

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 127**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2010 E 15197806 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 3023503**

54 Título: **Metodos de determinación de resistencia a antibioticos en microorganismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2017

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (100.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GD Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**LUIDER, THEO MARTEN;
VAN KAMPEN, JEROEN JACOB ALEXANDER;
VAN BELKUM, ALEXANDER FRANCISCUS;
GOESSENS, WILHELMUS HUBERTUS
FRANCISUS y
HOOFF, GERO PETER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

ES 2 622 127 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

Métodos de determinación de resistencia a antibióticos en microorganismos

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico bacteriano y se refiere en particular a un método para determinar la resistencia a los antibióticos de un microorganismo.

10 Antecedentes de la invención

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico. Esta resistencia se desarrolla a través de mutaciones genéticas e intercambio de plásmidos entre microorganismos. La resistencia a los antibióticos tiene ya unas consecuencias considerables en la medicina, y estas no dejarán de aumentar en los próximos años.

Uno de los grupos de microorganismos oportunistas que han suscitado un renovado interés por mostrar resistencia a los antibióticos son las enterobacteriáceas. Esta especie bacteriana (que incluye, por ejemplo, *Klebsiella* y *Escherichia coli*) comprende patógenos oportunistas que se han asociado, entre otros, a infecciones urinarias, septicemia, infecciones respiratorias y diarrea. La resistencia de estas especies a cefalosporinas de tercera generación como los oximinobetalactámicos es conocida desde hace 30 años, pero desde entonces se ha registrado un aumento potencial de la resistencia. Las cepas adquieren la resistencia sintetizando las denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que son betalactamasas de clase molecular A capaces de inactivar cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefotaxima y cefpodoxima), así como monobactámicos (aztreonam). Las BLEE son derivados de las betalactamasas comunes (p. ej., las betalactamasas de tipo TEM y SHV) que han sido objeto de una o más sustituciones de aminoácidos cerca del sitio activo de la enzima, aumentando con ello su afinidad por y la actividad hidrolítica contra las cefalosporinas de tercera generación y los monobactámicos. La extendida utilización de cefalosporinas de nueva generación impulsa el desarrollo de una gama cada vez más amplia de nuevas BLEE. Las BLEE son codificadas por plásmidos conjugativos transferibles, que son responsables de la propagación de la resistencia a otras bacterias gramnegativas.

Las BLEE se clasifican en más de 450 tipos sobre la base de sus propiedades físicas, y presentan una inhibición variable por clavulanato, sulbactam y tazobactam, propiedad esta que se ha utilizado para detectarlas en el laboratorio. Actualmente, en el laboratorio de microbiología clínica únicamente se realizan pruebas fenotípicas de detección de BLEE. Se están desarrollando pruebas moleculares (genotípicas). No obstante, un problema de las pruebas moleculares es la ausencia de una correlación absoluta entre el genotipo y el fenotipo. Por lo tanto, el valor predictivo de las pruebas moleculares para cualquier fenotipo bacteriano, incluidas las bacterias que sintetizan BLEE, es limitado.

En general, las pruebas de laboratorio fenotípicas actuales son más sensibles y específicas que las pruebas genotípicas confirmatorias de BLEE. Todas las pruebas de detección fenotípica de BLEE se basan en el mismo principio: las pruebas evalúan la variación en la inhibición de crecimiento bacteriano en presencia de antibióticos betalactámicos o combinaciones de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas. Existen diversas pruebas manuales y plataformas automatizadas en el mercado para realizar estas pruebas fenotípicas. Las pruebas manuales utilizan discos o tiras impregnadas con antibióticos betalactámicos o combinaciones de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas. El material impregnado se coloca sobre un medio sólido en donde se ha inoculado previamente una suspensión bacteriana de densidad conocida. Se incuba durante toda la noche y, al día siguiente, se determina visualmente la inhibición del crecimiento, que se puede cuantificar sobre la base del diámetro de las zonas de inhibición. Los sistemas automatizados también se basan en la medición del crecimiento bacteriano en presencia de paneles de antibióticos betalactámicos o combinaciones de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas con diferentes concentraciones. Los resultados de estos sistemas se obtienen tras 4-18 horas.

Un artículo de Yazawa *et al.* («Inactivation Of Kanamycin A by

Phosphorylation in Pathogenic Nocardia», *Microbiology and Immunology*, vol. 35, n.º 1, 1991, págs. 39-48) da a conocer un método para caracterizar la resistencia a los antibióticos de un microorganismo, donde los productos de modificación del antibiótico kanamicina A, originado por la puesta en contacto de la kanamicina A con el lisado celular de cinco especies nocardióceas patógenas diferentes, se identifican mediante ensayos y espectroscopia de masas y de RMN.

Un artículo de Mosher *et al.* («Inactivation of chloramphenicol by 0-phosphorylation: A novel resistance mechanism in *Streptomyces venezuelae* ISP5230, a chloramphenicol producer», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, n.º 45, 1995, págs. 27 000-27 006) da a conocer un método para caracterizar la resistencia a los antibióticos de un microorganismo, donde el producto de modificación del antibiótico cloranfenicol, originado al poner en contacto el cloranfenicol y el medio de cultivo celular de *Streptomyces lividans*, se detecta mediante espectrometría de masas.

Actualmente se necesitan medios y métodos capaces de diagnosticar con mayor rapidez bacterias sintetizadoras de BLEE. También es necesaria una prueba de detección de BLEE que pueda utilizarse en el laboratorio de microbiología clínica para caracterizar las enzimas BLEE en términos de cinética enzimática, con el fin de realizar un seguimiento de las tendencias evolutivas y evaluar y predecir la dosis eficaz para el tratamiento antibiótico. Estos medios se utilizan preferentemente para caracterizar la resistencia a antibióticos en microorganismos en general.

Resumen de la invención

La presente invención da a conocer ahora métodos para un rápido diagnóstico de microorganismos sintetizadores de enzimas que modifican la acción de los antibióticos, en particular (en preparaciones preferidas de) microorganismos que sintetizan BLEE.

En primer lugar, la presente invención da a conocer un método para establecer si un microorganismo es potencialmente resistente a un antibiótico betalactámico, que se compone de los siguientes pasos:

- a) proporcionar un espectro de masas de referencia del antibiótico betalactámico o su producto de modificación enzimática;
- b) exponer un microorganismo, un lisado celular del mismo o el sobrenadante de un medio de crecimiento del mismo a dicho antibiótico betalactámico en líquido acuoso para, de ese modo, obtener una muestra expuesta;
- c) adquirir un espectro de masas de la muestra expuesta;
- d) comparar el espectro de masa obtenido en el paso c) con el espectro de masa de referencia del paso a) y
- e) determinar a partir de dicha comparación si se ha producido una modificación del antibiótico betalactámico y establecer si dicho microorganismo es potencialmente resistente a dicho antibiótico betalactámico cuando se observa dicha modificación, donde tras el paso b) dicha muestra expuesta se coloca, junto con un material de matriz, en un soporte de muestras para espectrometría de masas y donde dicha muestra se seca para obtener una muestra de espectrometría de masas para la espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS).

En una preparación preferida de dicho método, la modificación comprende la inactivación enzimática o la degradación enzimática del mencionado antibiótico betalactámico. Más preferentemente, la degradación enzimática está causada por una betalactamasa. El antibiótico betalactámico se selecciona preferentemente del grupo formado por penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos, más preferentemente seleccionados del grupo formado por ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima y aztreonam.

En otra preparación preferida de un método de la invención, el método se realiza exponiendo dicho microorganismo a múltiples compuestos antimicrobianos simultáneamente, caracterizando de este modo la resistencia a los antibióticos de dicho microorganismo para múltiples compuestos antibióticos.

En preparaciones especialmente preferidas, la enzima betalactamasa se puede seleccionar del grupo formado por cefalosporinasas (incluidas las cefalosporinasas de espectro extendido), penicilinasas, carbenicilinasas, cloxacilinasas y carbapenemasas.

En otra preparación aún más preferida del método de la invención, la enzima betalactamasa es una betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

En otra preparación aún más preferida de dicho método, el microorganismo es sospechoso de sintetizar BLEE y es preferentemente una bacteria gramnegativa, y más preferentemente una bacteria gramnegativa seleccionada de entre *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis*.

Las muestras utilizadas en aspectos de la invención comprenden microorganismos o productos de la lisis de los mismos. Las muestras de microorganismos pueden ser muestras de cultivos de microorganismos. No es necesario que estos cultivos sean cultivos puros. Alternativamente, la muestra puede obtenerse a partir de medios de cultivo o material clínico directo.

Preferentemente, el método de caracterización de dicha enzima de acuerdo con la invención comprende la determinación del grado de modificación, preferentemente degradación, de dicho antibiótico betalactámico con o sin presencia de inhibidores enzimáticos específicos y/o la velocidad de producción del producto de modificación enzimática de dicho compuesto o sustrato o la velocidad de superproducción de la diana molecular de dicho compuesto para, de esta forma, determinar la constante Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima de reacción ($V_{máx}$) de dicha enzima.

En otra preparación preferida de dicho método, los espectros de masas se obtienen mediante espectrometría de masas MALDI con analizador de triple cuadrupolo.

En otra preparación preferida de dicho método, la muestra expuesta es un lisado celular crudo expuesto de dicho microorganismo.

En otra preparación preferida de dicho método, el método comprende además el paso de cuantificación del microorganismo. Preferentemente, el microorganismo se cuantifica contando en dichas muestras una o más biomoléculas estructurales o metabolitos derivados de dicho microorganismo. En preparaciones preferidas, las biomoléculas estructurales o los metabolitos se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos, preferentemente ADN (genómico). El ADN está presente dentro de la célula como una única molécula y se puede cuantificar utilizando, por ejemplo, tecnologías con sondas de ADN y/o PCR.

Se describe un programa de ordenador que comprende medios de código para realizar todos los pasos del método de la invención, tal y como se ha descrito arriba, cuando dicho programa se ejecuta en un ordenador.

Se describe un programa de ordenador que comprende medios de código almacenados en un medio legible por un ordenador para realizar el método de la invención, tal y como se ha descrito, cuando dicho programa se ejecuta en un ordenador.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos «antibiótico» y «compuesto antimicrobiano» se utilizan aquí de forma intercambiable y se emplean para describir un compuesto que reduce la viabilidad de un microorganismo, o que inhibe el crecimiento o reproducción de un microorganismo. «Inhibe el crecimiento o reproducción» significa que aumenta la duración del ciclo de generación a un periodo que es al menos dos veces superior, preferentemente al menos diez veces superior, más preferentemente al menos 100 veces superior, y aún más preferente aumenta indefinidamente, como en la muerte celular total. Tal y como se utiliza en esta memoria, se prevé además que el antibiótico incluya una sustancia antibacteriana, bacterioestática o bactericida. Algunos ejemplos de antibióticos útiles en aspectos de la invención son las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, sulfonamidas, macrolidas, tetraciclinas, lincosamidas, quinolonas, cloranfenicol, glucopéptidos, metronidazol, rifampicina, isoniazida, espectinomina, inhibidores de folato, sulfametoxazol y otros antibióticos.

El término «antibiótico betalactámico» se utiliza para designar compuestos con propiedades antibióticas que incluyan un grupo funcional betalactámico. Un anillo betalactámico (β -lactámico) es una amida cíclica que comprende una estructura anular heteroatómica formada por tres átomos de carbono y uno de nitrógeno. Algunos ejemplos de antibióticos betalactámicos útiles en aspectos de la invención son las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, penémicos, carbapenémicos y monobactámicos. Los antibióticos betalactámicos son eficaces (si no hay resistencia) frente a una amplia gama de infecciones bacterianas. El término «antibiótico betalactámico», tal y como se utiliza aquí, incluye cualquier antibiótico que experimente cambios de masa o estructura tras ser inactivado por un microorganismo resistente a los antibióticos, siempre que dicho cambio de masa o estructura pueda detectarse mediante espectrometría de masas.

