

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 873**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013 E 13002699 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2806275**

54 Título: **Determinación de resistencia con espectrometría de masas mediante la medición de la proliferación microbiana**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SPARBIER, KATRIN y
LANGE, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 545 873 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

Determinación de resistencia con espectrometría de masas mediante la medición de la proliferación microbiana

- 5 La invención se refiere a un proceso de espectrometría de masas para la determinación de las resistencias microbianas frente a antibióticos.

Definiciones

- 10 En este documento se utiliza, en lugar de la «unidad de masa atómica unificada» (u) establecida legalmente, la unidad «dalton» (Da), que en la última (octava) edición de 2006 del documento «The International System of Units (SI)» del Bureau International des Poids et Mesures se equiparó a la unidad de masa atómica; en particular, tal y como allí se apuntó, para poder utilizar las unidades kilodalton, milidalton y similares.

- 15 Por razones de simplificación en este documento solo se empleará el término «proteína», aunque en el intervalo de masas de 3.000 a 15.000 dalton con frecuencia sería preferible referirse a las «proteínas» como «péptidos». La transición de los péptidos más ligeros a las proteínas más pesadas es difusa y no se ha definido de forma inequívoca.

- 20 Como abreviatura de «microorganismos» se utiliza aquí con frecuencia el término «microbios». Bajo el término singular «microbio» se entiende, tal y como es habitual en el uso general del lenguaje, tanto una célula microbiana por separado como la especie microbiana. Bajo el término plural «microbios» se entienden las células microbianas objeto de análisis.

Estado de la técnica

- Muchas especies de microorganismos, en particular las bacterias y hongos unicelulares como las levaduras, se pueden identificar actualmente mediante espectrometría de masas de forma rápida y con tasas de error muy bajas. Según el proceso habitual, la identificación se realiza mediante el cálculo de los índices de similitud entre un espectro de masas de los microbios sometidos a lisis celular, en particular de sus proteínas solubles, y similares espectros de masas de referencia de microorganismos conocidos. Si los índices de similitud superan determinados valores límite, se pueden identificar familia, género, especie o incluso cepa. Este método de identificación de microorganismos, muy rápido y con costes reducidos, ha tenido un extraordinario éxito tanto en estudios de gran envergadura como en la aplicación diaria en numerosos laboratorios de microbiología. Según el aparato se pueden determinar de 48 a 384 muestras microbianas de forma simultánea; la identificación tiene lugar tan solo unos minutos tras el final del cultivo de una colonia. El método tiene tasas de error muy reducidas, más reducidas que las tasas de error de los métodos de identificación microbiológica convencionales, incluso más reducida que los análisis de ADN. Existen ya en el mercado espectrómetros de masas, programas de evaluación y bibliotecas con espectros de referencia que están admitidos como productos para el diagnóstico in vitro (DIV) conforme a la ley alemana de productos médicos y otros reglamentos y directrices nacionales o internacionales.

- El término «antibiótico» se refiere, tal y como es habitual en el uso general del lenguaje, tanto a un principio activo farmacológico para el tratamiento de enfermedades infecciosas microbianas como a sustancias desinfectantes. Los éxitos de la penicilina condujeron a la búsqueda y descubrimiento de muchos otros antibióticos. Existen antibióticos de amplio espectro, que son eficaces frente a muchas familias microbianas, y antibióticos de espectro reducido, que actúan de forma selectiva contra especies microbianas concretas.

- Desde que la penicilina se aplicó como primer principio activo farmacológico las cepas microbianas han desarrollado con frecuencia creciente diferentes resistencias frente a diferentes tipos de antibióticos o las han adquirido de otros microbios, obteniendo así propiedades que les permiten atenuar o neutralizar por completo el efecto de los principios activos antibióticos. Desafortunadamente, las resistencias son ya frecuentes; actualmente la mayoría de los microbios que aparecen en los hospitales son resistentes. En algunos casos puede preverse la resistencia de un microbio transmitido en el hospital frente a los antibióticos habituales en el hospital; pero esto no rige en el caso de las infecciones adquiridas fuera del hospital.

- El éxito del tratamiento de las infecciones microbianas, que en situaciones agudas como en una sepsis o una infección secundaria a una enfermedad (o infección) primaria ya existente con frecuencia suponen una amenaza para la vida, depende con frecuencia de la eficacia de la primera administración de un antibiótico. Una administración dirigida no solo requiere una identificación del microorganismo patógeno lo más rápida y correcta posible, sino también una determinación lo más rápida posible de su resistencia frente a los diferentes antibióticos. La determinación clásica de la resistencia consiste en un cultivo con un antibiótico, pero por desgracia lleva mucho tiempo: dura de 24 a 48 horas.

- Aparte del cultivo con antibióticos existen también métodos genéticos para determinar las resistencias. En ellos la determinación de una resistencia se realiza mediante la comprobación de los genes de resistencia conocidos en el genoma del microorganismo patógeno correspondiente. Una ventaja del método genético es que los genes de

resistencia pueden reproducirse mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), de forma que la duración del análisis ya no está determinada por la tasa de proliferación de las bacterias. Las desventajas consisten en que estos métodos tienen costes más elevados que los métodos de rutina y no permiten la realización de pruebas funcionales. Así, puede haber un gen de resistencia que no esté expresado, de forma que la cepa bacteriana objeto de análisis no sea resistente, pero el proceso la identifica como resistente.

En la patente DE 10 2006 021 493 B4 (V. M. Govorun y J. Franzen, 2006, correspondiente a GB 2438066 B, US 8,293,496 B2; de aquí en adelante denominada «Govorun») se presentan métodos de espectrometría de masas para la determinación de la resistencia microbiana.

En una versión se miden mediante espectrometría de masas, por ejemplo, los perfiles proteínicos de los microbios tras el cultivo en medios con y sin adición de antibióticos y se comparan. Para ello los microbios se cultivan, por ejemplo, en tubos de centrifugadora con y sin antibióticos. Tras el cultivo los microbios se centrifugan, se lavan y a continuación se someten a lisis con ácidos y acetonitrilo en los tubos de centrifugadora para que liberen sus proteínas solubles. Una mínima cantidad (aprox. 1 µl) de este líquido de lisis se prepara en el soporte de muestras, se seca y a continuación se cubre con una pequeña cantidad de solución matriz (también aprox. 1 µl). Las proteínas liberadas se incorporan a los cristales que se forman al secar la matriz. Las muestras con cristales de matriz y proteínas incorporadas se someten a pulsos de luz de láser en el espectrómetro de masas, de manera que los iones de las moléculas de las proteínas forman un plasma de evaporación. La medición de su tiempo de vuelo en un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo da como resultado el espectro de masas del microbio, que consiste principalmente en picos de proteínas.

Pero a partir de la similitud de ambos espectros de masas no se puede concluir con certeza la resistencia del microbio. Si se inhibe la proliferación de los microbios susceptibles o se los elimina sin descomponerlos, por ejemplo bacterias del género *Klebsiella* de la familia de las enterobacterias, el resultado es un espectro de masas casi idéntico al de los microbios en medios sin antibiótico. El motivo es que la formación de los espectros de masas, que se obtienen con una ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), solo depende mínimamente de la cantidad de microbios de la muestra. Las preparaciones de muestras con diez mil microbios proporcionan prácticamente los mismos espectros de masas que las preparaciones con diez millones de microbios, lo cual es ideal para una identificación, pero no para la detección de la resistencia. Si únicamente se detiene la proliferación de los microbios se obtienen los mismos espectros de masas, ya que solo existe una diferencia cuantitativa que no es visible en los espectros de masas.

Tal y como se detalla en la patente Govorun, la resistencia también se puede detectar mediante la adición a los microbios objeto de análisis de un segundo tipo de microbios que proporcione un espectro de masas muy diferente, que sea resistente y que en todo caso continúe proliferando en presencia del antibiótico. El espectro de masas con las proteínas superpuestas de ambos microbios debería mostrar luego las diferencias en la proliferación. Por desgracia este método se ha revelado como no realizable en la práctica por diversos motivos: requiere al menos unos requisitos generales sobre la cantidad de microbios utilizados, velocidades de proliferación aproximadamente iguales en el medio de cultivo empleado y resistencia de los microbios de referencia frente a numerosos antibióticos.

Es preferible que haya una cantidad suficiente de los microbios cuya resistencia debe determinarse en una forma suficientemente pura. Por ejemplo, pueden formar colonias en agar o presentarse como microbios de un hemocultivo. En los cultivos en agar es habitual no utilizar únicamente los microbios de una colonia para la prueba, sino someter a esta prueba al mismo tiempo los microbios de al menos cinco colonias, para poder detectar en su caso también la presencia de un microbio resistente entre microbios no resistentes de la misma especie. Un especialista formado y experimentado puede en general identificar colonias de microbios de la misma especie y agruparlas. Después se deben mezclar y dividir para los cultivos. En el caso de los microbios de hemocultivos aparece naturalmente una mezcla de los diferentes microbios que se han transmitido en la infección.

La determinación de una resistencia (también conforme a Govorun) parte en general de la identificación de los microbios que han crecido en el cultivo en agar o en el hemocultivo. Por este motivo resulta útil, en particular para el método conforme a Govorun, conocer la especie microbiana y su velocidad de proliferación. También es habitual conocer los antibióticos frente a los que pueden mostrar resistencia estos microbios. Además generalmente se conocen también las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para microbios susceptibles. De esta forma pueden utilizarse cultivos con estos antibióticos en las concentraciones apropiadas; a partir de las velocidades de proliferación conocidas se estiman los tiempos de cultivo mínimos para el método de Govorun.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es proporcionar un método de espectrometría de masas con el que se puede determinar la resistencia microbiana frente a uno o varios antibióticos de forma segura, económica, en gran medida automatizable y sobre todo rápida, a ser posible en solo una hora, en particular para los microbios de rápida proliferación y por ello especialmente peligrosos. En la medida de lo posible el método debe poder realizarse con los mismos espectrómetros de masas habituales que se utilizan para las identificaciones microbianas mediante espectrometría de masas.

Breve descripción de la invención

La invención presenta un método para la determinación de la resistencia microbiana mediante espectrometría de masas en el que los microbios son cultivados en un medio con un antibiótico y se obtiene un espectro de masas EM_{cum} de los microbios tras su cultivo. El método de la invención se caracteriza por que la proliferación microbiana que, en su caso, tiene lugar durante el cultivo se determina con ayuda de una sustancia de referencia añadida de forma dosificada y medida en el espectro de masas EM_{cum} , de forma que una proliferación microbiana indica resistencia frente al antibiótico. Se puede constatar una proliferación microbiana averiguando mediante espectrometría de masas la cantidad de microbios tras el cultivo y comparándola con una cantidad de microbios averiguada de forma correspondiente antes del cultivo y/o con una cantidad de microbios averiguada de forma correspondiente tras un cultivo sin el antibiótico.

Una primera versión preferida consiste en averiguar la cantidad de microbios tras el cultivo a partir del espectro de masas EM_{cum} e identificar los microbios como resistentes cuando la cantidad de microbios sea superior a un valor límite fijado. Para ello resulta beneficioso que se estandarice la cantidad de microbios al principio del cultivo.

Una segunda versión preferida consiste en un cultivo adicional de los microbios en el medio sin el antibiótico y la obtención de un espectro de masas EM_{sine} de los microbios tras el cultivo sin el antibiótico, en el que se mide también la sustancia de referencia añadida de forma dosificada y se identifican los microbios como resistentes cuando la diferencia relativa o absoluta entre las cantidades de microbios resultantes de los espectros de masas EM_{cum} y EM_{sine} es menor que un valor límite fijado.

Una tercera versión preferida consiste en la obtención adicional antes del cultivo de un espectro de masas EM_0 de los microbios en el que se mide también la sustancia de referencia añadida de forma dosificada y se identifican los microbios como resistentes cuando la cantidad de microbios obtenida en el espectro de masas EM_{cum} es considerablemente mayor que la obtenida en el espectro de masas EM_0 . En esta versión se pueden además añadir los microbios al medio, que a continuación se divide en dos cultivos (a ser posible del mismo tamaño) que se utilizan para el cultivo con el antibiótico o para la obtención del espectro de masas EM_0 . Por otro lado también se puede extraer una parte del medio después de o inmediatamente tras la adición del antibiótico y emplearse para la obtención del espectro de masas EM_0 .

Los criterios de decisión aplicados en las tres versiones también se pueden combinar, si procede, mediante operaciones lógicas, como p. ej. una conjunción o una disyunción inclusiva.

El concepto «espectro de masas» comprende desde los datos brutos de la espectrometría de masas hasta una lista de picos procesada en la que solo se incluyen las posiciones e intensidades de las señales de masa. De esta forma un espectro de masas puede consistir en una multitud de valores de intensidad en un intervalo de masas continuo así como en valores de intensidad en varios intervalos de masas aislados. Antes de averiguar la cantidad de microbios el espectro de masas se puede someter a un procesamiento de las señales, que por ejemplo comprenda una corrección (sustracción) de los valores de referencia, un alisado de las señales de masa, una eliminación de las señales de ruido y/o una selección de las señales de masa por encima de un valor de ruido predeterminado.

La cantidad de microbios o una medida de ella pueden averiguarse a partir de un espectro de masas de diferentes tipos, por ejemplo mediante los cocientes de la intensidad de una señal microbiana y la intensidad de una señal de referencia o la suma de las intensidades de varias señales de referencia, el cociente de la suma de las intensidades de varias señales microbianas y la intensidad de una señal de referencia o la suma de las intensidades de varias señales de referencia, o bien el cociente de la suma de las intensidades de todas las señales de una parte del o de todo el espectro de masas y la intensidad de una señal de referencia o la suma de las intensidades de varias señales de referencia. Antes de la suma se pueden seleccionar las señales microbianas de una lista de picos o de un espectro de masas continuo, por ejemplo aquellas con una gran frecuencia en las mediciones de repetición o aquellas con elevada intensidad de señal. Junto con las listas de picos se pueden también utilizar los datos brutos de la espectrometría de masas (incluso sin un eje de masa calibrado, cuando las posiciones de las sustancias de referencia se conocen) para identificar la cantidad de microbios, por ejemplo sumando todos los valores de intensidad en un área de datos brutos seleccionada y dividiéndolo por la suma de los valores de intensidad en un área con una señal de referencia, realizando en su caso previamente una corrección de los valores de referencia.

Los microbios pueden cultivarse en el medio con la adición de un único antibiótico, pero también con la adición de una mezcla de diferentes antibióticos. Para determinar o al menos estimar la intensidad de la resistencia se pueden cultivar los microbios de forma simultánea en varios cultivos, cada uno de ellos con una concentración diferente de un antibiótico, de forma que para cada cultivo se obtiene un espectro de masas $EM_{cum,i}$ de los microbios y de la sustancia de referencia añadida de forma dosificada. Para el análisis de la resistencia frente a varios antibióticos se pueden realizar simultáneamente varios cultivos con varios antibióticos, en caso necesario incluso con diferentes niveles de concentración de los antibióticos, de forma que de nuevo se obtenga para cada cultivo un espectro de masas $EM_{cum,i}$ de los microbios y de la sustancia de referencia añadida de forma dosificada.

La sustancia de referencia puede añadirse al medio de forma dosificada antes, durante o después del cultivo, durante la preparación de una muestra para la espectrometría de masas o durante la obtención del espectro de masas. La sustancia de referencia se puede añadir de forma dosificada después de la lisis celular de los microbios. Si se añade al medio la sustancia de referencia, esta no puede ser captada o descompuesta por los microbios; si se añade después de la lisis celular esa condición básicamente desaparece. Si los espectros de masas se obtienen mediante la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), es preferible no añadir la sustancia de referencia hasta la preparación de las muestras para MALDI en un soporte de muestras, a ser posible junto con la solución matriz.

También se puede añadir de forma dosificada una mezcla de sustancias de referencia. Para ello es beneficioso cubrir en la mezcla un intervalo más amplio de concentraciones con las sustancias de referencia, y así se pueden utilizar, por ejemplo, tres sustancias de referencia en proporciones de 100:10:1 o 25:5:1. Una sustancia de referencia debe ser apropiada para la ionización y si es posible proporcionar varias señales de referencia identificables en los correspondientes espectros de masas. Por este motivo es preferible que la afinidad protónica de la sustancia de referencia sea superior a la afinidad protónica de la mayoría de las proteínas microbianas. Las sustancias de referencia preferidas son las ribonucleasas o las lisozimas. Es preferible que la masa de las sustancias de referencia se sitúe entre 10 y 20 kilodalton, en especial entre 14 y 15 kilodalton.

A ser posible los microbios objeto de análisis deben presentarse en una forma suficientemente pura. Por ejemplo, pueden formar colonias en agar, pero también pueden obtenerse de un hemocultivo. También es posible analizar con el método de la invención los microbios de una muestra objeto de análisis, p. ej. de un frotis nasal, directamente o después de una proliferación previa en un medio líquido. Para la realización del método de la invención en principio no es necesario que la cantidad de microbios sea apreciable a simple vista antes o después de un cultivo, es decir, que antes del cultivo son suficientes dado el caso menos de 10^5 células microbianas, incluso menos de 10^4 , realizándose los cultivos preferentemente con volúmenes de entre 1 μ l y 1 ml, en especial de 100 μ l. Una reducida cantidad inicial de células microbianas en una muestra objeto de análisis y un breve tiempo de cultivo pueden requerir una concentración de las proteínas de los microbios antes o durante la preparación de una muestra para la espectrometría de masas. La concentración se puede conseguir, por ejemplo, mediante la precipitación de las proteínas tras una lisis celular de los microbios con la consiguiente separación de las proteínas, p. ej. mediante centrifugado, o con ayuda de superficies modificadas para la fijación proteínica, como pueden observarse en microesferas (magnéticas), en soportes de muestras para MALDI o en la superficie del material de relleno de las puntas de pipeta. Las microesferas aisladas y cargadas con proteínas también pueden utilizarse directamente sobre un soporte de muestras para MALDI.

El método de la invención puede utilizarse para la determinación de la resistencia de bacterias, así como para la determinación de la resistencia de hongos unicelulares como levaduras frente a un antimicótico y frente a una mezcla de antimicóticos. Otra versión del método de la invención consiste en la identificación taxonómica de los microbios antes de la determinación de la resistencia y la selección de la sustancia de referencia, los valores límites para la determinación de la resistencia, el medio y/o las condiciones de cultivo, en particular el tiempo de cultivo, a partir de la clasificación taxonómica.

Una de las versiones de la invención se parece al método de Govorun, pero su objetivo es la medición de la proliferación microbiana, especialmente a través de los incrementos de proteínas. Para poder determinar cuantitativamente el incremento de microbios en los medios con antibióticos con ayuda de sus espectros de masas se añaden al cultivo o a la lisis celular una o varias sustancias de referencia apropiadas y adecuadamente dosificadas. Así se determina el incremento de la biomasa, y con ello más concretamente de las proteínas, en los medios con antibióticos con ayuda de las sustancias de referencia. Se puede realizar una comparación con la proliferación microbiana en los medios sin antibióticos, pero también una comparación con las cantidades de microbios sin realizar otro cultivo. Un incremento de la biomasa en la medida esperada muestra la resistencia de los microbios analizados frente al antibiótico en la concentración utilizada; los microbios susceptibles no muestran ninguna proliferación mensurable si la concentración del antibiótico se sitúa por encima de la concentración mínima inhibidora (CMI).

El método ha demostrado ser muy rápido: Dado que solo es necesario que se dupliquen dos generaciones para que la biomasa aumente cuatro veces más, se puede comprobar la resistencia para infecciones peligrosas, que en general se basan en microbios de rápida proliferación con un tiempo de duplicación de 20 minutos, ya tras un tiempo de cultivo de 40 minutos; para microbios de proliferación más lenta son necesarios periodos más prolongados. El tiempo de cultivo necesario se puede determinar si se conoce la especie microbiana y, con ello, su tiempo de duplicación.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un ejemplo de un organigrama de un método preferido para la identificación de un microbio y para la determinación de su resistencia según esta invención.

La figura 2 proporciona cuatro espectros de masas de dos cepas de una especie bacteriana del género *Klebsiella*:

Los dos espectros de masas de la parte superior proceden de la cepa 1 («cepa 1»), que es susceptible, así que en el cultivo con adición del antibiótico («Ab») no se produce ninguna proliferación. En el segundo espectro («cepa 1 + Ab») empezando desde el el margen superior prácticamente solo se ven los picos de masa de la sustancia de referencia (ribonucleasa A), en el margen derecho con carga simple y un poco a la izquierda del centro con carga doble. Los dos espectros de masas de la parte inferior corresponden a la cepa 5, que es resistente, así que a pesar de la adición del antibiótico («cepa 5 + Ab») la proliferación permanece inalterada (espectro del extremo inferior). Todos los espectros de masas se realizaron tras un cultivo de una duración de tan solo una hora.

La figura 3 muestra una evaluación de los espectros de masas de cinco cepas de Klebsiella, en cada caso sin y con antibiótico. Las cepas 1 y 2 son susceptibles, por eso con el antibiótico no se produce proliferación. Las cepas 3 y 5 son resistentes, así que la proliferación es igual sin y con antibiótico. Para la cepa 4 se puede concluir que o bien presenta una resistencia intermedia o bien solo una parte de las colonias recogidas es resistente, de forma que la cantidad inicial de microbios resistentes era más reducida. Los recuadros detallan las dispersiones medias en las mediciones repetidas.

15 Ejemplos de versiones preferidas

La invención propone un método preferido para la determinación mediante espectrometría de masas de la resistencia microbiana mediante la comparación de los espectros de masas de los microbios tras su cultivo en varios medios similares con y sin adición de antibióticos, el cual se caracteriza por que la proliferación microbiana durante el cultivo se determina con ayuda de al menos la adición de una sustancia de referencia, de forma que una proliferación microbiana en un medio con antibiótico indica resistencia frente a este antibiótico en la concentración indicada. Los microbios pueden cultivarse también de forma simultánea en varios medios con diferentes antibióticos.

La sustancia de referencia puede añadirse de forma dosificada al medio de cultivo, pero de tal manera que sea captada por los microbios siempre en la misma cantidad y que no sea descompuesta, para que tras la proliferación y lisis celular sea visible en la preparación. Dado que esta condición es difícil de cumplir, es preferible que la sustancia de referencia no se añada hasta después del cultivo, por ejemplo después de la lisis celular o, en caso de una ionización por desorción láser asistida por matriz, después de la preparación de la muestra en el soporte de muestras.

Para establecer la intensidad de la resistencia, o para determinar si los microbios de todas las colonias recogidas son o no resistentes en la misma medida, los microbios pueden cultivarse en medios con antibióticos con diferentes niveles de concentración. Si solo una parte de las colonias recogidas es resistente, para lo que aquí se empleará la denominación «resistencia mixta», entonces para todos los niveles de concentración se observa una proliferación menor en la misma proporción que se da en el cultivo sin antibiótico, porque se ha iniciado la proliferación con una cantidad más reducida de microbios resistentes. No obstante, este caso es relativamente infrecuente. Por el contrario, en caso de resistencia intermedia no se observa proliferación alguna con elevadas concentraciones del antibiótico, pero con una concentración más reducida se observa una proliferación total. De todas formas también cabe la posibilidad de no mezclar los microbios de las colonias, sino realizar esta prueba por separado para los microbios de cada colonia.

Para la identificación se cultivan los microbios, según la práctica seguida hasta el momento, en un agar o en un hemocultivo, en general durante la noche. En los cultivos en agar hay en general varias colonias, de las cuales una se cultiva para su identificación. Para la determinación de la resistencia es práctica habitual someter a esta prueba simultáneamente los microbios de al menos otras cinco colonias para poder detectar en su caso también la presencia de una colonia microbiana resistente entre colonias microbianas no resistentes de la misma especie (resistencia mixta). Un especialista formado y experimentado puede en general identificar colonias de microbios de la misma especie y agruparlas. Es preferible que a continuación se mezclen los microbios de estas colonias y se dividan en los diferentes cultivos, pero en casos especiales pueden someterse a la prueba de determinación de resistencia por separado, por ejemplo cuando no se pueda determinar con seguridad si las colonias pertenecen a la misma especie microbiana. En el caso de los microbios de hemocultivos aparece naturalmente una mezcla de los diferentes microbios que se han transmitido en la infección. El hemocultivo finaliza generalmente, como bien sabe el especialista, en un sedimento de centrifugación que contiene suficientes microbios para la identificación y también para la determinación de la resistencia.

Una de las versiones de la invención se parece al método de Govorun en el que se comparan los espectros de masas de los microbios en cultivos con y sin adición de antibióticos, pero está dirigido a la medición de la proliferación microbiana, que no se menciona en Govorun. Para poder determinar cuantitativamente la proliferación microbiana en los medios con antibióticos con ayuda de sus espectros de masas se añaden una o varias sustancias de referencia apropiadas y dosificadas con exactitud, a ser posible tras la lisis celular. Así se determina cuantitativamente el incremento de la biomasa, y con ello también y especialmente el consiguiente incremento de las proteínas, en los medios con antibióticos con ayuda de las sustancias de referencia. En particular se puede realizar una comparación con la proliferación microbiana en los medios sin antibióticos, pero también una comparación con las cantidades de los microbios utilizados sin realizar otro cultivo. Un incremento de la biomasa en la medida esperada muestra la resistencia de los microbios analizados frente al antibiótico en la concentración utilizada; los microbios susceptibles no muestran ninguna proliferación si la concentración del antibiótico se sitúa por encima de la

concentración mínima inhibidora (CMI).

Para la identificación se utilizan principalmente espectrómetros de masas con analizador de tiempo de vuelo con una ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI). Durante décadas se ha afirmado que el método MALDI no era adecuado para los análisis cuantitativos. Pero a la larga se ha comprobado que esta afirmación no es cierta, sino que solo era aplicable a los imprecisos métodos utilizados en épocas anteriores para la preparación de muestras en el correspondiente soporte. Se puede demostrar que, por ejemplo, es posible determinar cuantitativamente una sustancia con MALDI en una preparación en capa fina óptima y uniforme y con la adición de sustancias de referencia en dosis igualmente exactas con una precisión del 2 %. Esta precisión excede ampliamente la aquí requerida; el esfuerzo precisado para ello también complicaría de forma innecesaria el método de rutina. Pero una precisión cuantitativa de aprox. el 20 % se puede conseguir también en el laboratorio de rutina sin grandes complicaciones. Dado que en la proliferación microbiana la cantidad de microbios se multiplica por dos en cada periodo de duplicación, y por cuatro en dos periodos de duplicación, MALDI puede cumplir fácilmente esta tarea de medición de la proliferación microbiana incluso cuando en presencia del antibiótico debería tener lugar una proliferación más lenta o cuando no todas las colonias microbianas recogidas son resistentes.

Por este motivo en la invención se recomienda añadir antes de la medición de los espectros de masas de los microbios una o varias sustancias apropiadas como referencias cuantitativas en cantidades (o concentraciones) adecuadas y conocidas con exactitud, para lo cual aquí se emplea el término «dosificado». Las sustancias de referencia pueden añadirse ya al medio de cultivo; pero es preciso que la sustancia de referencia sea captada por los microbios a ser posible siempre en la misma cantidad y no sea descompuesta por hidrólisis. Por este motivo es preferible no añadir de forma dosificada las sustancias de referencia hasta después de la eliminación de los microbios, y añadir las o bien a las proteínas en el líquido de lisis microbiana en el tubo de centrifugación o a la solución matriz aplicada sobre las proteínas secas en el soporte de muestras para MALDI. Estas sustancias de referencia permiten calcular cuantitativamente y de forma comparativa la proliferación microbiana con y sin adición de antibióticos y a partir de ello determinar la resistencia o susceptibilidad. La precisión en cuanto a las cantidades y concentraciones utilizadas debería situarse a ser posible alrededor del 10 % para lograr una precisión global del método de alrededor del 20 %. Las sustancias de referencia deben poseer una elevada afinidad protónica para que puedan ionizarse bien y para que las proteínas de los microbios no puedan reprimir su ionización, y siempre que sea posible deben proporcionar varios picos de fácil detección en los espectros de masas. Resulta beneficioso que las sustancias de referencia cubran un intervalo más amplio de cantidades, así se pueden utilizar, por ejemplo, tres sustancias de referencia en proporciones de 100:10:1 o 25:5:1. Se ha comprobado que es beneficioso que la sustancia de referencia con la concentración más elevada produzca en el espectro de masas señales de referencia de aproximadamente la misma altura (intensidad), como lo hacen las señales microbianas más elevadas (generalmente señales de proteínas) tras una proliferación total e inalterada.

Como ejemplo de una sustancia de uso favorable se presenta aquí la ribonucleasa A. Posee una masa molecular de 13.638 dalton; su elevada afinidad protónica provoca que en el espectro de MALDI aparezcan iones de ribonucleasa A con carga simple, doble e incluso triple. Los iones de RNasa A con carga simple aparecen en un área del espectro de masas en el que habitualmente se reconocen fácilmente sin perturbaciones de otros picos.

Aquí se presentan también como sustancias adecuadas otros tipos de ribonucleasas. Pero también se pueden utilizar aquí otras clases de sustancias con elevada afinidad protónica, por ejemplo las lisozimas. Así pues, la lisozima C posee una masa molecular de 14,3 kilodalton y ofrece igualmente un pico en un área poco ocupada del espectro de masas.

El método ha demostrado ser sorprendentemente rápido: Las infecciones peligrosas se deben en general a microbios de rápida proliferación con un tiempo de duplicación de tan solo unos 20 minutos. Dado que solo es necesario que se dupliquen dos generaciones para multiplicar por cuatro la biomasa, para estos microbios de rápida proliferación se puede comprobar la resistencia ya tras un tiempo de cultivo de 40 minutos; para microbios de proliferación más lenta, con un periodo de duplicación de 30 minutos, es necesaria una hora. Si se añaden otros 20 minutos para el procesamiento de los microbios, la preparación para la ionización MALDI y la obtención de los espectros de masas, se puede determinar la resistencia entre 60 y 90 minutos tras su identificación. En este contexto supone una ventaja que los microbios se hayan identificado antes de la determinación de la resistencia: De esta forma se puede establecer de forma óptima el tiempo de cultivo necesario gracias al conocimiento de la especie microbiana y su tiempo de duplicación.

Además el método ofrece posibilidades de control frente a errores durante la recogida de los microbios o la preparación de las muestras: Los espectros de masas de los microbios obtenidos tras su cultivo pueden someterse de nuevo a la rutina de identificación de microbios y así confirmar que la clasificación es correcta. Dado que este método de identificación lleva mucho tiempo, se puede acelerar determinando sencillamente las similitudes entre los espectros de masas tras el cultivo y el espectro de masas que se utilizó para la identificación. Los índices de similitud proporcionan información sobre si los espectros de masas son adecuados para la determinación de la resistencia.

Entre la resistencia total de los microbios y la susceptibilidad total hay niveles intermedios, en los que la proliferación

está mermada pero no inhibida por completo. Para determinar o al menos estimar la intensidad de la resistencia microbiana se pueden medir las concentraciones inhibitoras reales de los antibióticos. Los valores de CMI (concentraciones mínimas inhibitoras para microbios totalmente susceptibles) de los antibióticos son ampliamente conocidos; no obstante, las concentraciones inhibitoras reales aumentan con la intensidad de la resistencia. Para la medición de las concentraciones inhibitoras reales se pueden utilizar cultivos con adición de un antibiótico en diferentes niveles de concentración, que por ejemplo pueden corresponder a la concentración 1 x CMI, 10 x CMI y 100 x CMI de los valores de CMI conocidos. La experiencia ha puesto de manifiesto que con el método detallado arriba solo se puede determinar la inhibición de la proliferación microbiana con una concentración de 1 x CMI cuando los microbios son completamente susceptibles. En caso de una resistencia débil se inhiben a partir de una concentración de 10 x CMI; mientras que para una resistencia muy intensa se puede observar proliferación incluso con una concentración de 100 x CMI. El efecto se puede detectar en los valores de la proliferación microbiana. Así pues, para resistencias intermedias se observa una proliferación diferente con diferentes concentraciones de antibiótico.

15 Pero también puede darse el caso de que de las colonias recogidas solo una parte, por ejemplo la mitad, sea resistente y la otra sea susceptible. En este caso hablamos de una «resistencia mixta». Se observa entonces incluso con una resistencia intensa una proliferación aparentemente menor, pero solo porque en el cultivo había una cantidad inicial más reducida de microbios resistentes. Si se realiza aquí la prueba con diferentes concentraciones del antibiótico, con todas las concentraciones se observa una reducción de la cantidad de proteínas en la misma proporción que en el cultivo sin antibiótico.

En caso de que no se realice el método con diferentes niveles de concentración, se ha comprobado que una concentración de 10 x CMI es especialmente adecuada.

25 Para la evaluación de la resistencia frente a varios antibióticos se pueden utilizar varios cultivos con varios antibióticos, en caso necesario incluso con diferentes niveles de concentración de cada uno de los antibióticos. El tiempo adicional necesario para la preparación de los microbios de varios cultivos apenas tiene importancia frente al tiempo del cultivo.

30 Para una prueba rápida de microbios multiresistentes (ejemplo: SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) los medios pueden proveerse también con una mezcla de varios tipos de antibióticos. Si los microbios proliferan en esta mezcla significa que son multiresistentes. En esta prueba rápida es posible que una muestra objeto de análisis, como p. ej. el frotis nasal, presente una mezcla microbiana y se pueda prescindir de una identificación previa de los microbios en la muestra. Se puede realizar una identificación de los microbios que han proliferado en el medio con antibiótico, y con ello probado su resistencia, por medio del espectro de masas obtenido.

35 En un método preferido se suman las intensidades de todos los picos de masas en una sección seleccionada del espectro, por ejemplo de 4.000 a 10.000 dalton, y se dividen por la intensidad del pico de los iones de referencia con carga simple: el resultado es un cociente c . Se puede perfeccionar la rutina para la determinación de la resistencia de tal forma que los valores de este cociente c por debajo de 200 arrojen picos susceptibles sin proliferación (muchos de los picos que aparecen aquí son ruido); mientras que los valores del cociente c por encima de 200 muestran resistencia. Se recomienda un método de evaluación que produzca respectivamente los cocientes $C = C_{cum}/C_{sine}$ para microbios en medios con (C_{cum}) y sin antibióticos (C_{sine}). Si este cociente se sitúa aproximadamente en 1 ($0,8 < C < 1,3$), existe una resistencia de los microbios; para los microbios susceptibles C se sitúa aproximadamente en 0,25 ($0,1 < C < 0,4$) cuando el tiempo de cultivo asciende a aproximadamente dos periodos de duplicación.

40 Para los laboratorios de rutina con una mayor acumulación de muestras microbianas que deben ser identificadas y cuya resistencia también debe evaluarse merece la pena poder automatizar al menos algunas de las fases del método. Una automatización total de todo el método no es posible actualmente; no obstante, hay ya una serie de aparatos en el mercado o en una fase de desarrollo próxima a la comercialización que permiten realizar de forma automática o semiautomática al menos algunas fases del método. Así pues, existe un aparato que puede cultivar bajo supervisión visual o mediante análisis de imagen colonias microbianas de placas de agar y disponer los microbios en la placa de soporte de muestras para su identificación. Un sencillo desarrollo ulterior de este aparato permitirá también cultivar microbios para la determinación de la resistencia. También son concebibles aparatos para la lisis celular de los microbios en la placa de soporte de muestras y para la preparación con solución matriz. Hay disponibles aparatos para pipetear que pueden efectuar la lisis celular del sedimento de centrifugación en pocillos de microtitulación o series de tubos de centrifugación. El cultivo se puede realizar respectivamente en tubos de centrifugación (por ejemplo tubos Eppendorf) o en placas de filtrado (por ejemplo las placas de filtrado Acroprep de 96 pocillos). En el mercado hay métodos certificados como productos DIV para espectrómetros de masas MALDI que trabajan con soportes de muestras que pueden alojar 48, 96 o 384 muestras.

65 Para una ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) es necesaria o bien una placa de soporte de muestras que disponga de una fina capa de la sustancia matriz ya preparada o bien la elaboración de una solución matriz. Las sustancias matriz distribuidas industrialmente tienen a menudo la desventaja de que es muy difícil disolverlas sin utilizar ultrasonidos. Por este motivo hay disponibles frascos con sustancias matriz purificadas y

5 liofilizadas en dosis precisas en los que la sustancia matriz se disuelve inmediatamente al añadir el disolvente y la solución está lista para usar al momento con la concentración adecuada. En el sentido de esta invención se puede añadir a las sustancias matriz de estos productos al menos una sustancia de referencia dosificada con exactitud para la cuantificación del incremento de proteínas. Se puede dosificar con exactitud en el aparato la solución matriz para la preparación de las muestras para MALDI y disponerla sin tocarla sobre los componentes celulares secos de los microbios, en particular las proteínas. También las placas de soporte de muestras con capas finas de matriz, que ya se comercializan como productos, pueden contener sustancias de referencia en cantidades dosificadas. Las capas finas se disponen a continuación sobre áreas de la muestra pequeñas, bien separadas entre sí, de alrededor de 2 mm de diámetro cada una.

10 El desarrollo de un método preferido para la determinación de resistencias se describe en el organigrama de la figura 1 como ejemplo. El método se representa aquí con un cultivo de los microbios en agar (101). Los microbios de una colonia se cultivan (102), se someten a lisis celular y se procesan para obtener una muestra para MALDI (103). La obtención de un espectro de masas (104) conduce a la identificación del microbio mediante la comparación de su espectro de masas con espectros de referencia (105). La tiempo que transcurre desde el cultivo de una colonia hasta la identificación en un laboratorio de rutina comprende solo de 10 a 30 minutos, en función de la cifra de muestras microbianas que se deban identificar de forma paralela. Para la determinación de la resistencia se pueden cultivar simultáneamente varias colonias más de los mismos microbios (106). Estas se mezclan y se dividen para los diferentes cultivos (107). En el ejemplo de este organigrama se utilizan tres cultivos; un cultivo en un medio sin antibiótico (108) y dos cultivos con los antibióticos Ab1 (109) y Ab2 (110). Por supuesto, se pueden utilizar más cultivos con más antibióticos y, si también se desea determinar la intensidad de la resistencia, cultivos con diferentes concentraciones de los antibióticos. Todos los cultivos se realizan ya con la temperatura óptima para no perturbar los microbios ni provocar ningún retraso por el calentamiento. La duración del cultivo depende del tiempo de duplicación (tiempo de generación) de los microbios, que se averigua mediante la identificación de estos: No es necesario que el cultivo dure más de dos a tres veces el tiempo de duplicación. Para microbios de proliferación rápida son suficientes unos 40 minutos. A continuación los microbios de los diferentes cultivos son procesados mediante la adición de las sustancias de referencia para obtener muestras para MALDI y se obtienen espectros de masas (111). A partir del espectro de masas de los microbios cultivados sin antibiótico se obtiene el cociente C_{sine} , sumando las intensidades de todos los picos del intervalo de masas de, por ejemplo, 4.000 a 10.000 dalton, y dividiéndolo por la intensidad del pico de referencia. A partir de los espectros de masas de los microbios cultivados con el respectivo antibiótico n se obtiene el cociente $C_{cum,n}$ (112). Los cocientes $C_n = C_{cum,n}/C_{sine}$ muestran, tal y como se indica más arriba, la resistencia correspondiente.

35 Hasta el momento los métodos se realizaron con una ionización mediante MALDI en un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo MALDI. MALDI tiene la gran ventaja de que forma mayoritariamente iones moleculares con carga simple. Por ello los espectros de masas, a pesar de los 50 a 100 picos que aparecen en el intervalo de masas preferido de 3.000 a 15.000 dalton, no están sobrecargados y se pueden detectar las similitudes con relativa facilidad. Esto no significa que no se puedan utilizar otros tipos de ionización. Los métodos basados en la nebulización como ESI (ionización por electronebulización) o DESI (ionización directa de superficies de muestras fijas mediante electronebulización) producen iones con cargas múltiples que sobrecargan fácilmente los espectros de masas pero que pueden acoplarse con métodos de separación como la cromatografía de líquidos (HPLC) o la electroforesis capilar (CE), de forma que se pueden obtener de nuevo espectros de masas de estructura sencilla mediante la separación de las sustancias.

45 Pero también existen otros métodos de ionización que producen casi exclusivamente iones con carga simple, por ejemplo la ionización química (IQ). La ionización química se puede aplicar en combinación con métodos de nebulización de elementos neutros, pero también con ablación láser de muestras fijas, y en combinación con un OTOF-MS (espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo e inyección ortogonal de iones). En caso de elevada sensibilidad los espectros de masas así obtenidos ofrecen una resolución de masa máxima (véase por ejemplo J. Franzen y K. Michelmann, DE 10 2005 044 307 B4).

50 Por supuesto, también se pueden utilizar otros tipos de espectrómetros de masas si ofrecen el intervalo preferido de 3.000 a 15.000 dalton para la medición de espectros de masas.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la determinación mediante espectrometría de masas de la resistencia microbiana en el cual los microbios son cultivados en un medio con un antibiótico y se obtiene un espectro de masas EM_{cum} de los microbios tras su cultivo, **caracterizado por que** la proliferación microbiana que, en su caso, tiene lugar durante el cultivo se determina con ayuda de una sustancia de referencia añadida de forma dosificada y medida en el espectro de masas EM_{cum} , de forma que una proliferación microbiana indica resistencia frente al antibiótico.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado por que** la cantidad de microbios tras el cultivo se determina a partir del espectro de masas EM_{cum} y los microbios se identifican como resistentes cuando la cantidad de microbios es superior a un valor límite fijado previamente.
- 15 3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2 **caracterizado por** el cultivo adicional de los microbios en el medio sin el antibiótico y la obtención de un espectro de masas EM_{sine} de los microbios tras su cultivo sin antibiótico, en el que también se mide la sustancia de referencia añadida de forma dosificada y se identifican los microbios como resistentes cuando la diferencia relativa o absoluta entre las cantidades de microbios resultantes de los espectros de masas EM_{cum} y EM_{sine} es menor que un valor límite fijado.
- 20 4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** antes del cultivo se obtiene adicionalmente un espectro de masas EM_0 de los microbios en el que también se mide la sustancia de referencia añadida de forma dosificada y se identifican los microbios como resistentes cuando la cantidad de microbios obtenida a partir del espectro de masas EM^{cum} es considerablemente mayor que la obtenida a partir del espectro de masas EM_0 .
- 25 5. Método según una de las reivindicaciones 2 a 4 **caracterizado por que** la cantidad de microbios se averigua como un cociente a partir de un espectro de masas, donde
- el cociente se obtiene a partir de la intensidad de una señal microbiana y la intensidad de una señal de referencia o la suma de las intensidades de varias señales de referencia,
 - el cociente se obtiene a partir de la suma de las intensidades de varias señales microbianas y la intensidad de una señal de referencia o la suma de las intensidades de varias señales de referencia, o bien
 - el cociente se obtiene a partir de la suma de las intensidades de todas las señales de un intervalo o de todo el espectro de masas y la intensidad de una señal de referencia o la suma de las intensidades de varias señales de referencia.
- 30
- 35 6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado por que** la sustancia de referencia se añade de forma dosificada tras un cultivo de los microbios.
- 40 7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado por que** los microbios se preparan para obtener una muestra para espectrometría de masas y la sustancia de referencia se añade de forma dosificada durante la preparación.
- 45 8. Método según la reivindicación 7 **caracterizado por que** los espectros de masas se obtienen mediante ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) y la sustancia de referencia se añade durante la preparación de las muestras para MALDI en un soporte de muestras.
- 50 9. Método según una de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado por que** los microbios son cultivados simultáneamente en varios cultivos, cada uno con un antibiótico diferente, y para cada cultivo se obtiene un espectro de masas de los microbios y de la sustancia de referencia.
- 55 10. Método según una de las reivindicaciones 1 a 9 **caracterizado por que** los microbios son cultivados simultáneamente en varios cultivos cada uno con una concentración diferente del antibiótico y para cada cultivo se obtiene un espectro de masas de los microbios y de la sustancia de referencia.
- 60 11. Método según una de las reivindicaciones 1 a 10 **caracterizado por que** la afinidad protónica de la sustancia de referencia es superior a la afinidad protónica de la mayoría de las proteínas de los microbios.
- 65 12. Método según la reivindicación 11 **caracterizado por que** la sustancia de referencia es una ribonucleasa o una lisozima.
13. Método según una de las reivindicaciones 1 a 12 **caracterizado por que** antes o durante la preparación de una muestra para espectrometría de masas se concentran las proteínas de los microbios.
14. Método según una de las reivindicaciones 1 a 13 **caracterizado por que** se añade de forma dosificada una mezcla de sustancias de referencia y se mide en los espectros de masas de los microbios.

15. Método según una de las reivindicaciones 1 a 14 **caracterizado por** la identificación taxonómica de los microbios antes de la determinación de la resistencia y la selección de la sustancia de referencia, los valores límite para el establecimiento de la resistencia, el medio y/o las condiciones de cultivo, en particular el tiempo de cultivo, a partir de la clasificación taxonómica.

5

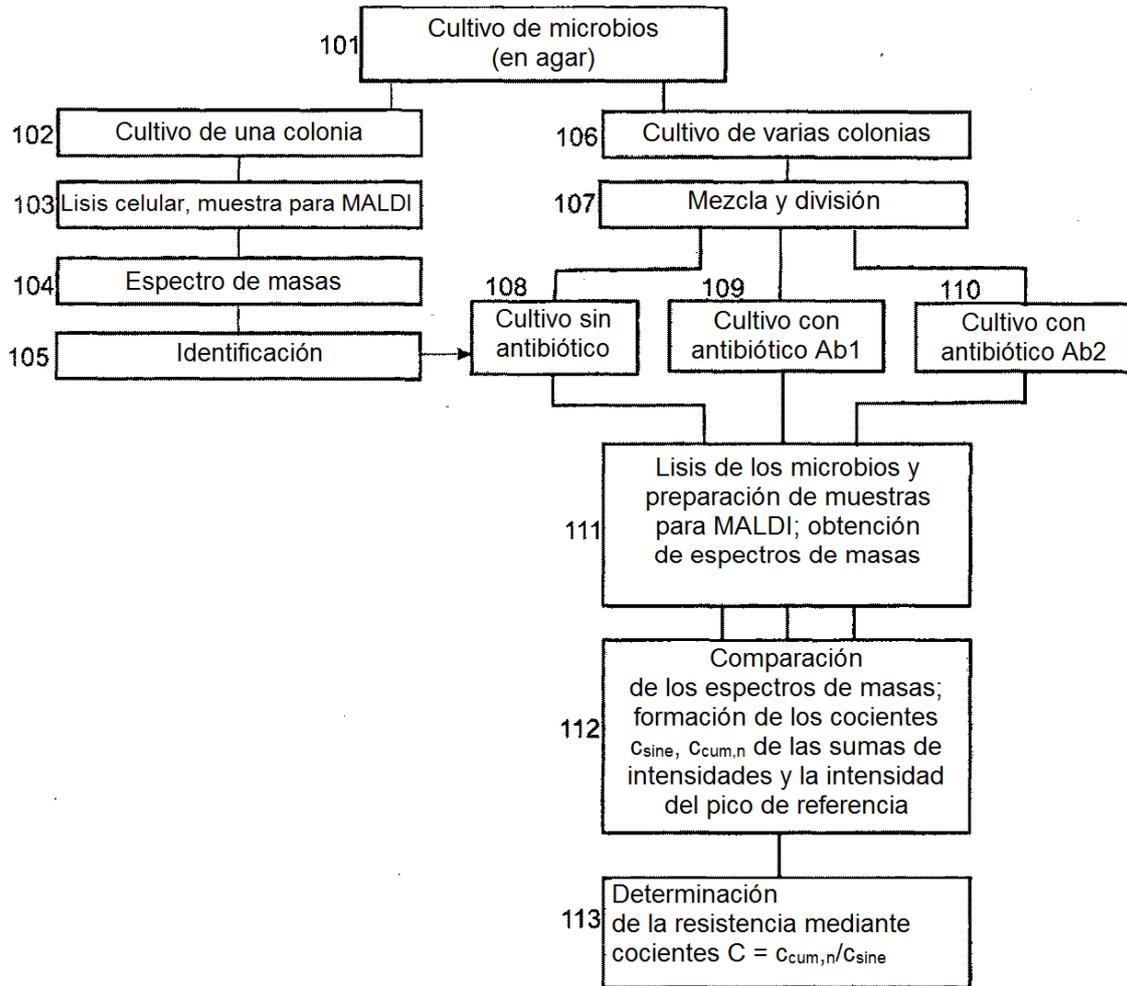


Figura 1

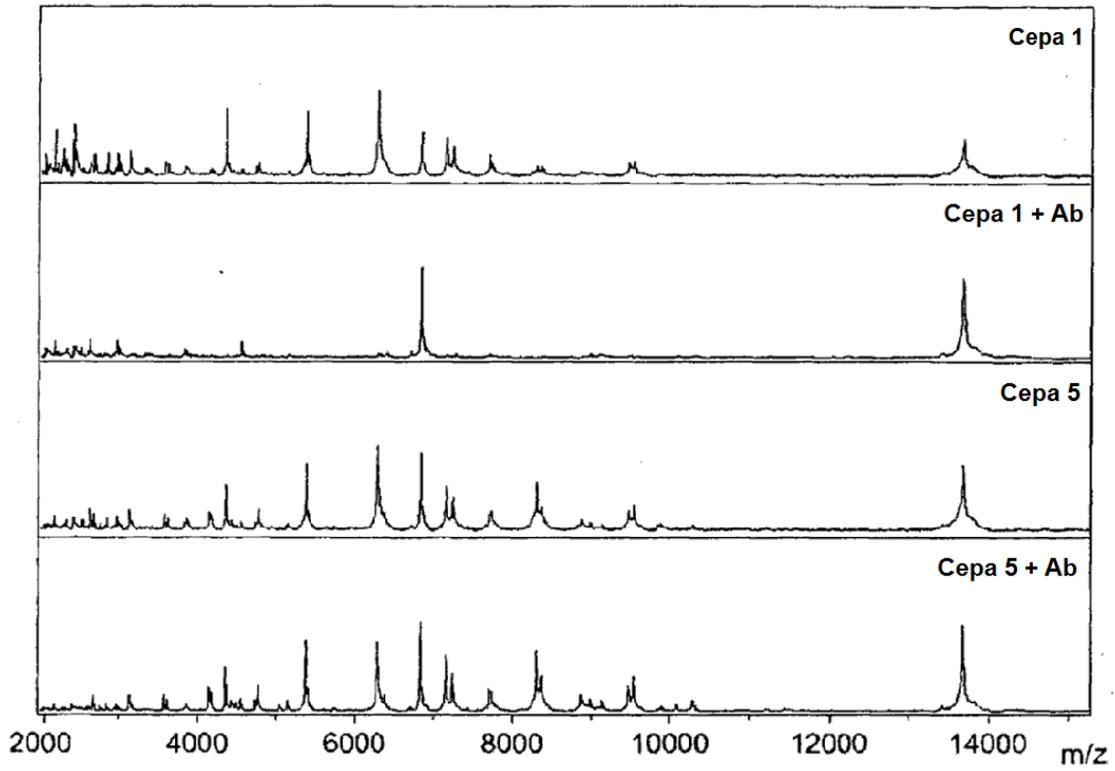


Figura 2

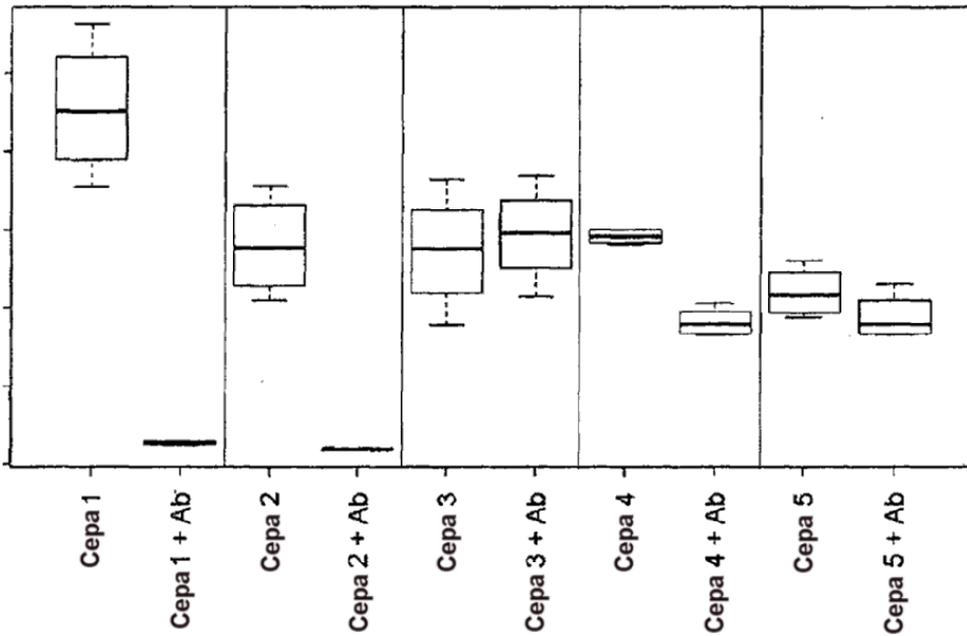


Figura 3