

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 515 466**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/18** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2011 E 11728209 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2580598**

54 Título: **Espectrometría de masas de resistencias por betalactamasas**

30 Prioridad:

**11.06.2010 DE 102010023452**

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

**29.10.2014**

73 Titular/es:

**BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%)  
Fahrenheitstrasse 4  
28359 Bremen, DE**

72 Inventor/es:

**KOSTRZEWA, MARKUS;  
MICHELMANN, KARSTEN y  
SPARBIER, KATRIN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Nuria**

**ES 2 515 466 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).

5

**DESCRIPCION****Espectrometría de masas de resistencias por betalactamasas***Sector de la invención*

[0001] La invención se refiere a la determinación de la resistencia de bacterias que producen betalactamasas, incluidas las «betalactamasas de espectro extendido» (BLEE).

10 *Estado de la técnica*

[0002] Muchos tipos de microbios, en particular las bacterias y los hongos unicelulares, pueden identificarse fácilmente con espectrometría de masas mediante la transferencia de pequeñas cantidades de microbios de una colonia cultivada de la forma habitual sobre o en un medio nutritivo a una placa de soporte de muestras para espectrometría de masas, donde se preparan con una disolución de una matriz y se miden mediante espectrometría de masas tras la ionización por desorción láser asistida por matriz. El espectro de masa representa masas e intensidades de proteínas características en el caso de que estas estén presentes en los microbios en una concentración suficiente. Este espectro, que muestra picos de alrededor de 40 a 80 proteínas de los microbios cada vez, es utilizado para determinar su identidad mediante análisis de similitud con miles de espectros de referencia en las colecciones de espectros correspondientes. El término «identificación» denota aquí una clasificación taxonómica, por ejemplo la determinación de la familia, género y especie. La investigación se lleva a cabo en muchos lugares para cotejar las colecciones fiables y susceptibles de aprobación legal para aplicaciones médicas (las denominadas colecciones «homologadas») con espectros de referencia de miles de microbios.

25 [0003] Este método de identificación de microbios ha demostrado una extraordinaria eficacia tanto para estudios como para la actividad diaria de numerosos laboratorios de microbiología. Es un método rápido, con costes reducidos y tasas de error muy bajas, muy inferiores a los métodos de identificación microbiana convencionales.

30 [0004] Se pueden utilizar versiones especiales de estos métodos para identificar no solo especies microbianas sino a menudo también subespecies e incluso en ocasiones las cepas individuales, siempre que la masa o intensidad de las proteínas más frecuentes de estas cepas sea diferente y, por tanto, se pueda detectar mediante espectrometría de masas. Para una descripción más detallada, consultar la solicitud de patente DE 10 2009 032 649 A1 (T. Maier y M. Kostrzewa, 2009, US

5 2011/0012016 A1; GB 2 471 746 A), por ejemplo, que no solo presenta una explicación detallada del método sino también un proceso de identificación más refinado.

[0005] La identificación microbiana desempeña una función importante en las enfermedades infecciosas, en particular en el caso de una sepsis. En este caso es importante ser capaz de identificar las especies de microorganismos patógenos muy rápidamente, para así aplicar el tratamiento médico adecuado de forma inmediata. La identificación mediante espectrometría de masas se ha ensayado y probado también en estos casos, y actualmente está logrando aceptación en laboratorios clínicos y de microbiología.

[0006] No obstante, en el campo médico no solo se hace frente al problema de una identificación rápida sino también al de la detección de resistencias a los antibióticos de uso habitual. Es imposible lograr una rápida lucha contra enfermedades infecciosas sin conocer las resistencias. Por este motivo no solo es preciso obtener una rápida identificación sino también determinar y caracterizar rápidamente las resistencias de los microorganismos. Se sabe que algunas especies microbianas poseen una resistencia casi total a ciertos antibióticos, por lo que tras una identificación precisa ya no tiene sentido determinar la resistencia. Sin embargo, en la mayoría de los casos las especies tienen algunas cepas que no son resistentes, otras con una resistencia reducida y en particular cepas con una gran resistencia, y además muestran diferentes grados de resistencia a diferentes tipos de antibióticos. Por ese motivo es esencial determinar el tipo y la intensidad de la resistencia.

[0007] Parece lógico, por tanto, no limitar el uso de los espectrómetros de masas a la identificación taxonómica, sino utilizarlos también para determinar las resistencias de los microbios, en particular de las bacterias, a ciertos antibióticos. No obstante, esta labor se ha revelado muy complicada. Aunque las resistencias deben manifestarse también por la presencia de proteínas nuevas o modificadas, aún no se ha logrado una identificación directa a partir del perfil proteínico resultante de la espectrometría de masas. Al fin y al cabo, de los cientos o incluso miles de proteínas de los microbios en el espectro de masa solo aparecen de 40 a 80 de ellas. Por lo tanto, la resistencia debe determinarse de forma indirecta. En el documento DE 10 2006 021 493 B4 (V. Govorun y J. Franzen; GB 2 438 066 B; US 2008/0009029 A1) se presenta un primer intento de una determinación de la resistencia de este tipo, si bien este método aún no está aceptado. El método se basa fundamentalmente en la modificación de los perfiles proteínicos provocada por la muerte

5 celular tras la adición de antibióticos o en la detección de una interrupción del crecimiento en comparación con los microbios resistentes de referencia.

[0008] El término «resistencia a los antibióticos» se utiliza para referirse a características de microorganismos (aquí principalmente **bacterias**) que les permiten mitigar o neutralizar por completo el efecto de los principios activos antibióticos. Las resistencias están ahora muy  
10 extendidas; en EE. UU. en torno al 70 % de los microbios infecciosos adquiridos en hospitales son resistentes al menos a un antibiótico. Con frecuencia los pacientes se contagian con cepas bacterianas resistentes a varios antibióticos (multirresistencia). Las denominadas bacterias problemáticas son el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), el género *Pseudomonas*, la *Escherichia coli* con resistencia por BLEE y el *Mycobacterium tuberculosis*. Los  
15 cálculos realizados por los CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades) indican que en el año 2004 se adquirieron en los hospitales de EE. UU. dos millones de infecciones con alrededor de 90 000 muertes, una cifra muy superior a la de muertes por accidentes de carretera, domésticos o industriales.

[0009] Habitualmente el término «antibiótico» se refiere a fármacos o productos farmacéuticos  
20 empleados para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas. El enorme éxito de los antibióticos en el campo de la medicina comenzó con la penicilina. El éxito de la penicilina, así como la aparición de las primeras resistencias, llevó a los investigadores a buscar y descubrir muchos más antibióticos: estreptomina, cloranfenicol, aureomicina y tetraciclina, entre muchos otros. La mayoría de los antibióticos conocidos actualmente derivan de sustancias naturales. En el  
25 lenguaje coloquial la penicilina se utiliza ahora como sinónimo de antibiótico.

[0010] La penicilina es un antibiótico betalactámico. Estos antibióticos betalactámicos se fijan a la proteína fijadora de la penicilina (PFP), un peptidoglicano con actividad **transpeptidasa** responsable de la formación de enlaces peptídicos para reforzar las paredes celulares. Los enlaces entre los antibióticos betalactámicos y la PFP inhiben a la PFP. Una cantidad insuficiente de PFP activa  
30 provoca lesiones en la pared celular a medida que las bacterias crecen; así, la membrana pierde el control de su permeabilidad y la capacidad de regular la concentración en el citoplasma. Tras un breve intervalo de tiempo la bacteria se vuelve inviable. Bajo condiciones extremas, en el laboratorio se puede observar cómo las células bacterianas «estallan» literalmente. Esta es la forma como los antibióticos betalactámicos actúan como bactericidas.

5 [0011] Desde las primeras aplicaciones de la penicilina las bacterias han ido desarrollando diferentes tipos de resistencias a ritmo creciente. Un tipo importante de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos consiste en la síntesis de unas enzimas (las betalactamasas) que catalizan la hidrólisis del anillo betalactámico, rompiéndolo e inhibiendo así su acción. Actualmente se conocen más de 340 variantes de betalactamasas sintetizadas por muchos tipos de bacterias.

10 Pueden dividirse en diferentes clases en función de su estructura general o su forma de actuación. La información genética para la síntesis de la enzima, originada por unas mutaciones, es heredada por cromosomas o por **plásmidos**. La información plasmídica puede transmitirse entre bacterias mediante diversos mecanismos, incluso entre bacterias de diferentes especies por contacto («transmisión horizontal»). En función de la acción de las betalactamasas se distingue entre las

15 penicilinasas y las cefalosporinasas, pero hay más clases. Estas enzimas tienen un efecto catalizador, lo que significa que basta una pequeña cantidad de betalactamasas para destruir grandes cantidades de antibióticos betalactámicos.

