi adicionado glicerol, e a cultura foi dividida em porções alíquotas e congelada. Produzimos ~5 frascos de cada serotipo. Estes frascos têm como objectivo serem lotes mãe de trabalho laboratorial. Estas culturas foram subsequentemente expandidas em caldo SYG para produzir ~60 frascos para cada serotipo.

Expansão e Preparação de Pré-Culturas Mãe de Simulação:

Um frasco de caldo de trabalho laboratorial master congelado de S. pneumoniae foi descongelado e inoculado em caldo SYG e feito crescer durante 6-12 horas. Foi adicionado glicerol e as culturas foram divididas em porções alíquotas e foram congeladas para dar origem a 60 frascos para cada serotipo. Estas culturas serviram como a nossa fonte de cultura laboratorial de rotina. Para preparar pré-culturas mãe isoladas clonalmente, um frasco liofilizado de S. pneumoniae é suspenso de novo em SYG e riscado em agar SYG. Após incubação durante 12-26 horas a 37° C sob CO₂ foi retirada uma única colónia a qual foi riscada em agar SYG. As placas foram incubadas 12-26 horas a 37° C sob CO₂ e uma única colónia foi retirada e inoculada em SYG líquido, e feita crescer durante 6-12 horas. Foi adicionado glicerol e a cultura foi dividida em porções alíquotas e congelada.

EXEMPLO 4

Crescimento de *S. pneumoniae* 9V e Produção de Polissacarídeo num Fermentador:

Utilizamos a nossa pré-cultura mãe de Pn 9V para inocular 350 ml de SYG líquido. Isto foi usado para inocular 15 L de meio de produção de *S. pneumoniae*. O crescimento da cultura e a produção de polissacarídeo foi equivalente à observada quando *S. pneumoniae* 9V foi derivado de culturas derivadas de sangue.

EXEMPLO 5

Crescimento de *S. pneumoniae* de Outros Subtipos:

A cultura de quaisquer estirpes de *Streptococcus pneumoniae* (nomenclatura Dinamarquesa tendo como base o serotipo) 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F em meio SYG e desenvolvimento de inóculo são conduzidos essencialmente tal como foi acima descrito para *S. pneumoniae* 9V. Cada um dos *Streptococcus pneumoniae* 4, 6B, 14, 18C, 19F, e 23F foram feitos crescer em SYG e foram obtidos dados positivos sobre imunodifusão e RIA para a produção de polissacarídeo de pneumococos. Cada serotipo foi feito crescer em SYG a 37° C sob CO₂ durante 8-24 horas. As amostras foram colhidas durante o crescimento, as células foram inactivadas com fenol, e os produtos flutuantes foram ensaiados quanto a polissacarídeo extracelular por imunodifusão e foram quantificados por RIA:

Serotipo	Horas Crescimento	Início A600	Fim A600	Imuno- difusão	RIA µg/ml
4	24	0,086	1,68	+	140
6B	24	0,086	2,21	+	370
9V	24	0,086	1,76	+	121
14	24	0,086	3,69	+	68
18C	8	0,086	3,98	+	240

Serotipo	Horas Crescimento	Início A600	Fim A600	Imuno- difusão	RIA µg/ml
19F	8	0,086	3,96	+	161
23F	12	0,086	2,71	+	317

Tendo como base estes resultados, é esperado que todos os serotipos de pneumococos irão crescer de um modo adequado no meio SYG ou numa sua modificação, de acordo com este invento, e que o desenvolvimento do inóculo de serotipos de pneumococos neste meio será exequível.

Lisboa, 25 de Janeiro de 2001

Alberto Canelas

ALBERTO CANELAS
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para crescimento clonal de Streptococcus pneumoniae a partir do estágio de colónia única num meio não contendo produtos derivados de bovino, derivados de ovino ou derivados de sangue crú que compreende:

- (a) preparação de uma placa de agar do referido meio riscado com o referido Streptococcus pneumoniae, e crescimento do referido Streptococcus pneumoniae, em que a referida placa de agar compreende agar, Extrato de Levedura, Peptona de Soja, sais para manter tamponamento e osmolaridade, Vitamina K caso se saiba ser necessária para a estirpe particular a ser isolada, Hemina, Bicarbonato de Sódio, L-cisteína HCl, Glucose, um tampão para manter o pH a entre cerca de 7,3-7,8; e
- (b) selecção de uma única colónia para expansão fazendo crescer numa cultura do mesmo meio usado no passo (a) sem agar, e facultativamente armazenando a cultura sob a forma de um lote de glicerol congelado.

2. O método da Reivindicação 1, em que o meio no passo (a) é uma placa de SYG agarsemeada em estrias com o referido Streptococcus pneumoniae, em que a placa de agar SYG contem, numa base por litro, cerca de 20 g de agar e:

Extrato de levedura	10 g
Peptona de Soja	10 g
Solução Salina	20 ml
Resazurina	1 mg
Vitamina K	0,5 mg
Hemina	5 mg
Bicarbonato de Sódio	0,4 g
L-cisteína HCl	0,85 g
Glucose	10 g
Tampão HEPES (pH 7,3-7,8)	47,66 g; e

em que a referida solução salina contem CaCl_2 (0,2 g anidro), MgSO_4 (0,2 g anidro), K_2HPO_4 (1,0 g), KH_2PO_4 (1,0 g), NaHCO_3 (10 g), NaCl (2 g).

Lisboa, 25 de Janeiro de 2001

Alberto Canelas

ALBERTO CANELAS
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA