

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 806**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/18** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2012 PCT/US2012/048329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO2013016529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2012 E 12817566 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2737077**

54 Título: **Ensayo de difusión con disco para oritavancina**

30 Prioridad:

**26.07.2011 US 201161511608 P**  
**03.05.2012 US 201261642099 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.05.2017**

73 Titular/es:

**THE MEDICINES COMPANY (100.0%)**  
**8 Sylvan Way**  
**Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**BELLEY, ADAM**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 613 806 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

Ensayo de difusión con disco para oritavancina

## 5 Antecedentes de la invención

Los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana (AST) proporcionan información crítica que ayuda a la selección de una terapia antimicrobiana eficaz y apropiada. Varios dispositivos AST están disponibles en fabricantes de dispositivos e incluyen ensayos de difusión con disco, tiras de E-ensayos (AB bioMerieux), y sistemas automatizados tales como VITEK™ (bioMerieux), Phoenix (Becton Dickinson) y Microscan WALKAWAY™ (Siemens). A causa de su simplicidad, el ensayo de difusión con disco es un dispositivo AST usado ampliamente.

El lipoglicopéptido en investigación oritavancina exhibe una capacidad inherente para unirse a superficies de plástico y vidrio que, por consiguiente, ha confundido la medición de su verdadera potencia en ensayos de susceptibilidad (Arhin, FF, *et al.* 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1597-603). Hasta la fecha, solo el ensayo de concentración inhibitoria mínima (MIC) de microdilución en caldo (BMD) es un método de referencia aceptado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) para su uso en la determinación de la susceptibilidad de un aislado bacteriano a la oritavancina (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, documento M7-A8 del CLSI, 8ª ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement, documento M100-S18 del CLSI, 7ª ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008). Desarrollos recientes han demostrado que la inclusión de polisorbato-80 (P80) al 0,002 % durante el ensayo de MIC BMD minimiza la pérdida de oritavancina debido a unión no específica y permite una determinación precisa de la MIC de un aislado clínico (Arhin, FF, *et al.* 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1597-603).

Debido a que el ensayo de MIC BMD es técnicamente complicado, otros métodos que simplifiquen el ensayo de susceptibilidad para la oritavancina serían ventajosos para los microbiólogos clínicos. Estudios previos que evalúan la viabilidad de un ensayo de difusión con disco basado en agar para oritavancina concluyeron que la lenta difusión de la oritavancina en el agar da como resultado zonas de eliminación (diámetros de zona) que no cumplen los requisitos mínimos recomendados por el CLSI ( $\geq 15$  mm) en condiciones de ensayo convencionales (Sahm, DF, *et al.* 2003. Feasibility study to assess disk diffusion as a method for testing the susceptibility of bacterial pathogens to oritavancin. Informe interno no publicado; Turnbull, B. 2007. Disk diffusion feasibility study for oritavancin susceptibility testing. Informe interno no publicado).

El desarrollo de un ensayo de difusión con disco que permita la determinación precisa de la susceptibilidad de un aislado bacteriano a la oritavancina, bajo los requisitos mínimos recomendados por el CLSI, sería de gran ayuda en la selección rápida y precisa de una terapia que use oritavancina.

## 40 Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a ensayos de difusión con disco para determinar la susceptibilidad de bacterias a un antibiótico glicopéptido, como se define en las reivindicaciones.

En el presente documento se desvela un ensayo de difusión con disco para determinar la susceptibilidad de bacterias a un antibiótico glicopéptido que comprende: a) impregnar un disco de papel con una solución que comprende un antibiótico glicopéptido y polisorbato 80, b) colocar el disco impregnado sobre la superficie de una placa de medio de cultivo revestida con bacterias, c) incubar la placa de b) en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano, y d) medir una zona de inhibición alrededor del disco.

También se desvela en el presente documento un ensayo de difusión con disco para determinar la susceptibilidad de bacterias a un antibiótico glicopéptido que comprende: a) impregnar un disco de papel con una solución que comprende un antibiótico glicopéptido y polisorbato 80, en el que el polisorbato 80 está presente en la solución en una concentración entre aproximadamente un 0,002 % y aproximadamente un 10 % v/v, b) mantener el disco impregnado a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 8 días, c) colocar el disco impregnado sobre la superficie de una placa de medio de cultivo revestida con bacterias, y mantener la placa a 4 °C durante al menos aproximadamente 1 hora, d) incubar la placa de c) en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano, y e) medir una zona de inhibición alrededor del disco.

También se desvela en el presente documento un ensayo de difusión con disco para determinar la susceptibilidad de bacterias a oritavancina que comprende: a) impregnar un disco de papel con una solución que comprende oritavancina y polisorbato 80, en el que el polisorbato 80 está presente en la solución en una concentración de aproximadamente un 5 % v/v, b) mantener el disco impregnado a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 8 días, c) colocar el disco impregnado sobre la superficie de una placa de medio de cultivo revestida con bacterias, y mantener la placa a 4 °C durante al menos aproximadamente 3 horas, d) incubar la placa de c) en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano, y e) medir la zona de inhibición alrededor del disco.

La presente invención se refiere a un ensayo de difusión con disco para determinar la susceptibilidad de bacterias al antibiótico glicopéptido oritavancina que comprende: a) impregnar un disco de papel con una solución que comprende oritavancina, polisorbato 80 y Span 80, b) colocar el disco impregnado sobre la superficie de una placa de medio de cultivo revestida con bacterias, c) incubar la placa de b) en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano, y d) medir una zona de inhibición alrededor del disco, en la que el ensayo produce un diámetro de la zona de inhibición  $\geq 15$  mm cuando se usa la cepa de control de calidad del CLSI *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (MSSA) 25923.

Opcionalmente, la oritavancina está presente en la solución en una concentración entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5 mg/ml. Opcionalmente, la oritavancina está presente en la solución en una concentración de aproximadamente 1,25 mg/ml. Opcionalmente, el disco de papel se impregna con aproximadamente 25  $\mu$ g de oritavancina.

Opcionalmente, el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una proporción entre aproximadamente 75:25 y 25:75 v/v, entre aproximadamente 60:40 y 40:60 v/v, o entre aproximadamente 55:45 y 45:55 v/v, o el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una proporción de 50:50 v/v. Opcionalmente, la concentración combinada de polisorbato 80 y Span 80 presente en la solución está entre aproximadamente un 2,5 % y aproximadamente un 5,5 % v/v, o la concentración combinada de polisorbato 80 y Span 80 presente en la solución es aproximadamente un 4 %. Opcionalmente, el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una proporción entre aproximadamente 55:45 y aproximadamente 45:55 v/v, y en una concentración entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 5 % v/v. Opcionalmente, el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una proporción de aproximadamente 50:50 v/v y en una concentración de aproximadamente un 4 % v/v.

El disco impregnado se puede secar a temperatura ambiente antes de la colocación en la placa de medio de cultivo. El disco impregnado se puede colocar sobre la placa de medio de cultivo unas pocas horas después del secado, tal como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas después del secado.

La etapa de incubación c) se puede llevar a cabo a aproximadamente 37 °C.

La zona de inhibición medida en d) puede tener al menos aproximadamente 15 mm de diámetro.

En una realización específica, la presente invención se refiere a un ensayo de difusión con disco para determinar la susceptibilidad de bacterias a oritavancina que comprende: a) impregnar un disco de papel con una solución que comprende oritavancina, polisorbato 80 y Span 80, en el que la oritavancina está presente en una concentración de aproximadamente 1,25 mg/ml, y en el que el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una concentración de aproximadamente un 4 % v/v y en una proporción de aproximadamente 50:50 v/v, b) colocar el disco impregnado sobre la superficie de una placa de medio de cultivo revestida con bacterias, c) incubar la placa de b) en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano, y d) medir una zona de inhibición alrededor del disco, en la que el ensayo produce un diámetro de la zona de inhibición  $\geq 15$  mm cuando se usa la cepa de control de calidad del CLSI *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (MSSA) 25923.

El disco de papel se puede impregnar con aproximadamente 25  $\mu$ g de oritavancina.

El disco impregnado se puede secar a temperatura ambiente antes de la colocación en la placa de medio de cultivo.

La etapa de incubación c) se puede llevar a cabo a aproximadamente 37 °C.

La zona de inhibición medida en d) puede tener al menos aproximadamente 15 mm de diámetro.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de la predifusión y el P80 al 5 % en los diámetros de zona de oritavancina. Se colocaron discos por duplicado que contenían 360  $\mu$ g de oritavancina, disuelta en P80 al 0,002 % (A y C) o P80 al 5 % (B y D), en cada mitad de placas sembradas con *S. aureus* susceptible a meticilina (MSSA) ATCC 25923. Los diámetros de zona aumentaron cuando se usó P80 al 5 % en lugar de P80 al 0,002 % como excipiente (comparar A con B, o C con D) o cuando se llevó a cabo predifusión (comparar A con C, o B con D). Los discos impregnados de fármaco usados en este estudio se almacenaron a temperatura ambiente durante 9 días antes de su uso.

La Figura 2 muestra el efecto del tipo de hisopo en el diámetro de la zona de inhibición obtenido con discos de oritavancina frente a MSSA ATCC 25923. Se impregnaron discos con 20  $\mu$ l de solución de 1,25 mg/ml de oritavancina en P80/Span 80 al 4 % (1:1 vol/vol) y se dejaron secar durante una noche antes de su uso. *Panel superior izquierdo*, hisopo de alginato de calcio, diámetro de la zona de inhibición = 21 mm; *panel superior medio*, hisopo de algodón, diámetro de la zona de inhibición = aprox. 24 mm; *panel superior derecho*, hisopo de poliéster, diámetro de la zona de inhibición = aprox. 24 mm; *panel inferior izquierdo*, hisopo de rayón, diámetro

de la zona de inhibición = aprox. 22 mm; *panel inferior medio*, hisopo de espuma, diámetro de la zona inhibición = aprox. 26 mm; *panel inferior derecho*, hisopo flocado, diámetro de la zona inhibición = aprox. 24 mm. La medida de la regla es en milímetros.

5 La Figura 3 muestra los diámetros de la zona de inhibición frente a MSSA ATCC 25925 (*panel izquierdo*), VISA Mu50 (*panel medio*) y hVISA NRS2 (*panel derecho*). Se impregnaron discos con 20 µl de solución de 1,25 mg/ml de oritavancina en P80/Span 80 al 4 % (1:1 [vol/vol]) y se dejaron secar durante una noche antes de su uso. Obsérvense las colonias individuales que rodean la zona de inhibición transparente para el aislado de NRS2 (*panel derecho*). La medida de la regla es en milímetros.