[0012] Hoy en día existe un gran número de derivados de los antibióticos betalactámicos, entre ellos varias penicilinas (bencilpenicilinas, penicilinas orales, aminopenicilinas, isoxazolilpenicilinas, acilaminopenicilinas), cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Estos antibióticos se suelen modificar para obtener derivados con grupos químicos de mayor tamaño que bloqueen estéricamente a las betalactamasas. Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), por su lado, pueden descomponer una amplia gama de antibióticos betalactámicos. Las BLEE se forman inicialmente por mutaciones puntuales de una betalactamasa. Los genes de las

20 BLEE se encuentran en plásmidos, que pueden transmitirse horizontalmente de bacteria a bacteria.

[0013] Las bacterias que contienen BLEE son resistentes a las penicilinas, las cefalosporinas (generaciones 1-4) y los monobactámicos. Las principales bacterias portadoras de genes de BLEE son *Escherichia coli* y *Klebsiella* (bacterias gramnegativas), pero los microbiólogos están observando, con gran preocupación, una rápida propagación de la resistencia por BLEE. Además de

30 la resistencia a la meticilina del *Staphylococcus aureus* (SARM), las BLEE son una de las cuestiones que más preocupación causan en el ámbito de la investigación sobre infecciones.

[0014] Los inhibidores de betalactamasas son una herramienta frente a las betalactamasas, y se administran junto con antibióticos betalactámicos para mitigar el efecto de las betalactamasas presentes en la bacteria. Las combinaciones establecidas son: ácido clavulánico + amoxicilina, sulbactam + ampicilina y tazobactam + piperacilina. No todas las combinaciones ofrecen un

35

5 resultado óptimo. Estos inhibidores solo deberían utilizarse tras una minuciosa identificación de las bacterias y una cuidadosa determinación de su resistencia, ya que es probable que también pierdan su eficacia con rapidez.

[0015] En las décadas de 1970 y 1980 aún había una gran actividad investigadora en el campo de los antibióticos. Hoy en día el desarrollo de nuevos antibióticos se ha reducido en gran medida, si bien los antibióticos cuentan entre los fármacos más frecuentemente prescritos en todo el mundo; con un 13 % de la cuota de mercado constituyen el mayor segmento individual de los fármacos que utilizamos. De los aproximadamente 8000 principios activos antibióticos que conocemos en la actualidad, solo unos 80 se utilizan con fines terapéuticos, debido principalmente a los efectos secundarios pero también a los costes de la aprobación para su comercialización. De acuerdo con el Instituto Alemán Federal de Fármacos y Dispositivos Médicos (BfArM) en el año 2005 se aprobaron en Alemania un total de 2775 antibióticos, pero solo abarcaban los aproximadamente 80 principios activos antibióticos arriba mencionados.

[0016] A medida que pasa el tiempo, el problema de la resistencia de microorganismos a antibióticos, como por ejemplo bactericidas o fungicidas, va adquiriendo un carácter más urgente. Por una parte, la velocidad con la que los microorganismos desarrollan resistencia a diferentes tipos de antibióticos va aumentando; por otra, cada vez se crean menos antibióticos nuevos para aplicaciones médicas. Dado que muchos antibióticos nuevos deben retirarse del mercado tras un breve intervalo de tiempo debido a su ineficacia, a las compañías farmacéuticas les resulta cada vez menos rentable realizar grandes inversiones en nuevos antibióticos, cuya creación es cada vez más complicada. De acuerdo con la OMS, entre 1990 y 2005 solo se lanzaron tres nuevos principios activos antibióticos, en comparación con los diez lanzados entre 1940 y 1950 y los cinco entre 1971 y 1980.

[0017] Los motivos del rápido aumento de la resistencia son varios: la prescripción irresponsable de antibióticos, incluso cuando no son necesarios; la interrupción irresponsable de tratamientos con bactericidas antes de que el agente infeccioso se haya erradicado; el uso irresponsable en la agricultura y ganadería, a menudo puramente preventivo. Todas estas prácticas contribuyen a la selección y propagación de especies microbianas resistentes frente a las especies sin resistencia.

[0018] Celebrados a mediados del siglo pasado como la gran esperanza en la lucha contra las enfermedades infecciosas, los antibióticos se están convirtiendo rápidamente en una herramienta ineficaz. La única esperanza para frenar este proceso son las aplicaciones dirigidas con tratamientos

5 que se cumplan de principio a fin, y esto requiere la rápida identificación de los microorganismos patógenos infecciosos y de sus resistencias específicas a los diferentes tipos de antibióticos.

*Objeto de la invención*

[0019] El objeto de la invención es proporcionar un método para determinar de forma rápida y sencilla mediante espectrometría de masas la resistencia por betalactamasas de microbios, en particular de bacterias, a diferentes tipos de antibióticos betalactámicos.

*Resumen de la invención*

[0020] La invención proporciona un método para medir rápida y fácilmente la resistencia microbiana por betalactamasas con un espectrómetro de masas. El método determina la resistencia de las bacterias pocas horas después de la adición de los microbios a un sustrato apropiado, ya sea un antibiótico betalactámico o un derivado betalactámico a medida, mediante una medición directa con espectrometría de masas del ataque hidrolítico de las betalactamasas sobre el sustrato. El efecto catalizador de las betalactamasas de origen bacteriano sobre el sustrato provoca la escisión por hidrólisis del anillo betalactámico. Se reduce la cantidad de sustrato y en su lugar aparece el producto hidrolizado, cuya masa es 18 unidades de masa atómica mayor.

[0021] La reacción de descomposición enzimática es bastante rápida; si la reducción gradual de sustrato no la frena, cada reacción molecular tarda aproximadamente entre 1 y 100 milisegundos, con diferencias características en función de la betalactamasa concreta. La medida de la velocidad de reacción proporciona información preliminar sobre el tipo y la fuerza de las betalactamasas.

[0022] En principio la medición se puede realizar con cualquier espectrómetro de masas, pero resulta especialmente recomendable utilizar el mismo espectrómetro de masas MALDI con analizador de tiempo de vuelo que se utilizó para la identificación de las bacterias. Dado que el proceso MALDI (ionización por desorción láser asistida por matriz) para la ionización de sustancias en un margen de masas más bajas, de unos pocos cientos de unidades de masa atómica, genera un ruido de fondo muy fuerte, es recomendable utilizar sustratos de regiones con ruido de fondo reducido. Esto se puede realizar preparando sustratos a medida con masas moleculares de entre 700 y 1200 unidades de masa atómica. También es conveniente aumentar la afinidad protónica de los sustratos para aumentar su grado de ionización. No obstante, a menudo conviene utilizar concentraciones más elevadas del sustrato para aumentar la sensibilidad. Se pueden preparar sustratos a medida para que el elevado efecto bactericida de una alta concentración no erradique a

5 las bacterias de forma inmediata, de tal forma que su efecto antibiótico, esto es, su valor de CIM, sea relativamente reducido. CIM es la «concentración inhibitoria mínima» para que los inhibidores de la betalactamasa inhiban el antibiótico presente correspondiente, y sirve como medida de la intensidad de la resistencia y de la fuerza del antibiótico.

[0023] Un ejemplo de un sustrato favorable es el resultante del enlace covalente de un marcador de  
10 hexahistidina a un antibiótico betalactámico. Un marcador de hexahistidina consiste en una cadena de 6 moléculas de histidina, aumenta la masa molecular en alrededor de 800 unidades de masa atómica, mejora la afinidad protónica y permite además extraer el sustrato y su producto de descomposición en forma pura del líquido reactivo. Esta extracción se puede llevar a cabo, por ejemplo, con la ayuda de microesferas magnéticas ya comercializadas que tienen en su superficie un  
15 quelato cargado con iones de níquel que se fija de forma reversible al marcador de hexahistidina. Entonces se puede preparar la muestra para MALDI, cuya matriz contiene el sustrato restante y su producto de descomposición en una forma muy enriquecida y purificada, por lo que permite una medición muy sensible.

[0024] En particular es posible diseñar ensayos específicos de multiresistencia con la adición de  
20 diversos tipos de sustrato diferentes, de forma que los diferentes sustratos se modifican a medida y se introducen en unas concentraciones tales que su patrón de degradación permita identificar la clase y también la fuerza de las betalactamasas. Por ejemplo, los sustratos pueden imitar la accesibilidad al anillo betalactámico de los diferentes grupos de antibióticos.

#### *Breve descripción de la figura*

25 [0025] El espectro de masa superior de la figura 1 muestra el resultado de añadir ampicilina con masa molar de 349,41 unidades de masa atómica a una suspensión de la cepa DH5a de *Escherichia coli*, que no es resistente. No se produce degradación de la ampicilina (masa de 350 unidades de masa atómica) ni de la sal sódica de la ampicilina (masa de 372 unidades de masa atómica). Por el contrario, el espectro de masa inferior muestra el efecto de una cepa de *Escherichia coli* resistente  
30 por BLEE sobre la ampicilina y su sal sódica: ambas se degradan a productos hidrolizados con masas de 368 y 390 unidades de masa atómica.

#### *Preparaciones preferidas*

[0026] La invención proporciona un método sencillo y rápido para determinar resistencias microbianas basándose en que los microbios, y en particular las bacterias, sintetizan betalactamasas.



5 [0027] El método básicamente añade uno o más sustratos apropiados a una suspensión de las bacterias. Los sustratos pueden ser o bien antibióticos betalactámicos o preferentemente derivados betalactámicos preparados a medida. Si las bacterias presentan una resistencia por betalactamasas, en un intervalo de minutos a horas y en condiciones adecuadas de incubación las betalactamasas degradan al menos un sustrato mediante la escisión por hidrólisis del anillo betalactámico. Esta  
10 degradación hidrolítica del sustrato causada por las betalactamasas puede medirse directamente mediante una espectrometría de masas. La cantidad de sustrato se reduce y este es sustituido por el producto hidrolizado, cuya masa es 18 unidades de masa atómica mayor.

[0028] En la figura 1 se muestra esta degradación, que tiene lugar únicamente cuando existe una resistencia, mediante el uso del antibiótico betalactámico en dos espectros de masa. El espectro de  
15 masa superior muestra el resultado de añadir ampicilina con una masa molar de 349,41 unidades de masa atómica a una suspensión de la cepa DH5a de *Escherichia coli*. La cepa no tiene resistencia. Por lo tanto, no se observa degradación de la ampicilina (visible aquí con una masa de 350 unidades de masa atómica) ni de la sal sódica de la ampicilina (masa de 372 unidades de masa atómica). Por el contrario, el espectro de masa inferior muestra el efecto de una cepa de *Escherichia coli*  
20 resistente por BLEE sobre la ampicilina y su sal sódica: ambas se degradan a productos hidrolizados con masas de 368 y 390 unidades de masa atómica.

[0029] La ampicilina es un fármaco semisintético con acción antibiótica del grupo de los antibióticos betalactámicos (penicilinas). Se conoce como un antibiótico de amplio espectro debido a su eficacia frente a microorganismos patógenos grampositivos y ciertos bacilos gramnegativos. En  
25 términos químicos la ampicilina es una aminopenicilina.

[0030] Al igual que ocurre con todos los antibióticos betalactámicos, el efecto bactericida (eliminación de bacterias) de la ampicilina se basa en la inhibición de una enzima, la D-alanina transpeptidasa, que está presente en diferentes bacterias en diferentes formas. Esta enzima es necesaria para la formación de una nueva y sólida pared celular en la fase de división o crecimiento  
30 de las bacterias. Estas transpeptidasas se denominan también proteínas fijadoras de la penicilina (PFP). La inhibición tiene lugar mediante la fijación del anillo betalactámico a la enzima. Esta fijación evita una nueva síntesis de paredes celulares rígidas. Así pues, las células son incapaces de dividirse; no obstante, en un primer momento sobreviven, hasta que su crecimiento provoca tantas lesiones en la pared celular que la célula acaba muriendo. Sin embargo, la división y el crecimiento

5 de las células humanas no se frena, ya que las células humanas carecen de pared celular y tienen solo una membrana celular, por lo que no poseen la transpeptidasa correspondiente.

[0031] En el ejemplo mostrado en la figura 1 se vertieron 10 microlitros de disolución de ampicilina en una concentración de 10 miligramos por mililitro de agua en un tubo de ensayo Eppendorf. Se eligieron tres colonias de bacterias para analizarlas y después se volvieron a  
10 suspender en la disolución de ampicilina de 10 microlitros. A continuación los recipientes se incubaron durante 3 horas a 37 °C con agitación. Tras la incubación se centrifugaron durante 2 minutos a 13 000 revoluciones por minuto para separar las células. La ampicilina restante y el producto de la hidrólisis quedaron entonces en el sobrenadante.

[0032] En principio la medición se puede realizar con cualquier espectrómetro de masas, pero  
15 resulta especialmente recomendable utilizar el mismo espectrómetro de masas MALDI con analizador de tiempo de vuelo que se utilizó para la identificación de las bacterias. Para ello se vertieron 1,5 microlitros del sobrenadante en el soporte de muestras para espectrometría de masas. Una vez se hubieron secado, las muestras se recubrieron con 1 microlitro de disolución de una matriz. La matriz utilizada fue el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) en una concentración  
20 de 10 miligramos por mililitro en una mezcla de agua, 50 % de acetonitrilo y 2,5 % de ácido trifluoroacético. Una vez se hubo secado de nuevo, se obtuvo un espectro de masa de esta preparación en el espectrómetro de masas MALDI con analizador de tiempo de vuelo de la forma habitual.

[0033] La concentración de la ampicilina utilizada como sustrato en este ejemplo es  
25 extraordinariamente alta, más de mil veces superior a la necesaria para un tratamiento terapéutico. El hecho de que se degrade esta cantidad de ampicilina muestra la extraordinaria eficacia de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Es muy improbable que las bacterias sobrevivan a esta elevada concentración durante mucho tiempo; no obstante, la pequeña cantidad de betalactamasa expulsada durante su vida es suficiente para catalizar la escisión de esta gran  
30 cantidad de sustrato. Se eligió una elevada concentración para que las señales se pudieran ver claramente por encima del elevado ruido de fondo que existe en este intervalo de masas. La concentración podría ser 100 veces menor si se pudiera utilizar un sustrato en el intervalo de masas de 800 a 1000 unidades de masa atómica, lo cual es posible con sustratos preparados a medida con masas moleculares más elevadas.

5 [0034] También es conveniente aumentar la afinidad protónica de los sustratos para aumentar el grado de ionización. Debido a sus reducidas masas, los antibióticos betalactámicos no tienen una elevada afinidad protónica; por lo tanto, en el proceso de ionización solo se ionizan pequeñas proporciones de ellos. La sensibilidad se puede aumentar hasta en 10 veces si se añaden, por ejemplo, aminoácidos con una elevada afinidad protónica.

10 [0035] No obstante, a menudo conviene utilizar concentraciones más elevadas del sustrato para lograr un incremento adicional de la sensibilidad. Pero para impedir que las bacterias con betalactamasas menos activas sean destruidas inmediatamente por una elevada eficacia bactericida, los sustratos pueden modificarse a medida de tal manera que su efecto antibiótico, esto es, su valor de CIM, sea relativamente bajo. La eficacia del antibiótico suele reducirse a medida que aumenta el tamaño de las moléculas, ya que esto impide en gran medida que penetren en las bacterias a través de los poros de la pared celular.

[0036] Además, es conveniente preparar los sustratos para que puedan extraerse por completo y de forma sencilla del sobrenadante. En este sentido, se pueden proporcionar sustratos con grupos enlazantes de forma que los componentes inmovilizados se utilizan para su extracción. La fijación de una biotina al sustrato se describe aquí como primer ejemplo. Tanto el sustrato como el producto de degradación pueden extraerse del sobrenadante gracias a la estreptavidina inmovilizada en las paredes. Dado que el enlace entre la biotina y la estreptavidina es reversible, el sustrato y su producto de degradación se pueden seguir procesando y midiendo tras haber sido enriquecidos de la forma conocida. Se han comercializado ya recipientes apropiados cuyas paredes interiores están revestidas con estreptavidina, así como micropartículas recubiertas, por ejemplo las microesferas magnéticas.

[0037] Un ejemplo de sustrato extraíble especialmente favorable es el resultante del enlace covalente de un marcador de hexahistidina a un antibiótico betalactámico. Un marcador de hexahistidina consiste en una cadena de 6 moléculas de histidina, aumenta la masa molecular en alrededor de 800 unidades de masa atómica, mejora la afinidad protónica y ofrece un procedimiento sencillo para extraer el sustrato y su producto de descomposición del líquido reactivo. Esta extracción se puede realizar con microesferas magnéticas, por ejemplo. Se han comercializado microesferas magnéticas revestidas con quelatos. Estos quelatos se pueden cargar con iones de níquel. Los iones de níquel se fijan de forma reversible a los marcadores de hexahistidina. Esto facilita la preparación de las muestras para MALDI de la forma conocida, con muestras que

5 contienen solo el sustrato restante y su producto de descomposición en una forma purificada, incrustados en cristales de la matriz, lo que permite una medición muy precisa.

[0038] La reacción de descomposición enzimática de las betalactamasas es bastante rápida; si la reducción gradual del sustrato no la frena, cada reacción molecular tarda aproximadamente entre 1 y 100 milisegundos. Las diferencias características en las velocidades de reacción de las diferentes  
10 betalactamasas se pueden medir y proporcionan información sobre la fuerza de la betalactamasa presente, y por tanto también indican el tipo de betalactamasa. En el caso más favorable se puede medir la velocidad de reacción en un único espectro de masa. Si se detiene la incubación tras exactamente media hora, por ejemplo, se puede averiguar la velocidad de reacción a partir del cociente del sustrato restante y el producto de degradación, siempre que el método se calibre de  
15 forma correspondiente.

[0039] Una preparación aún más conveniente consiste en utilizar diversos sustratos preparados a medida en un único ensayo de multiresistencia. Se pueden suministrar sustratos con, por ejemplo, diferentes tipos de bloqueo estérico para hacer frente al ataque de las betalactamasas, tal y como están presentes en los diferentes antibióticos. Se pueden sacar conclusiones a partir del patrón y  
20 velocidad de degradación, como por ejemplo el tipo de betalactamasas y la eficacia de diferentes tipos de antibióticos. Utilizando sustratos adecuados y eligiendo las concentraciones correctas se puede determinar la eficacia de las betalactamasas. Un ejemplo sencillo de la degradación simultánea de dos sustratos (la ampicilina y su sal sódica) se muestra en la figura 1, si bien en este caso no se utilizaron sustratos preparados a medida con diferentes resistencias a la degradación.

25 [0040] La medición de la resistencia microbiana puede utilizarse también para microbios obtenidos en forma pura de la sangre o de hemocultivos, tal y como se explica en DE 10 2009 033 368 A1 (T. Maier; WO 2011/006911 A3), por ejemplo.

[0041] En lugar de una ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) en un espectrómetro de masas MALDI con analizador de tiempo de vuelo también es posible, por  
30 supuesto, utilizar otros tipos de ionización para analizar la degradación del sustrato, como la ionización por electronebulización (ESI), así como otros tipos de espectrómetros de masas, como los espectrómetros de masas con analizador de tiempo de vuelo e inyección ortogonal de iones (OTOF), los espectrómetros de masas por resonancia ion-ciclotrón (ICR-MS), los espectrómetros de masas electrostáticos de Kingdon o, especialmente, los asequibles espectrómetros de masas con  
35 analizador de trampa de iones. Dado que los expertos están familiarizados con todos estos

5 espectrómetros de masas y los métodos de ionización, prescindiremos aquí de explicaciones detalladas.

[0042] Una opción particularmente adecuada para medir la degradación del sustrato y aumentar el producto de degradación es un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo, que en esencia realiza únicamente una medición comparativa del sustrato y el producto de degradación. El  
10 espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo puede alcanzar una sensibilidad extremadamente elevada, así que este método requiere cantidades muy pequeñas de sustrato.

[0043] Para simplificar la determinación de la resistencia, algunos o todos los materiales requeridos se pueden suministrar en envases estériles de material fungible (lotes). En concreto, es posible que los envases de material fungible contengan cantidades exactas de sustratos preparados a  
15 medida y, si fuera necesario, también las matrices correspondientes. También pueden contener soportes de muestras desechables para espectrometría de masas MALDI. Estos envases de material fungible pueden producirse para su comercialización.

[0044] Los espectros de masa pueden evaluarse de forma visual, pero también mediante programas informáticos adecuados. En particular es posible crear y utilizar programas para la evaluación de  
20 ensayos de multirresistencia. Estos programas pueden determinar de forma inmediata el tipo y la intensidad de la resistencia microbiana por betalactamasas a partir del patrón de degradación y proporcionar los tratamientos recomendados.

5

## REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de resistencia a antibióticos betalactámicos de microbios basada en la síntesis microbiana de betalactamasas, en el cual se añaden los microbios a un sustrato y se mide la degradación enzimática del sustrato causada por las betalactamasas de los microbios mediante espectrometría de masas, obteniendo así un espectro de masa del sustrato restante y del producto de degradación.
2. Método según la reivindicación 1, en el cual las moléculas del sustrato contienen un anillo betalactámico.
3. Método según la reivindicación 2, en el cual el sustrato es un antibiótico betalactámico o un derivado betalactámico.
4. Método según la reivindicación 1, en el cual el sustrato tiene una masa molecular de entre 700 y 1200 unidades de masa atómica.
5. Método según la reivindicación 1, en el cual el sustrato tiene un efecto antibiótico débil.
6. Método según la reivindicación 1, en el cual las moléculas del sustrato contienen un grupo enlazante que puede utilizarse para extraerlas de disoluciones.
7. Método según la reivindicación 6, en el cual el grupo enlazante es una biotina o un marcador de hexahistidina.
8. Método según la reivindicación 1, en el cual la degradación de varios tipos de sustrato se mide de forma simultánea.
9. Método según la reivindicación 8, en el cual los diferentes tipos de sustrato se preparan a medida para que sus patrones de degradación permitan la identificación de diferentes clases de betalactamasas.
10. Método según la reivindicación 9, en el cual los diferentes sustratos en torno al anillo betalactámico imitan las formas estéricas de diferentes antibióticos.
11. Método según la reivindicación 1, en el cual se miden las velocidades de degradación de los sustratos.

- 5 12. Método según la reivindicación 1, en el cual los microbios se han obtenido a partir de la sangre o de un hemocultivo.
13. Método según la reivindicación 1, donde se miden las cantidades de sustrato restante y su producto de degradación mediante espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz.
- 10 14. Método para la determinación de una resistencia a antibióticos betalactámicos de microbios basado en la síntesis microbiana de betalactamasas, que comprende los siguientes pasos:
- (a) Añadir los microbios a la disolución de al menos un sustrato que pueda ser degradado por las betalactamasas.
- (b) Incubar la disolución a una temperatura especificada durante un tiempo especificado.
- 15 (c) Separar la disolución con el sustrato restante y su producto de degradación de los microbios.
- (d) Obtener un espectro de masa de la disolución.

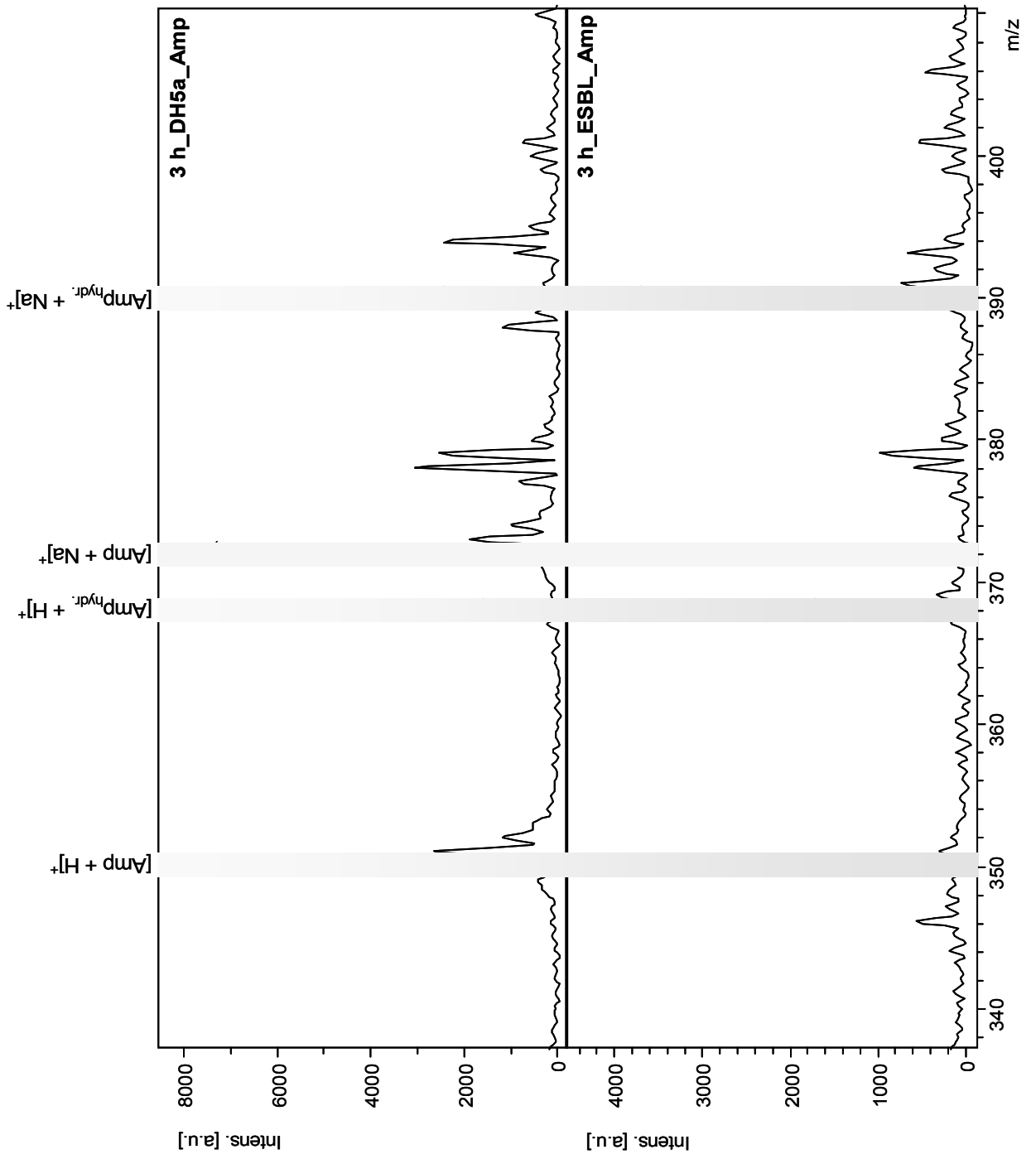


Figura 1