10

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a ensayos de difusión con disco antimicrobianos basados en agar que permiten la determinación precisa de la susceptibilidad de bacterias al antibiótico glicopéptido oritavancina. Los ensayos se

15

Los ensayos de la presente invención incorporan una alteración con respecto al ensayo tradicional, dando como resultado ensayos de difusión con disco que permiten que se realicen determinaciones de susceptibilidad bacteriana para el antibiótico glicopéptido oritavancina. La alteración es el uso de una mezcla de P80 y Span 80 como excipiente del fármaco y opcionalmente el mantenimiento de los discos impregnados de antibiótico a temperatura ambiente o a aproximadamente 4 °C antes de su uso, y/o opcionalmente permitir la predifusión de antibiótico desde el disco antes de la incubación de las placas en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano. Esta alteración con respecto a las condiciones de ensayo tradicionales dió como resultado la producción de diámetros de zona de > 15 mm para numerosas cepas de *S. aureus*, y hasta 24 mm para la cepa de control de calidad MSSA ATCC 25923, cuando se sometió a ensayo el antibiótico glicopéptido oritavancina. El uso de estas condiciones dió como resultado además una correlación entre el diámetro de zona y la MIC BMD que fue fácilmente evidente con los aislados clínicos sometidos a ensayo que abarcaron un amplio intervalo de susceptibilidad a oritavancina (de 0,03 a 1 µg/ml). De ese modo, esta alteración produce diámetros de zona que cumplen el requisito de diámetro mínimo recomendado por el CLSI para un ensayo de difusión con disco apropiado que usa antibióticos glicopéptidos, tales como oritavancina.

20

25

30

En términos generales, los ensayos de difusión con disco de la presente invención comprenden: a) impregnar un disco de papel con una solución que comprende oritavancina y un excipiente, en la que el excipiente es P80 y Span 80, b) colocar el disco impregnado sobre la superficie de una placa de agar revestida con bacterias, c) incubar la placa en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano, y d) medir una zona de inhibición alrededor del disco, en la que el ensayo produce un diámetro de la zona de inhibición  $\geq$  15 mm cuando se usa la cepa de control de calidad del CLSI *Staphylococcus aureus* susceptible a metilicina (MSSA) 25923.

35

Como se ha indicado anteriormente, la solución que comprende el antibiótico contendrá tanto P80 como Span 80 como excipientes, donde los excipientes están diluidos en agua. El P80 y el Span 80 usados en los ensayos de la presente invención se pueden obtener fácilmente en una diversidad de fuentes.

40

La proporción de P80 con respecto a Span 80 puede variar entre aproximadamente 75:25 y aproximadamente 25:75 v/v. En otras realizaciones, la combinación variará de aproximadamente 65:35 a aproximadamente 35:65 v/v, de aproximadamente 60:40 a aproximadamente 40:60 v/v, de aproximadamente 55:45 a aproximadamente 45:55 v/v, o será aproximadamente 50:50 v/v. La cantidad combinada de los excipientes en las soluciones que comprenden tanto P80 como Span 80 variará de aproximadamente un 0,002 % a aproximadamente un 10 % v/v, entre aproximadamente un 2,5 % y aproximadamente un 8 % v/v, entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 5 % v/v, o será aproximadamente un 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, o 6 % v/v. En una realización particular, la solución es una solución al 4 % v/v de una combinación 50:50 v/v de P80 y Span 80 en agua. El antibiótico sometido a ensayo en los ensayos es oritavancina (también denominada N-(4-(4-clorofenil)benzil)A82846B y LY333328), que se describe en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.840.684. La concentración de la oritavancina en la solución variará basándose en factores tales como las cepas bacterianas frente a las que se somete a ensayo, el tamaño del disco de papel, y la cantidad de solución usada para impregnar el disco. Sin embargo, generalmente, la oritavancina estará presente en la solución en una concentración entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 50 mg/ml, y en algunas realizaciones entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5 mg/ml, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 mg/ml, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 mg/ml. En realizaciones particulares, la oritavancina estará presente en la solución en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 1,5 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 3,5 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 4,5 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 5,5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 6,5 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 7,5 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 8,5 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 9,5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 10,5 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 11,5 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 12,5 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 13,5 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 14,5 mg/ml, aproximadamente

50

55

60

65

15 mg/ml, aproximadamente 15,5 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 16,5 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 17,5 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 18,5 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 19,50 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml.

5 La solución que contiene P80 y Span 80 y oritavancina se puede preparar mediante cualquier medio adecuado. Por lo general, se produce una solución de la concentración deseada de P80 y Span 80, y a continuación se disuelve la oritavancina en la solución que contiene el excipiente para producir una solución de excipiente que contiene oritavancina. La solución que contiene el excipiente se puede esterilizar, tal como a través de esterilización por filtración, antes de la adición de la oritavancina.

10 Los discos de papel usados en los ensayos de la presente invención pueden ser cualquier disco de papel o celulósico usado generalmente en ensayos de difusión con disco. Por ejemplo, se usan habitualmente discos de papel Whatman (Whatman Ltd.) o discos en blanco disponibles en el mercado en Oxoid de 6 mm, 9 mm o 13 mm de diámetro, aunque también se pueden usar otros tamaños. Preferentemente, los discos de papel se esterilizan, tal como a través del uso de etanol, antes de impregnarse con la solución de excipiente que contiene oritavancina. La cantidad de solución usada para impregnar el disco variará dependiendo de factores tales como el tamaño del disco, y la concentración deseada de la oritavancina que se difunde desde el disco. En general, cuando se usan discos de papel de 6 mm de diámetro, se añaden al disco entre aproximadamente 5 y 100 µl de solución. En realizaciones particulares, se añaden al disco aproximadamente 5 µl, aproximadamente 10 µl, aproximadamente 15 µl, aproximadamente 20 µl, aproximadamente 25 µl, aproximadamente 30 µl, aproximadamente 35 µl, aproximadamente 40 µl, aproximadamente 45 µl, o aproximadamente 50 µl de solución.

25 Los discos se impregnarán con una cantidad de oritavancina que variará basándose en factores tales como las cepas bacterianas frente a las que se somete a ensayo, el tamaño del disco de papel, y la cantidad de solución usada para impregnar el disco. Sin embargo, generalmente, los discos se impregnarán con entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000 ug de oritavancina, y en algunas realizaciones entre aproximadamente 50 y aproximadamente 500 ug de oritavancina, o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 400 ug de oritavancina. En realizaciones particulares, los discos se impregnarán con aproximadamente 50 ug, 60 ug, 70 ug, 80 ug, 90 ug, 100 ug, 110 ug, 120 ug, 130 ug, 140 ug, 150 ug, 160 ug, 170 ug, 180 ug, 190 ug, 200 ug, 210 ug, 220 ug, 30 230 ug, 240 ug, 250 ug, 260 ug, 270 ug, 280 ug, 290 ug, 300 ug, 310 ug, 320 ug, 330 ug, 340 ug, 350 ug, 360 ug, 370 ug, 380 ug, 390 ug, o 400 ug de oritavancina, o más.

Después de impregnarse con la solución de excipiente (P80 y Span 80) que contiene oritavancina, se deja que los discos se sequen a temperatura ambiente. En algunas realizaciones de la invención, los discos se pueden mantener a temperatura ambiente durante un periodo de horas o días antes de su uso después de que estén secos. En otras realizaciones, los discos se pueden usar tan pronto como estén secos o unas pocas horas después del secado, tal como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas después del secado. En aquellas realizaciones en las que los discos se mantienen a temperatura ambiente durante un periodo de horas antes de su uso, se pueden mantener durante aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o más horas antes de que se impregnen con la solución de P80 y Span 80 que contiene oritavancina. En aquellas realizaciones en las que los discos se mantienen a temperatura ambiente durante un periodo de días antes de su uso, se pueden mantener durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más días después de que se impregnen con la solución de P80 y Span 80 que contiene oritavancina. Cuando los discos se mantienen a temperatura ambiente durante un periodo de horas o días antes de su uso, se pueden mantener en presencia de luz ambiente o en la oscuridad. En una realización, los discos se pueden usar unas pocas horas después de que se sequen a temperatura ambiente. En otra realización, los discos se pueden mantener a temperatura ambiente durante aproximadamente 8 días después de secarse y antes de su uso.

50 Los ensayos de difusión con disco de la presente invención se llevan a cabo en placas de medio de cultivo, donde el medio de cultivo es agar, agarosa u otro agente gelificante, preferentemente en el contexto de una placa de cultivo celular. El tamaño y la forma particulares de la placa de cultivo tienen poca influencia en ensayo aunque, sin embargo, son adecuadas placas de poliestireno que midan 60 mm x 15 mm, como también lo son placas de poliestireno que midan 100 mm x 20 mm, o 120 mm x 25 mm. La identidad del agente gelificante dependerá de la cepa bacteriana que se somete a ensayo, y el experto en la materia podrá determinar fácilmente el agente gelificante a usar para una cepa bacteriana particular. A modo de ejemplo, se puede usar agar Mueller Hinton con ajuste de cationes cuando la cepa bacteriana que se somete a ensayo es *Staphylococcus aureus*. De ese modo, las placas y el agente gelificante son las que se usan habitualmente cuando se lleva a cabo un ensayo de difusión con disco convencional.

60 La cepa bacteriana que se somete a ensayo se cultiva por lo general en un medio de cultivo líquido hasta una concentración deseada, o en forma de colonias en un medio de agar y a continuación se suspende en líquido, que se mide por densidad óptica y que dependerá de la cepa bacteriana particular que se somete a ensayo. A modo de ejemplo, una densidad óptica de aproximadamente 0,1 a 600 nm o estándar de McFarland 0,5 es deseable cuando la cepa bacteriana que se somete a ensayo es *S. aureus*. A continuación se siembra una alícuota de la suspensión bacteriana sobre una placa de agar. Se puede usar un hisopo o esparcidor para revestir uniformemente la superficie del agar con la suspensión. Los hisopos de alginato de calcio son particularmente buenos para crear un lecho

uniforme de bacterias sin marcar el medio de cultivo. A continuación, la placa se puede mantener a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo antes de que se coloquen los discos impregnados sobre la superficie del agar, o los discos impregnados se pueden colocar sobre la superficie del agar inmediatamente después de que el agar se haya revestido con la suspensión bacteriana. Cuando la placa se mantiene a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo antes de que se coloquen los discos impregnados sobre la superficie del agar, el periodo de tiempo puede ser aproximadamente 15, 30, 40 o 60 minutos, o aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, o más horas. Las placas también se pueden almacenar a aproximadamente 4 °C hasta varios días antes de su uso, incluyendo aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o más horas, o 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6 o más días.

Después de que los discos se coloquen sobre la superficie del agar, la placa se puede mantener durante un periodo de tiempo que permita la predifusión del antibiótico, o colocar inmediatamente en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano, tales como una incubadora con unas condiciones de un 5 % de CO<sub>2</sub> y 37 °C. Si se mantienen para permitir la predifusión, las placas se pueden mantener a temperatura ambiente, o a una temperatura que sea mayor o menor que la temperatura ambiente, tal como una temperatura en grados centígrados de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37 grados, o un intervalo de temperaturas. En una realización, las placas se mantienen a aproximadamente 4 °C durante un periodo de tiempo que permite la predifusión del antibiótico. Cuando la placa se mantiene durante un periodo de tiempo después de que se coloquen los discos impregnados sobre la superficie del agar para permitir la predifusión del antibiótico, el periodo de tiempo puede ser aproximadamente 15, 30, 40 o 60 minutos, o aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, o más horas. A modo de ejemplo, los discos impregnados se colocan sobre la superficie del agar inmediatamente después de que el agar se haya revestido con la suspensión bacteriana y las placas se colocan en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano. A modo de ejemplo adicional, los discos impregnados se colocan sobre la superficie del agar inmediatamente después de que el agar se haya revestido con la suspensión bacteriana, y las placas se mantienen a aproximadamente 4 °C durante aproximadamente 3 horas para permitir la predifusión antes de que se coloquen en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano.

Las condiciones particulares que estimulan el crecimiento de las bacterias dependerán de la identidad de la cepa bacteriana que se somete a ensayo. Sin embargo, las condiciones apropiadas incluyen una incubadora con unas condiciones de aproximadamente un 5 % de CO<sub>2</sub> y aproximadamente 37 °C. El experto en la materia entenderá que la concentración de CO<sub>2</sub> y la temperatura pueden variar.

Las placas se mantendrán en condiciones que estimulen el crecimiento de las bacterias durante un periodo de tiempo que permita el crecimiento de las bacterias en la placa hasta un grado suficiente en que el crecimiento se pueda detectar visualmente, tal como mediante observación visual simple. La cantidad de tiempo requerida para conseguir tal crecimiento dependerá de la identidad de la cepa bacteriana que se somete a ensayo. En general, la cantidad de tiempo requerida será aproximadamente 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80 o más horas.

La zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco sobre la placa de agar se puede medir mediante una diversidad de medios adecuados, cualquiera de los cuales revelará el tamaño de la zona de inhibición. Por ejemplo, se pueden usar una regla y observación visual simple para medir el diámetro de la zona de inhibición. La expresión "zona de inhibición" tiene el significado convencional atribuido a la expresión en el campo de la microbiología, y se refiere generalmente a la región transparente alrededor del disco de papel, donde el antibiótico que se difunde desde el disco ha evitado el crecimiento bacteriano. Generalmente, existe una correlación directa entre el tamaño del área transparente (zona de inhibición) y la susceptibilidad de la bacteria al antibiótico; cuanto mayor es el área transparente, más susceptible es la bacteria al antibiótico. Las zonas de inhibición que se pueden producir usando los métodos de la presente invención variarán basándose en factores que incluyen la identidad de las bacterias, la cantidad de antibiótico en el disco y las condiciones de cultivo. Sin embargo, los métodos de la presente invención se pueden usar para producir zonas de inhibición que midan al menos aproximadamente 15 mm, al menos aproximadamente 16 mm, al menos aproximadamente 17 mm, al menos aproximadamente 18 mm, al menos aproximadamente 19 mm, al menos aproximadamente 20 mm, al menos aproximadamente 21 mm, al menos aproximadamente 22 mm, al menos aproximadamente 23 mm, y al menos aproximadamente 24 mm, o aproximadamente 15 mm, aproximadamente 16 mm, aproximadamente 17 mm, aproximadamente 18 mm, aproximadamente 19 mm, aproximadamente 20 mm, aproximadamente 21 mm, aproximadamente 22 mm, aproximadamente 23 mm, aproximadamente 24 mm, aproximadamente 25 mm o más.

Las bacterias que se pueden someter a ensayo usando los ensayos de difusión con disco de la presente invención pueden ser cualquiera que sea potencialmente susceptible a oritavancina. Tales bacterias incluyen bacterias Gram positivas tales como: *Staphylococcus aureus* (cepas susceptibles y resistentes a meticilina; cepas susceptibles, con resistencia intermedia y resistentes a vancomicina; cepas con resistencia intermedia a vancomicina heterogéneas), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, grupo de *Streptococcus anginosus* (incluyendo *S. anginosus*, *S. intermedius*, y *S. constellatus*), *Streptococcus dysgalactiae* (incluyendo *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*), *Streptococcus pneumoniae*, especies de *Streptococcus*, incluyendo especies del Grupo A de *Streptococcus*, especies del Grupo B de *Streptococcus*, especies del Grupo C de *Streptococcus*, y especies del Grupo D de *Streptococcus*, especies de *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* (cepas susceptibles y resistentes a vancomicina),

*Enterococcus faecium* (cepas susceptibles y resistentes a vancomicina), *Staphylococcus epidermidis* (cepas susceptibles y resistentes a meticilina), *Staphylococcus haemolyticus*, todas las cepas, especies y subespecies de *Clostridium difficile*, incluyendo, por ejemplo, los ribotipos de PCR 001, 106 y 027 de *C. difficile*, y formas vegetativas y de spora de *Bacillus anthracis*.

5 Los ensayos de difusión con disco de la presente invención, y los resultados obtenidos a partir de los mismos, pueden ser útiles de una diversidad de formas. Por ejemplo, los ensayos se pueden usar para determinar la eficacia de oritavancina frente a una cepa particular de bacterias, tanto si se someten a ensayo solas como frente a una cepa compradora conocida. La información recopilada en el ensayo se puede usar, por ejemplo, para orientar decisiones de tratamiento en un animal, tal como un ser humano, que se haya infectado con las bacterias. Las decisiones de tratamiento pueden incluir el antibiótico glicopéptido, tal como oritavancina, que se debería usar en el tratamiento de una infección, la cantidad de oritavancina que se administra al animal, y la duración del tratamiento. Por lo tanto, los ensayos de difusión con disco de la presente invención se pueden usar junto con métodos de tratamiento de un animal, tal como un ser humano, con el antibiótico glicopéptido oritavancina.

15 Los ensayos de difusión con disco de la presente invención se pueden llevar a cabo en escenarios médicos, tales como un laboratorio de hospital, consulta clínica o médica, y la información obtenida a partir de los ensayos se puede usar como base para decisiones de tratamiento. Por ejemplo, el proveedor de atención médica puede seguir una o más de las siguientes etapas: (a) examinar a un paciente que pueda tener una infección bacteriana, (b) obtener una muestra biológica del paciente, (c) solicitar que se lleve a cabo un ensayo de difusión con disco de la presente invención sobre la muestra, (d) revisar los resultados del ensayo para determinar si será eficaz el antibiótico glicopéptido oritavancina si se administra al paciente, (e) tomar una decisión de tratamiento basada en los resultados del ensayo. Se puede incluir la etapa adicional (f) de administrar al paciente un antibiótico glicopéptido, tal como oritavancina.

25 Dado el aumento de la incidencia de la resistencia bacteriana, se contempla que el prospecto incluido en un recipiente comercial del antibiótico glicopéptido oritavancina pueda incluir instrucciones para llevar a cabo un ensayo de difusión con disco de la presente invención antes de la administración del antibiótico glicopéptido a un paciente. Al sugerir o solicitar que se lleve a cabo el ensayo, el proveedor de atención médica puede asegurarse de que el fármaco sea apropiado para el tratamiento de la infección particular del paciente.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Artículos de ensayo

35 La oritavancina en polvo (lote 11953CB00) fue de The Medicines Company. El P80 (número de catálogo P5188-100ML, lote n.º MKBF7194V) y la (2-hidroxiopropil)-β-ciclodextrina (número de catálogo 332593-25G) fueron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU.). El agar Mueller Hinton con ajuste de cationes (número de catálogo 211438) se obtuvo en Becton Dickinson & Company (Sparks, MD).

#### Cepas de ensayo

45 Las cepas bacterianas usadas en este estudio incluyeron la cepa de control de calidad de *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (MSSA) usada en el ensayo de difusión con disco ATCC 25923, el aislado de MIC BMD de control de calidad del CLSI MSSA ATCC 29213, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) NRS123, *S. aureus* de resistencia intermedia a vancomicina heterogéneo (hVISA) NRS2, *S. aureus* de resistencia intermedia a vancomicina (VISA) NRS3, VISA ATCC 700699, VISA NRS402, MRSA U206056 y MSSA T972018 (los dos últimos aislados se obtuvieron en Covance, Indianapolis, IN). También se usaron en el estudio dos aislados de *S. aureus* que exhibían susceptibilidad reducida a oritavancina, que derivaron internamente de 20 rondas de exposición diaria a oritavancina.

#### Diseño del estudio

55 El estudio se diseñó para identificar las condiciones que mejorarán la difusión de oritavancina en agar y por lo tanto produzcan un diámetro de zona  $\geq 15$  mm para la cepa de control de calidad del CLSI MSSA ATCC 25923. Se identificaron excipientes que aumentaron la difusión con disco de oritavancina en agar con respecto a los discos que contenían solo oritavancina y se seleccionaron para estudio posterior. Se evaluaron las concentraciones de excipiente que maximizaron la difusión pero no afectaron al crecimiento bacteriano. Se usaron lotes de discos con un contenido optimizado del disco y se usaron para determinar si los diámetros de zona podían distinguir entre aislados de *S. aureus* seleccionados que exhibían un intervalo de MIC que se había determinado anteriormente mediante el método de microdilución en caldo. Se introdujo una etapa de predifusión a temperatura ambiente para maximizar la difusión de oritavancina antes del comienzo del crecimiento bacteriano. En esta etapa, se colocaron discos antimicrobianos sobre placas de agar sembradas con un aislado bacteriano y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas. Las placas se incubaron a continuación durante una noche a 37 °C. Los diámetros de zona alrededor de los discos en los que se inhibió el crecimiento bacteriano se midieron con una regla y se informaron en

milímetros.

#### Procedimientos experimentales

- 5 Se disolvió la oritavancina en polvo en P80 esterilizado por filtración preparado recientemente (variando entre un 0,002 % y un 10 %) o (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina (HPCD; 10 %) en concentraciones entre 4,5 y 18 mg/ml (ajustadas para potencia basándose en la pureza de lote). Se dejaron secar discos de papel Whatman esterilizados con etanol (de 6 mm de diámetro) y a continuación se impregnaron con 20 microlitros de solución de oritavancina que contenía cantidades totales que variaron de 90 a 360 microgramos. Los discos se dejaron secar a temperatura ambiente durante varios periodos de tiempo antes de su uso.

15 Se prepararon suspensiones bacterianas y se ajustaron a una densidad óptica de 0,1 a 600 nm. Se sembraron placas (de 90 mm de diámetro) de agar Mueller Hinton con ajuste de cationes con las suspensiones bacterianas por inoculación con hisopo inicial en el centro de la placa y a continuación moviéndose hacia fuera hacia el borde. La placa se inoculó con hisopo una segunda vez, perpendicular a la orientación de la primera inoculación con hisopo. Para evaluar el impacto de la predifusión en el diámetro de las zonas de inhibición, se colocaron inmediatamente dos discos en una mitad de la placa y la placa se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de 3 horas, se colocaron dos discos adicionales en la otra mitad de la placa y a continuación la placa se incubó durante una noche a 37 °C. Los diámetros de zona se midieron con una regla y se informaron en milímetros.

#### Resultados

Se identificaron tres condiciones que estimularon la difusión de oritavancina en agar y dieron como resultado diámetros de zona  $\geq 15$  mm para la cepa de control de calidad *S. aureus* ATCC 25923.

- 25 1) La predifusión aumenta los diámetros de zona. Se llevó a cabo un experimento inicial para determinar si una etapa de predifusión aumentaría los diámetros de zona. Se prepararon discos que contenían 360  $\mu$ g de oritavancina disuelta en P80 al 0,002 % y se colocaron sobre placas sembradas con bacterias. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 3 horas para permitir la predifusión, las placas se pusieron a continuación a 37 °C durante una noche. El diámetro de zona promedio sin predifusión producido por dos discos fue 10,5 mm frente a MSSA ATCC 25923 (Figura 1A). El diámetro de zona promedio aumentó hasta 12,0 mm cuando se permitió una predifusión durante 3 horas (Figura 1C). Aunque las zonas de eliminación con la etapa de predifusión estuvieron por debajo del umbral mínimo de 15 mm de diámetro recomendado por el CLSI para el rendimiento adecuado del ensayo de difusión con disco, la predifusión aumentó el área de la zona de eliminación en aproximadamente un 24 % y por lo tanto se incorporó a ensayos adicionales.
- 35 2) La inclusión de P80 al 5 % como excipiente aumenta los diámetros de zona. Como se muestra en la Figura 1, el diámetro de zona promedio que resulta de dos discos preparados con oritavancina disuelta en una solución al 5 % de P80 frente a la cepa de control de calidad MSSA ATCC 25923 fue 14,8 mm (B) y aumentó hasta 17,0 mm cuando se llevó a cabo predifusión (D). Ensayos adicionales de excipientes revelaron que la HPCD ((2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina) al 10 % también mejoró la difusión de oritavancina en agar (Tabla 1). Sin embargo, solo los discos preparados con oritavancina disuelta en P80 al 5 % pero no con HPCD al 10 % exhibieron diámetros de zona que variaron de acuerdo con la MIC de microdilución en caldo de la cepa (Tabla 1). Por lo tanto, solo se usaron los discos que contenían oritavancina disuelta en P80 al 5 % en los experimentos posteriores.

Tabla 1. Efecto de los excipientes en los diámetros de zona para aislados de *S. aureus*

Cepa	Fenotipo	MIC BMD de Oritavancina ( $\mu$ g/ml)	Diámetro de zona promedio <sup>a</sup> (mm $\pm$ SD) para discos que contenían 360 $\mu$ g de oritavancina	
			Excipiente	
			P80 al 5 % <sup>b</sup>	HPCD al 10 % <sup>c</sup>
ATCC 25923	MSSA	0,125	19,0	17,5
NRS2	hVISA	0,25	17,8	17,5
ATCC 700699	VISA	1	15,0	17,3
NRS3	VISA	1	14,0	16,8
NRS402	VISA	1	14,8	17,5

<sup>a</sup>Los diámetros de zona informados fueron de discos que habían experimentado la etapa de predifusión de 3 horas. Los resultados son el promedio de 2 discos.

<sup>b</sup>Los discos preparados a partir de oritavancina disuelta en P80 al 5 % se almacenaron a temperatura ambiente durante 5 días antes de su uso.

<sup>c</sup>Los discos preparados a partir de oritavancina disuelta en HPCD al 10 % se prepararon el mismo día de uso.

Se examinó el efecto del P80 al 5 % en la difusión de otros agentes antimicrobianos. Se prepararon discos que contenían 30 µg de daptomicina, telavancina o vancomicina sin (control) o con P80 al 5 %. Como se muestra en la Tabla 2, la adición de P80 al 5 % a discos que contenían 30 µg del lipoglicopéptido telavancina aumentó los diámetros de zona en un promedio de 1,5 mm frente a MSSA ATCC 25923. La inclusión de P80 al 5 % no tuvo ningun efecto en los diámetros de zona de daptomicina y vancomicina.

Tabla 2. Efecto del P80 al 5 % en los diámetros de zona obtenidos con diversos agentes antimicrobianos

Agente antimicrobiano	Cantidad en disco (µg)	Diámetro de zona promedio (mm) obtenido con <i>S. aureus</i> ATCC 25923 <sup>a</sup>	
		Control	+ P80 al 5 %
Daptomicina	30	18,5	18
Telavancina	30	16,5	18
Vancomicina	30	17,5	17,5

<sup>a</sup>Los resultados son el promedio de 2 discos sin predifusión.

3) El almacenamiento de los discos preparados a temperatura ambiente antes de su uso aumenta los diámetros de zona. Se observó que los diámetros de zona aumentaron cuando los discos preparados a partir de oritavancina disuelta en P80 al 5 % se incubaron a temperatura ambiente durante periodos mayores que un día antes de su uso. Como se muestra en la Tabla 3, los diámetros de zona aumentaron a medida que transcurrió el tiempo entre la preparación del disco y su uso. A partir de estos resultados, los discos se almacenaron a temperatura ambiente durante al menos 8 días antes de su uso.

Tabla 3. Efecto en el diámetro de zona del almacenamiento de los discos a temperatura ambiente antes de su uso

Cepa	Diámetro de zona promedio <sup>a</sup> (mm)				
	Tiempo transcurrido entre la preparación del disco y su uso <sup>b</sup>				
	Mismo día	1 día	4 días	6 días	8 días
ATCC 25923	14,0	15,0	15,8	16,3	17,0

<sup>a</sup>Los diámetros de zona informados fueron de discos que habían experimentado una etapa de predifusión de 3 horas. Los resultados son el promedio de 2 discos.  
<sup>b</sup>Los discos se prepararon a partir de una solución de trabajo individual de 18 mg/ml de oritavancina disuelta en P80 al 5 %. Los discos se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se sometieron a ensayo.

Usando las condiciones óptimas descritas anteriormente (inclusión de P80 al 5 %, predifusión de 3 horas y secado de los discos al menos 8 días antes de su uso), se llevaron a cabo experimentos para determinar si los aislados de *S. aureus* de diferentes MIC BMD se podían distinguir mediante el diámetro de zona en ensayos con disco. Para estos experimentos, se prepararon discos que contenían 360 µg de oritavancina en P80 al 5 % y se almacenaron a temperatura ambiente durante 8 y 14 días antes de su uso. Como se muestra en la Tabla 4, los diámetros de zona disminuyeron para los aislados que exhibían un aumento de la MIC BMD frente a oritavancina. La correlación entre el diámetro de zona y la MIC BMD para todos los aislados sometidos a ensayo fue evidente ( $r = -0,78$ ) y la correlación mejoró cuando se excluyeron del análisis los dos aislados de susceptibilidad reducida a oritavancina seleccionados en laboratorio ( $r = -0,94$ ): los diámetros de zona para los dos aislados de susceptibilidad reducida de *S. aureus* fueron aproximadamente 2 mm menores en comparación con los aislados de MSSA y MRSA que exhibían las mismas MIC BMD. La predifusión aumentó los diámetros de zona para las cepas de MSSA y MRSA en un promedio de aproximadamente 2,5 mm. De forma similar, la predifusión aumentó los diámetros de zona para los aislados de VISA y susceptibilidad reducida a oritavancina en un promedio de aproximadamente 1,1 mm.

Tabla 4. Diámetros de zona para aislados de *S. aureus* que exhiben un intervalo de MIC BMD

Cepa	Fenotipo	MIC BMD de Oritavancina (µg/ml)	Diámetro de zona (mm ± SD) <sup>a</sup>							
			Experimento 1 <sup>b</sup>		Experimento 2 <sup>c</sup>		Promedio			
			Sin predifusión <sup>d</sup>	Predifusión <sup>e</sup>	Sin predifusión	Predifusión	Sin predifusión	Predifusión		
NRS123	MRSA	0,03	16,3 ± 0,4	19,5 ± 0,0	15,8 ± 0,4	18,0 ± 0,0	16,0 ± 0,4	18,8 ± 0,9		
ATCC 29213	MSSA	0,06	15,8 ± 0,4	18,3 ± 0,4	n.d.	n.d.	15,8 ± 0,4	18,3 ± 0,4		
NRS121	MRSA	0,06	n.d.	n.d.	15, ± 0,0	17,3 ± 0,4	15, ± 0,0	17,3 ± 0,4		
ATCC 25923	MSSA	0,12	15,3 ± 0,4	18,0 ± 0,0	14,5 ± 0,0	17,0 ± 0,0	14,9 ± 0,5	17,5 ± 0,6		
U206056	MRSA	0,25	15,5 ± 0,0	17,8 ± 0,4	14,5 ± 0,0	17,0 ± 0,0	15,0 ± 0,6	17,4 ± 0,5		
NRS2	hVISA	0,25	15,5 ± 0,0	17,5 ± 0,0	14,3 ± 0,4	17,0 ± 0,0	14,9 ± 0,8	17,3 ± 0,3		
NRS123-ORI <sup>f</sup> 8	MRSA	0,25	n.d.	n.d.	14,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0		
T972018	MSSA	0,5	15,5 ± 0,0	17,5 ± 0,0	14,5 ± 0,0	17,3 ± 0,4	15,0 ± 0,6	17,4 ± 0,3		
NRS121-ORI <sup>f</sup> 8	MRSA	0,5	n.d.	n.d.	13,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0		
ATCC 700699	VISA	1	13,5 ± 0,7	14,5 ± 0,0	13,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0	13,3 ± 0,5	14,3 ± 0,3		
NRS402	VISA	1	13,3 ± 0,4	14,8 ± 0,4	13,0 ± 0,0	14,3 ± 0,4	13,1 ± 0,3	14,5 ± 0,4		

<sup>a</sup>Los diámetros de zona fueron de discos que contenían 360 µg de oritavancina en P80 al 5 %.

<sup>b</sup>Los discos usados en el Experimento 1 se almacenaron a temperatura ambiente durante 14 días antes de su uso.

<sup>c</sup>Los discos usados en el Experimento 2 se almacenaron a temperatura ambiente durante 8 días antes de su uso.

<sup>d</sup>Los discos se añadieron inmediatamente a las placas de agar sembradas antes de la incubación a 37 °C.

<sup>e</sup>La predifusión consistió en añadir discos a las placas sembradas y a continuación incubar a temperatura ambiente durante 3 horas antes de la incubación durante una noche a 37 °C.

Se llevaron a cabo experimentos de seguimiento para determinar si se podía optimizar el contenido del disco para diferenciar mejor los diámetros de zona de cepas que exhiben MIC BMD entre 0,03 y 0,25 µg/ml. Se prepararon discos que contenían un intervalo de concentraciones de P80 (2,5, 5 y 10 %) y oritavancina (90, 180 y 360 µg) y se sometieron a ensayo frente a NRS123 (MIC BMD de 0,03 µg/ml) y NRS2 (MIC BMD = 0,25 µg/ml). Como se muestra en Tabla 5, las diferencias en los diámetros de zona entre NRS123 y NRS2 fueron mayores con discos que contenían P80 al 2,5 % que con discos que contenían P80 al 5 o 10 %. Un estudio adicional de concentración de P80 puede proporcionar mayores diferencias en el diámetro de zona para aislados que exhiben MIC BMD de aproximadamente 0,25 µg/ml.

5 Las condiciones recién descubiertas descritas aquí para la oritavancina producen diámetros de zona > 15 mm para la cepa de control de calidad MSSA ATCC 25923 y por lo tanto cumplen con el diámetro de zona mínimo recomendado por el CLSI para un ensayo de difusión con disco apropiado.

15 Tabla 5. Optimización del contenido del disco para distinguir diámetros de zona de aislados con MIC BMD de oritavancina que varían entre 0,03 y 0,25 µg/ml.

Cepa	MIC BMD de oritavancina (mg/ml)	Diámetro de zona promedio (mm) con discos que contienen la cantidad indicada de oritavancina y P80 <sup>a</sup>								
		P80 al 2,5 % <sup>b</sup>			P80 al 5 % <sup>c</sup>			P80 al 10 % <sup>c</sup>		
		90 µg	180 µg	360 µg	90 µg	180 µg	360 µg	90 µg	180 µg	360 µg
NRS123	0,03	15,8	16,5	16,8	16	17,3	18,5	15,5	17,3	17,5
NRS2	0,25	14	14,8	15	15	16	18	15,8	16	16,5
Diferencia en diámetro (mm) <sup>d</sup>		1,8	1,7	1,8	1	1,3	0,5	-0,3	1,3	1

<sup>a</sup>El diámetro de zona promedio fue de 2 discos. Los diámetros de zona son de discos que habían experimentado predifusión.  
<sup>b</sup>Los discos que contenían P80 al 2,5 % y las diversas concentraciones de oritavancina se almacenaron durante 8 días a temperatura ambiente antes de su uso.  
<sup>c</sup>Los discos que contenían P80 al 5 % y al 10 % y las diversas concentraciones de oritavancina se almacenaron durante 14 días a temperatura ambiente antes de su uso.  
<sup>d</sup>La diferencia en el diámetro es el resultado del diámetro de zona obtenido para NRS2 restado de NRS123.

*Ejemplo 2*

Debido a que se descubrió que la inclusión de P80 como excipiente en los discos antimicrobianos de oritavancina aumentaba los diámetros de zona hasta ≥ 15 mm, se sometió a ensayo la incorporación de P80 en agar Mueller-Hinton con ajuste de cationes (CAMHA). Como se muestra en la Tabla 6, los diámetros de zona en CAMHA que contenían P80 al 1 % obtenidos para discos preparados con diversas concentraciones de oritavancina disuelta en P80 al 0,002 % permanecieron < 15 mm, incluso cuando se usó predifusión de 3 h. Además, el CAMHA que contenía P80 al 1 % no aumentó los diámetros de zona para discos que contenían 180 µg de oritavancina disuelta en P80 al 2,5 % en comparación con los diámetros de zona obtenidos a partir de discos colocados en agar sin P80 (Tabla 7). A partir de estos resultados, se concluyó que la inclusión de P80 al 1 % en el agar no mejora la difusión de oritavancina y no proporciona diámetros de zona del tamaño adecuado (es decir, ≥ 15 mm).

30 Tabla 6. Los diámetros de zona para discos que contienen oritavancina colocados en CAMHA que contiene P80 al 1 % son < 15 mm frente a MSSA ATCC 25923

Cepa	Oritavancina (µg) en disco	Contenido de P80 en CAMHA (%)	Diámetro de zona promedio (mm) <sup>a</sup>	
			Sin predifusión	Predifusión
MSSA ATCC 25923	45	1	12	12,3
MSSA ATCC 25923	90	1	11,8	12,8
MSSA ATCC 25923	180	1	12,3	13
MSSA ATCC 25923	360	1	12,8	12,5

<sup>a</sup>Los diámetros de zona promedio son de determinaciones por duplicado (2 discos). Los discos usados en este experimento contenían las concentraciones indicadas de oritavancina disuelta en P80 al 0,002 %.

Tabla 7. Los diámetros de zona para discos que contienen oritavancina en agar que contiene P80 al 1 % son similares a los diámetros de zona obtenidos en agar sin P80

Cepa	Contenido de P80 en CAMHA (%)	Diámetro de zona (mm) <sup>a</sup>	
		Sin predifusión	Predifusión
MSSA ATCC 29213	0	15,3	18,3
MSSA ATCC 29213	1	15,3	18

<sup>a</sup>Los diámetros de zona promedio son de determinaciones por duplicado (2 discos). Los discos usados en este experimento contenían 180 µg de oritavancina disuelta en P80 al 2,5 %.

Ejemplo 3

5 El experimento descrito en el Ejemplo 1 se repitió en condiciones idénticas con la excepción de que la etapa de predifusión se llevó a cabo a 4 °C durante 3 o 6 horas. Como se muestra en la Tabla 8, la predifusión durante 6 horas y a 4 °C aumentó los diámetros de zona de inhibición obtenidos para MSSA ATCC 25923 en comparación con la predifusión durante 3 h o a temperatura ambiente, respectivamente.

10

Tabla 8. Efecto de la temperatura y el tiempo de predifusión en el diámetro de la zona de inhibición

Cepa	Diámetro de la zona de inhibición (mm) <sup>a</sup> resultante de predifusión a:			
	Temperatura ambiente		4 °C	
	3 h	6 h	3 h	6 h
ATCC 25923	16,5 , 17	18, 18,5	18, 19	21, 22

<sup>a</sup>Se muestran los diámetros de zona de inhibición de determinaciones por duplicado. Los discos usados en este experimento se impregnaron con 20 µl de 9 mg/ml de oritavancina disuelta en P80 al 2,5 %.

15

En los siguientes experimentos, también se sometieron a ensayo discos de papel en blanco de Oxoid (n.º de catálogo CT0998B) ya que representan una fuente de discos de antibióticos disponible en el mercado. Como se muestra en la Tabla 9, los diámetros de zona de inhibición obtenidos con discos de Oxoid impregnados con soluciones de oritavancina fueron menores en comparación con los obtenidos con discos preparados a partir de papel de Whatman n.º 5, quizá debido al aumento de espesor de los discos de Oxoid con respecto al papel de Whatman n.º 5.

20

Tabla 9. Efecto del tipo de disco en los diámetros de zona de inhibición obtenidos para MSSA ATCC 25923

Oritavancina en el disco (µg)	% de P80 en la solución de oritavancina	Diámetro de la zona de inhibición (mm) obtenido para MSSA ATCC 25923 de acuerdo con el tipo de disco <sup>a</sup>	
		Whatman n.º 5	Oxoid
180	2,5	15,5, 16	12,5, 12,5
270	2,5	15,5, 15,5	13, 13
360	2,5	15,5, 15,5	13, 13
180	5	14,5, 14,5	12, 12,5
270	5	16, 16	13, 13,5
360	5	16, 16,5	14, 14

<sup>a</sup>Se muestran diámetros de zona de inhibición de determinaciones por duplicado. Los discos usados en este experimento se impregnaron con 20 µl de solución de oritavancina disuelta en la concentración de P80 indicada. Los discos se almacenaron a temperatura ambiente durante 7 días antes de su uso. La predifusión fue durante 3 h a 4 °C.

25

Se seleccionaron discos de Oxoid que contenían 360 µg de oritavancina en P80 al 5 % para un estudio adicional pero se almacenaron a temperatura ambiente durante 30 días antes de su uso y se usó una predifusión de 6 horas a 4 °C en un intento de aumentar los diámetros de zona de inhibición. Como se muestra en la Tabla 10, los diámetros de zona de inhibición fueron > 15 mm para MSSA ATCC 25923 y variaron de acuerdo con la MIC BMD de los aislados de *S. aureus* sometidos a ensayo.

Tabla 10. Diámetros de zona de inhibición para aislados de *S. aureus* usando discos de Oxoid impregnados con oritavancina

Cepa	Fenotipo	MIC BMD de oritavancina (µg/ml)	Diámetro de la zona de inhibición (mm) <sup>a</sup>
ATCC 25923	MSSA	0,12	17,5
NRS2	hVISA	0,25	16,5
Mu50	VISA	1	13

<sup>a</sup>Los discos usados en este experimento se impregnaron con 20 µl de 18 µg/ml de oritavancina disuelta en P80 al 5 %. Los discos se incubaron durante 30 días a temperatura ambiente antes de su uso. La predifusión fue durante 6 horas a 4 °C.

*Ejemplo 4*

5

Se investigaron excipientes alternativos en los que se disolvió la oritavancina incluyendo una mezcla tanto de P80 como de Span 80 y los tensioactivos Mergol SE, Brij 30 y poli(etilenglicol) hexaoleato de sorbitol.

Tabla 11. Artículos de ensayo

Artículo de ensayo	Proveedor
Difosfato de oritavancina (n.º de lote 87556IL00)	The Medicines Company, Parsippany, NJ, EE.UU.
Discos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana-discos en blanco (n.º de catálogo CT0998B)	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK.
P80 (n.º de catálogo P5188-50ML, n.º de lote MKBF7194V)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.
Span 80 (n.º de catálogo S6760-250ML, n.º de lote MKBF1605V)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.
Tensioactivo Mergol SE (n.º de catálogo 421340-250ML, n.º de lote 03211CG)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.
Brij 30 (n.º de catálogo 235989-100ML, n.º de lote MKBG9120V)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.
Poli(etilenglicol) hexaoleato de sorbitol (n.º de catálogo 466409-1L, n.º de lote MKBH9590V)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.
Agar Mueller Hinton con ajuste de cationes (n.º de catálogo 211438)	Becton Dickinson y Company, Sparks, MD, EE.UU.
Hisopos de alginato de calcio estériles (n.º de catálogo 25-806 2PA)	Puritan Medical Products Company, LLC, Guilford, ME, EE.UU.
Hisopos de punta de algodón (n.º de referencia 89031-270)	VWR International, LLC., Radnor, PA, EE.UU.
Hisopos de punta de fibra de poliéster estéril (n.º de catálogo 14-959-90)	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canadá
Hisopos de algodón estériles (n.º de referencia 25-806 1PC)	Puritan Medical Products Company, LLC, Guilford, ME, EE.UU.
Hisopos de poliéster estériles (n.º de referencia 25-806 1PD)	Puritan Medical Products Company, LLC, Guilford, ME, EE.UU.
Hisopos de rayón estériles (n.º de referencia 25-806 1PR)	Puritan Medical Products Company, LLC, Guilford, ME, EE.UU.
Hisopos de espuma estériles (n.º de referencia 25-1506 1PF)	Puritan Medical Products Company, LLC, Guilford, ME, EE.UU.
Hisopos flocados estériles (n.º de referencia 25-3406 1PN)	Puritan Medical Products Company, LLC, Guilford, ME, EE.UU.

10

Cepas de ensayo

Las cepas de ensayo usadas en este estudio incluyeron la cepa de control de calidad de *Staphylococcus aureus* susceptible a metilicina (MSSA) ATCC 25923, el aislado de MIC BMD de control de calidad MSSA ATCC 29213, *S.*

*aureus* resistente a metilina (MRSA) ATCC 33591, aislados de *S. aureus* de la Red de Resistencia Antimicrobiana de *S. aureus* de resistencia intermedia a vancomicina heterogéneo (hVISA) NRS2, hVISA NRS36, *S. aureus* de resistencia intermedia a vancomicina (VISA) Mu50 (ATCC 700699), VISA NRS3 y VISA NRS402, y aislados clínicos de los aislados clínicos (8) del estudio en fase 2 SIMPLFI (obtenidos en Covance, Indianapolis, IN, EE.UU.) MRSA U206056, MSSA Q141066, MRSA Q670505, MSSA S815246, MSSA T759545, MRSA T998528, MSSA U148267, MSSA U781969, MSSA U933236, MRSA V257345, MRSA V406957, MRSA Q141067, MRSA Q670607, MSSA S815247, MSSA T811355, MRSA T998608, MRSA U260847, MRSA U784439, MRSA U933237, MRSA V288615 y MSSA V406985.

## 10 Diseño del estudio

Se añadió el agente emulgente Span 80 al P80 como segundo excipiente y se investigaron una diversidad de proporciones de P80:Span 80 en un esfuerzo por eliminar tanto la necesidad de almacenamiento de discos durante 30 días antes de su uso como la etapa de predifusión. Se evaluaron las concentraciones y proporciones de excipientes que maximizaron la difusión pero no afectaron al crecimiento bacteriano. Se prepararon lotes de discos con fármaco y excipientes optimizados. Estos discos optimizados se usaron para determinar si los aislados clínicos y de referencia de *S. aureus* seleccionados que exhibían un intervalo de MIC BMD se podían distinguir basándose en sus diámetros de zona de inhibición.

## 20 Procedimientos experimentales

Debido a su alta viscosidad, se transfirieron P80 y Span 80 líquidos a tubos de tapa a presión Falcon de 15 ml mediante pipeteo y dejando que los volúmenes del líquido escurrieran completamente de la pipeta antes de la mezcla. Se mezclaron completamente P80 y Span 80 mediante inclinación exhaustiva y rotación de los tubos. Después de eso, las mezclas de P80/Span 80 se diluyeron con agua estéril para conseguir una concentración de excipiente total de un 1 a un 4 % (vol/vol). Se prepararon soluciones de Mergol SE y Brij 30 en agua estéril al 5 % (vol/vol). Se preparó una solución de poli(etilenglicol) hexaoleato de sorbitol en agua estéril al 1 % (vol/vol).

Los índices de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de las diversas mezclas de P80/Span 80 se calcularon usando la ecuación:  $HLB_{XY} = HLB_X (\%X) + HLB_Y (\%Y)$ . Por ejemplo, el HLB de una mezcla 1:1 (vol/vol) de P80 (HLB = 15) / Span 80 (HLB = 4,3) es  $15(0,5) + 4,3(0,5) = 9,7$ .

Se disolvió oritavancina en polvo en soluciones preparadas recientemente de los excipientes indicados a concentraciones de 0,625, 1,25, 2,5, 5, y 10 mg/ml (ajustadas para la potencia basándose en el lote 87556IL00 de pureza del 83,1 %) por agitación vortical durante un mínimo de 5 minutos. Las soluciones de oritavancina en los diversos excipientes, aunque no visualmente transparentes, estaban exentas de cualquier material formado por partículas aparente según se evaluó visualmente. Se impregnaron discos en blanco de Oxoid estériles con 20 µl de estas soluciones de oritavancina, dando como resultado cargas de disco de oritavancina que variaron de 12,5 a 200 µg. A menos que se indique otra cosa, se dejó que los discos se secaran durante una noche a temperatura ambiente antes de su uso.

Se prepararon suspensiones bacterianas a partir de colonias aisladas en placas de agar Mueller Hinton con ajuste de cationes durante una noche en solución salina estéril y se ajustaron a una densidad óptica de 0,1 a 600 nm. Se sembraron placas de agar Mueller Hinton con ajuste de cationes convencionales (90 mm de diámetro) con suspensiones bacterianas mediante inoculación con hisopo inicial en el centro de la placa y a continuación moviéndose hacia fuera. La inoculación con hisopo se continuó en un ángulo recto y a continuación en un ángulo oblicuo a las primera y segunda inoculaciones con hisopo. Los discos se colocaron en las placas sembradas con pinzas estériles. Las placas se incubaron a continuación durante una noche a 37 °C y los diámetros de zona de inhibición se midieron con una regla y se informaron en milímetros.

## Resultados

Se llevó a cabo una serie de experimentos para evaluar el impacto de los siguientes parámetros en los diámetros de zona de inhibición y otros atributos de la zona de inhibición que pudieran contribuir potencialmente a variabilidad en la evaluación del diámetro de zona, tal como margen, concetricidad y grado de eliminación: 1) la concentración de excipiente total en la solución de oritavancina, 2) la proporción de P80/Span 80 en la solución de oritavancina, 3) la carga de disco de oritavancina y el tipo de hisopo usado para sembrar y 4) otros tensioactivos con índices HLB similares. A continuación se describen cada conjunto de experimentos relacionados y sus resultados.

1) Concentración de excipiente total en la solución de oritavancina. Como referencia, se disolvió oritavancina a 2,5 mg/ml en soluciones que contenían P80/Span 80 del 0,5 al 4 % (en una proporción 35:65 vol/vol). Se prepararon discos que contenían 25 µg de oritavancina en P80/Span 80 al 4 % y se dejaron secar durante aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente. Como se muestra en la Tabla 12, el aumento del porcentaje de la mezcla de P80/Span 80 en solución de un 0,5 a un 4 % aumentó el diámetro de la zona de inhibición. Basándose en estos descubrimientos, se usó una solución al 4 % de P80/Span 80 para los ensayos adicionales. Sin embargo, las zonas de inhibición en todas las condiciones sometidas a ensayo no fueron completamente concéntricas y tenían bordes dentados, dando como resultado la necesidad de estimar el diámetro de las zonas de inhibición. Se observó que la

superficie de agar estaba visiblemente arañada por los hisopos de punta de poliéster usados cuando se sembró con bacterias; por lo tanto, el tipo de hisopo se identificó como otra variable para explorar durante la optimización (posteriormente se presentan resultados adicionales).

5 Tabla 12. Efecto de la concentración total de excipiente (como porcentaje de P80/Span 80 en agua) en el diámetro de la zona de inhibición

Contenido del disco de oritavancina <sup>a</sup> (µg)	Porcentaje de P80/Span 80 en agua	Diámetro de la zona de inhibición <sup>b</sup> para MSSA ATCC 25923 (mm)
50	0,5	10
50	1	15
50	2	20
50	4	28

<sup>a</sup>Los discos se impregnaron con 20 µl de una solución de 2,5 mg/ml de oritavancina disuelta en el porcentaje indicado de mezcla de P80/Span 80 (35:65) y se dejaron secar durante aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente antes de su uso.

<sup>b</sup>Los diámetros de zona de inhibición no fueron totalmente concéntricos y carecieron de un margen definido y por lo tanto se muestran estimaciones del diámetro.

10 2) Proporción de P80/Span 80 en la solución de oritavancina. El ensayo de referencia preliminar que comparó las proporciones de P80/Span 80 (vol/vol) de 20:80, 35:65 y 50:50 reveló que una proporción 50:50 (1:1) dio como resultado mayores zonas de inhibición (no se muestran los datos). La proporción de P80/Span 80 se hizo variar además para determinar la proporción que daba como resultado los mayores diámetros de zona de inhibición. Se prepararon diferentes proporciones de P80/Span 80 (vol/vol) como se indica y se usaron para disolver oritavancina en polvo a una concentración de 2,5 mg/ml en solución de excipiente al 4 % (vol/vol). Los discos se impregnaron con 20 µl de las soluciones y se dejaron secar durante una noche antes de su uso. Como se muestra en la Tabla 13, la variación de la proporción de P80/Span 80 afectó considerablemente al diámetro de la zona de inhibición. Se determinó que la proporción óptima de P80/Span 80 era 1:1 (vol/vol). De forma similar al descubrimiento que se ha indicado anteriormente, las zonas de inhibición no fueron concéntricas dado que también se usaron hisopos de punta de poliéster en este experimento.

20 Tabla 13. Efecto de la proporción de P80/Span 80 en el diámetro de la zona de inhibición frente a aislados de *S. aureus*

Aislado de <i>S. aureus</i>	Fenotipo	MIC BMD de oritavancina (µg/ml)	Contenido del disco de oritavancina (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm) <sup>a</sup> obtenido con discos que contenían un 4 % de la proporción de P80/Span 80 indicada				
				50:50	60:40	70:30	80:20	90:10
ATCC 25923	MSSA	0,06	50	23	21	19	16	13
NRS2	hVISA	0,25	50	16	15	14	14	12
Mu50	VISA	1	50	10	11	12	12	12

<sup>a</sup>Los discos se impregnaron con 20 µl de una solución de 2,5 mg/ml de oritavancina disuelta en un 4 % de la proporción de P80/Span 80 indicada y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente antes de su uso. Los diámetros de zona de inhibición no fueron completamente concéntricos y carecieron de un margen definido y por lo tanto se muestran estimaciones del diámetro.

25 3) Carga del disco de oritavancina y tipo de hisopo. Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para optimizar el contenido del disco de oritavancina y para determinar si el tipo de hisopo podía afectar a la forma y al margen de la zona de inhibición, con un resultado deseado que fuera una zona más concéntrica con un margen definido. Se usaron soluciones de oritavancina que variaron de 0,625, 1,25, 2,5, 5 a 10 mg/ml en P80/Span 80 (1:1 vol/vol) al 4 % en agua para preparar discos que contenían 12,5, 25, 50, 100 y 200 µg de oritavancina, respectivamente. Los discos se secaron durante una noche a temperatura ambiente. Como se muestra en la Tabla 14, los diámetros de zona de inhibición para MSSA ATCC 25923 y hVISA NRS2 fueron los mayores con un contenido del disco de 25 µg de oritavancina y posteriormente disminuyeron con cantidades crecientes, indicando probablemente una importante interacción entre la oritavancina y la mezcla de tensioactivos. Los diámetros de la zona de inhibición variaron de acuerdo con la MIC BMD de los aislados de *S. aureus* sometidos a ensayo. Los hisopos de alginato de calcio produjeron zonas de inhibición concéntricas (y casi ningún efecto visualmente perceptible en la superficie de agar) con diámetros solo moderadamente menores en comparación con las zonas obtenidas con hisopos de algodón (Figura 2, *panel superior izquierdo*). A partir de este experimento, se seleccionó un contenido de disco de

oritavancina de 25 µg para evaluación adicional dado que produjo diámetros de zona de inhibición que podían discriminar entre cepas con un intervalo de MIC de oritavancina según se determina mediante BMD. También se descubrió que la siembra del agar con hisopos de alginato de calcio daba como resultado zonas de inhibición concéntricas y por lo tanto se seleccionaron los hisopos de alginato de calcio para estudio adicional.

5

Tabla 14. Efecto del contenido de disco de oritavancina y el tipo de hisopo en los diámetros de zona de inhibición frente a aislados de *S. aureus*

Contenido del disco de oritavancina <sup>a</sup> (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)					
	Hisopo de alginato de calcio <sup>b</sup>			Hisopo de algodón <sup>c</sup>		
	25923	NRS2	Mu50	25923	NRS2	Mu50
12,5	20	12,5	Ninguna zona	27	13	Ninguna zona
25	21	16	Ninguna zona	30	17	7
50	19	15	7	24	17	10
100	14	11	8	21	Ninguna zona	11
200	11	10	8	15	13	10

<sup>a</sup>Se prepararon soluciones de oritavancina en P80/Span 80 (1:1 (vol/vol)) al 4 % a concentraciones de 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/ml. Los discos se impregnaron con 20 µl con las soluciones y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente antes de su uso.

<sup>b</sup>Los diámetros de la zona de inhibición obtenidos con los hisopos de alginato de calcio fueron concéntricos.

<sup>c</sup>Los diámetros de la zona de inhibición no fueron totalmente concéntricos y carecieron de un margen definido y por lo tanto se muestran estimaciones del diámetro.

Se sometió a ensayo una diversidad de tipos de hisopo diferentes para determinar si otros tipos darían como resultado zonas de inhibición concéntricas comparables a las obtenidas con los hisopos de alginato de calcio. Se usó una solución de 1,25 mg/ml de oritavancina en P80/Span 80 (1:1 vol/vol) al 4 % para preparar discos con una cantidad final de 25 µg de oritavancina/disco. Los discos se secaron durante una noche a temperatura ambiente antes de su uso. Como se muestra en la Figura 2, el tipo de hisopo afectó drásticamente al diámetro y la forma de la zona de inhibición, como se observa con la mayor claridad en las zonas obtenidas con los hisopos de poliéster (*panel superior derecho*) y espuma (*panel inferior medio*). Los hisopos de alginato de calcio dieron como resultado zonas de inhibición concéntricas que se podían leer fácilmente (21 mm; *panel superior izquierdo*). Otra alternativa puede ser los hisopos de rayón, que dan como resultado un diámetro de la zona de inhibición de aproximadamente 22 mm y una zona casi concéntrica (*panel inferior izquierdo*). Los resultados muestran que los hisopos de alginato de calcio y posiblemente los hisopos de rayón (números de catálogo 25-806 2PA y 25-806 1PR, respectivamente; Puritan Medical Products Company, LLC) proporcionaron zonas concéntricas y se deberían usar para la siembra de bacterias en el ensayo de difusión con disco de oritavancina.

4) Tensioactivos con índices HLB similares a la mezcla 1:1 (vol/vol) de P80/Span 80. Se sometieron a ensayo otros tensioactivos con un índice de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) comparable al de la mezcla 1:1 (vol/vol) de P80/Span 80 (índice HLB = 9,7) para determinar si podían estimular la difusión de oritavancina en agar de forma similar a la mezcla 1:1 (vol/vol) de P80/Span 80. Se disolvió oritavancina en polvo a 1,25 mg/ml en Mergol SE (índice HLB = 10) al 5 %, Brij 30 (índice HLB = 9) al 5 % o poli(etilenglicol) hexaoleato de sorbitol (índice HLB = 10) al 1 %. Se impregnaron discos con 20 µl de las soluciones anteriores y se secaron durante una noche a temperatura ambiente. Como se muestra en la Tabla 15, los tensioactivos Mergol SE, Brij 30 y poli(etilenglicol) hexaoleato de sorbitol no dieron como resultado diámetros de la zona de inhibición que fueran mayores que el punto de corte aceptable mínimo (15 mm) indicado por el CLSI para MSSA ATCC 25923. De ese modo, estos agentes no se siguieron adicionalmente.

Tabla 15. Diámetros de la zona de inhibición obtenidos con otros tensioactivos frente a aislados de *S. aureus*

Aislado de <i>S. aureus</i>	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
	Mergol SE al 5 % <sup>a</sup>	Brij 30 al 5 % <sup>b</sup>	poli(etilenglicol) hexaoleato de sorbitol al 1 % <sup>c</sup>
ATCC 25923	10	8	9
NRS2	11	8	9
Mu50	9	Ninguna zona	8

<sup>a</sup>Los discos se impregnaron con 20 µl de una solución de 1,25 mg/ml de oritavancina disuelta en Mergol SE al 5 %.

<sup>b</sup>Los discos se impregnaron con 20 µl de una solución de 1,25 mg/ml de oritavancina disuelta en Brij 30 al 5 %.

<sup>c</sup>Los discos se impregnaron con 20 µl de una solución de 1,25 mg/ml de oritavancina disuelta en poli(etilenglicol) hexaoleato de sorbitol al 1 %.

5) Validación del ensayo de difusión con disco de oritavancina. Se sometió a ensayo una serie ampliada de aislados de *S. aureus* con diversos fenotipos para determinar si los diámetros de la zona de inhibición variarían de acuerdo con sus MIC BMD. Se usó una solución de 1,25 mg/ml de oritavancina en P80/Span 80 (1:1 vol/vol) al 4 % para preparar discos con una cantidad final de 25 µg de oritavancina/disco. Los discos se secaron durante una noche a temperatura ambiente antes de su uso. Como se muestra en la Tabla 16, el diámetro de la zona de inhibición para MSSA ATCC 25923 fue 22 mm (Figura 3, *panel izquierdo*), considerablemente mayor que el diámetro de zona mínimo de 15 mm recomendado por el CLSI. De forma similar, las zonas de inhibición para MSSA ATCC 29213 y MRSA 33591 fueron 24 y 22 mm, respectivamente. De forma importante, los diámetros de la zona de inhibición disminuyeron generalmente con el aumento de la MIC BMD del aislado (Tabla 16). Los fenotipos VISA y hVISA también parecieron afectar al diámetro de la zona de inhibición ya que no fue evidente ninguna zona para los aislados de VISA NRS402, NRS3 o Mu50 (Figura 3, *panel medio*) mientras que el aislado de hVISA NRS36, con idéntica MIC BMD que los aislados de VISA (1 µg/ml), produjo un diámetro de la zona de inhibición de 11 mm. Además, los diámetros de zona para los aislados sometidos a ensayo de hVISA NRS2 (Figura 3, *panel derecho*) y NRS36 parecieron tener menores zonas de inhibición completas con respecto a los aislados de tipo salvaje (susceptibles a vancomicina, no hVISA) y presentaron colonias satélites en la zona de inhibición.

Tabla 16. Diámetros de la zona de inhibición para aislados de *S. aureus* que exhiben un intervalo de MIC BMD

Aislado de <i>S. aureus</i>	Fenotipo	MIC BMD de oritavancina (µg/ml)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)
ATCC 25923	MSSA	0,06	22
ATCC 29213	MSSA	0,06	24
ATCC 33591	MRSA	0,06	22
U206056	MRSA	0,25	17
NRS2	hVISA	0,25	10
NRS36	hVISA	1	12
Mu50	VISA	1	Ninguna zona
NRS402	VISA	1	Ninguna zona
NRS3	VISA	1	Ninguna zona

6) Validación adicional del ensayo de difusión con disco de oritavancina. El ensayo con disco de oritavancina con las condiciones recién descritas (discos impregnados con 20 µl de 1,25 mg/ml de oritavancina en P80/Span 80 al 4 %, 1:1 vol/vol; siembra de bacterias con hisopos de alginato de calcio) se sometió a ensayo además frente a un conjunto de 24 aislados de *S. aureus* por duplicado como sigue a continuación: 19 aislados clínicos con MIC BMD que eran representativas de la susceptibilidad de tipo salvaje a oritavancina (MIC ≤ MIC<sub>90</sub> de 0,12 µg/ml para *S. aureus*), dos aislados clínicos con MIC BMD de 0,25 µg/ml, y los aislados de referencia MSSA ATCC 25923, hVISA NRS2 y VISA Mu50. Como se muestra en la Tabla 17, los diámetros de la zona de inhibición para los 19 aislados clínicos de tipo salvaje variaron de 20 a 24 mm. Los dos aislados con MIC BMD de 0,25 µg/ml (U206056 y Q670505) presentaron ambos diámetros de la zona de inhibición de 18 mm. Los diámetros de la zona de inhibición para las tres cepas de referencia ATCC 25923, hVISA NRS2 y VISA Mu50 fueron similares a los valores descritos anteriormente (compárense los valores de la Tabla 17 con los informados en la Tabla 16).

Tabla 17. Diámetros de la zona de inhibición obtenidos para aislados clínicos y cepas de referencia de *S. aureus*

Aislado de <i>S. aureus</i>	Fenotipo	MIC BMD de oritavancina (µg/ml)	Diámetro de la zona de inhibición (mm) <sup>a</sup>
ATCC 25923	MSSA	0,06	20,21
NRS2	hVISA	0,25	12, 12
Mu50	VISA	1	Ninguna zona
U206056	MRSA	0,25	18, 18
Q141066	MSSA	0,03	20, 20
Q670505	MRSA	0,25	18, 18
S815246	MSSA	0,03	21, 22
T759545	MSSA	0,015	22, 22
T998528	MRSA	0,015	21, 21

Aislado de <i>S. aureus</i>	Fenotipo	MIC BMD de oritavancina (µg/ml)	Diámetro de la zona de inhibición (mm) <sup>a</sup>
U148267	MSSA	0,015	21, 21
U781969	MSSA	0,03	22, 23
U933236	MSSA	0,06	21, 22
V257345	MRSA	0,12	21, 22
V406957	MRSA	0,12	21, 21
Q141067	MRSA	0,015	21, 22
Q670607	MRSA	0,03	21, 22
S815247	MSSA	0,015	20, 21
T811355	MSSA	0,03	21, 22
T998608	MRSA	0,03	22, 22
U260847	MRSA	0,06	21, 22
U784439	MRSA	0,03	20, 20
U933237	MRSA	0,12	21, 22
V288615	MRSA	0,03	23, 23
V406985	MSSA	0,12	24, 24

<sup>a</sup>Los discos se impregnaron con 20 µl de una solución de 1,25 mg/ml de oritavancina en P80/Span 80 (1:1 [vol/vol]) al 4 % y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente antes de su uso.

5 La invención de la presente solicitud se ha descrito anteriormente tanto genéricamente como con respecto a realizaciones específicas. Aunque la invención se ha expuesto en lo que se cree que son las realizaciones preferentes, se puede seleccionar una amplia diversidad de alternativas conocidas por los expertos en la materia dentro de la divulgación genérica. La invención no se limita de otro modo, salvo por la enumeración de las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un ensayo de difusión con disco para determinar la susceptibilidad de bacterias a oritavancina, comprendiendo dicho ensayo:
- 5 a) impregnar un disco de papel con una solución que comprende oritavancina, polisorbato 80 y Span 80,  
 b) colocar el disco impregnado sobre la superficie de una placa de medio de cultivo revestida con bacterias,  
 c) incubar la placa de b) en condiciones que estimulen el crecimiento bacteriano, y  
 d) medir una zona de inhibición alrededor del disco,
- 10 en el que el ensayo produce un diámetro de la zona de inhibición  $\geq 15$  mm cuando se usa la cepa de control de calidad del CLSI *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (MSSA) 25923.
2. El ensayo de difusión con disco de la reivindicación 1, en el que la oritavancina está presente en la solución en una concentración entre 0,5 y 5 mg/ml.
- 15 3. El ensayo de difusión con disco de la reivindicación 1, en el que la oritavancina está presente en la solución en una concentración de aproximadamente 1,25 mg/ml.
4. El ensayo de difusión con disco de la reivindicación 1, en el que el disco se impregna con aproximadamente 25  $\mu$ g de oritavancina.
- 20 5. El ensayo de difusión con disco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una proporción de 60:40 a 40:60 v/v.
- 25 6. El ensayo de difusión con disco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una proporción de aproximadamente 50:50 v/v.
7. El ensayo de difusión con disco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una proporción de 60:40 a 40:60 v/v y en el que el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una concentración combinada entre un 2,5 % y un 5,5 % v/v.
- 30 8. El ensayo de difusión con disco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una proporción de 60:40 a 40:60 v/v y en el que el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una concentración combinada de aproximadamente un 4 % v/v.
- 35 9. El ensayo de difusión con disco de la reivindicación 1, en el que la oritavancina está presente en una concentración de aproximadamente 1,25 mg/ml, y en el que el polisorbato 80 y el Span 80 están presentes en la solución en una concentración combinada de aproximadamente un 4 % v/v y en una proporción de aproximadamente 50:50 v/v.
- 40 10. El ensayo de difusión con disco de la reivindicación 9, en el que el disco se impregna con aproximadamente 25  $\mu$ g de oritavancina.
11. El ensayo de difusión con disco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 9-10, en el que el disco impregnado se seca a temperatura ambiente antes de que se coloque sobre la placa de medio de cultivo revestida con bacterias.
- 45 12. El ensayo de difusión con disco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 9-10, en el que la etapa c) de incubación se lleva a cabo a aproximadamente 37 °C.
- 50

Figura 1

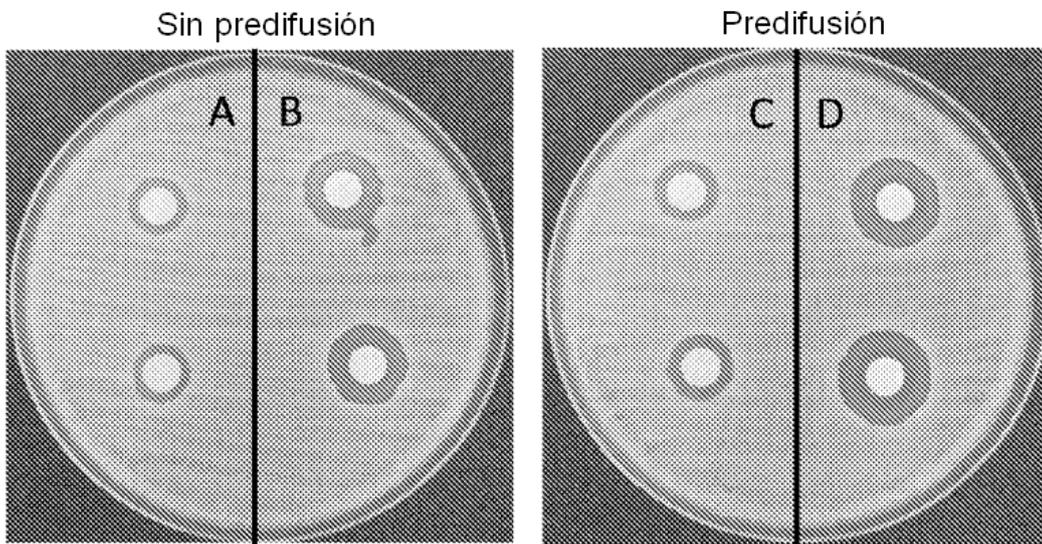


Figura 2

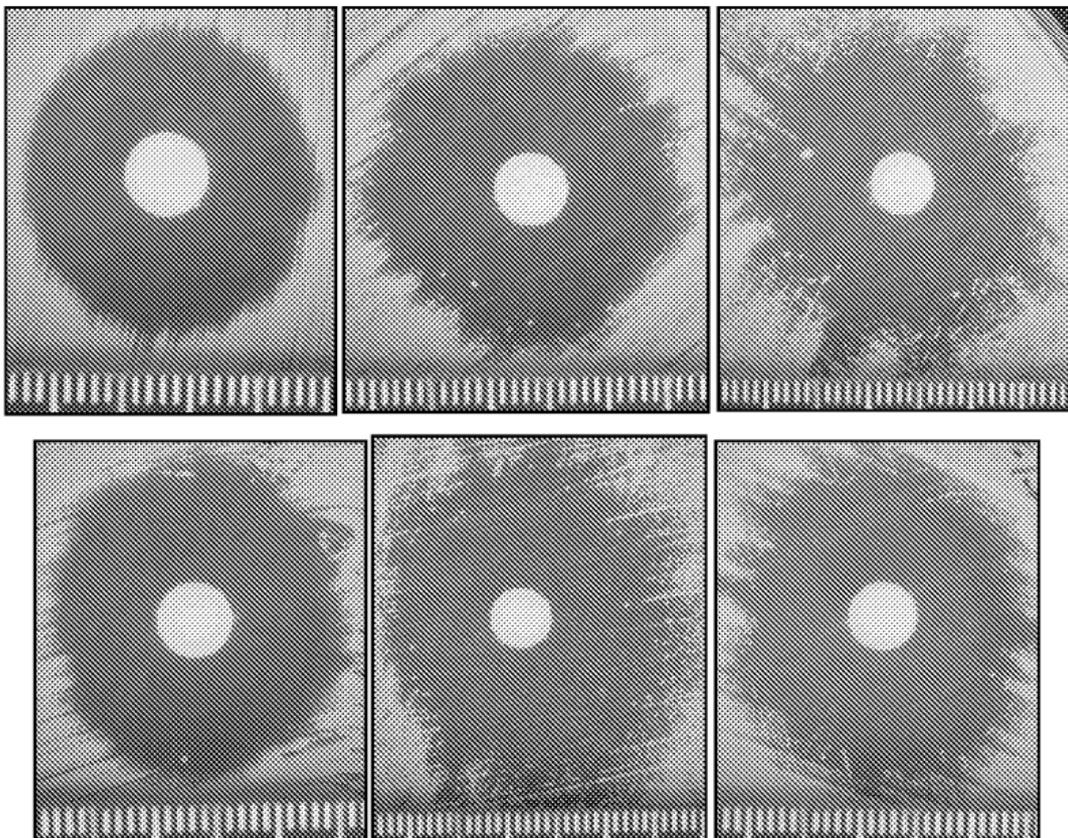


Figura 3