El término «cefalosporina de tercera generación» se refiere a este tipo de compuestos e incluye, de forma no exhaustiva: cefixima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefcapene, cefdaloxima, cefdinir, cefditoren, cefetamet, cefmenoxima, cefodizima, cefoperazona, cefotaxima, cefpimizol, cefpiramida, cefpodoxima, cefsulodina, cefteteram, ceftibuteno, ceftioleño, ceftizoxima y oxacefem.

El término «betalactamasa» hace referencia a una enzima (EC 3.5.2.6) sintetizada por un microorganismo, preferentemente una bacteria, que tiene la capacidad de hidrolizar el anillo betalactámico de los antibióticos betalactámicos. Estas enzimas a menudo se clasifican en cuatro clases principales (clases A, B, C y D) de acuerdo con un sistema de clasificación denominado Ambler, basado principalmente en la homología proteínica. Entre los ejemplos de betalactamasas se incluyen la cefalosporinasa, penicilinas, carbenicilinas, cloxacilinas, carbapenemasa y ceftazidimasa. Esto significa que el término incluye la betalactamasa «normal», la betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y la betalactamasa AmpC. Las betalactamasas preferidas en aspectos de la presente invención son las betalactamasas de los grupos A y D de acuerdo con la clasificación Ambler o enzimas betalactámicas pertenecientes al grupo 2 de acuerdo con la clasificación de Bush (Bush *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 39, 1995, págs. 1211-33). Las betalactamasas de la clase A de Ambler son las clásicas betalactamasas con serina en su sitio activo y las de la clase D son un grupo específico de serino-betalactamasas que presentan una reducida similitud secuencial con las betalactamasas de clase A y que se conocen coloquialmente como el grupo OXA (oxacilinas). También la metalo-carbapenemasa es una betalactamasa preferida.

El término «betalactamasa de espectro extendido» (abr. BLEE), tal y como se emplea aquí, inicialmente denominada «betalactamasa de amplio espectro extendido», fue acuñado por primera vez para derivados de enzimas TEM y SHV capaces de hidrolizar oximino-cefalosporinas. Todas ellas pertenecen al grupo funcional de betalactamasas 2be. Posteriormente el término se ha ampliado para incluir: (i) enzimas con espectros parecidos a los de los mutantes TEM y SHV pero derivados de otras fuentes, p. ej. los tipos CTX-M y VEB; (ii) mutantes TEM y SHV con actividad BLEE en el límite, p. ej. TEM-12; y (iii) diversas betalactamasas que proporcionan una resistencia más amplia que sus tipos originarios pero que no cumplen la definición del grupo 2be, p. ej. los derivados de OXA y los

tipos AmpC mutantes con una mayor actividad contra la cefepima.

Los términos «resistente» y «resistencia», tal y como se utilizan aquí, se refieren al fenómeno de que un microorganismo no presente una viabilidad reducida o una inhibición de crecimiento o reproducción cuando se expone a concentraciones de la sustancia antimicrobiana que pueden alcanzarse con las pautas posológicas terapéuticas normales en humanos. Implica que una infección causada por este microorganismo no puede tratarse satisfactoriamente con esta sustancia antimicrobiana.

El término «microorganismo», tal y como se utiliza aquí, se refiere concretamente a microorganismos patógenos, como las bacterias, levaduras, hongos y parásitos intra o extracelulares. En aspectos preferidos de la presente invención, el término se refiere a bacterias patógenas u oportunistas. Estas incluyen tanto a bacterias grampositivas como gramnegativas. Como bacterias gramnegativas cabe mencionar las bacterias de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Providencia*, *Actinobacillus*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Cedecea*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* y *Legionella*. Como bacterias grampositivas cabe mencionar las bacterias de los siguientes géneros: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Gardnerella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacteria* y *Corynebacteria*. En cuanto a las levaduras y hongos, se pueden mencionar las levaduras de los siguientes géneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*.

El término «espectro de masa», tal y como se utiliza aquí, se refiere a una representación gráfica cuya variable independiente sea la masa molecular o una función de esta (p. ej. el cociente de masa/carga [m/z], la masa de iones, etc.). La variable dependiente suele ser una medida cuantitativa, como la abundancia, la abundancia relativa, la intensidad, la concentración, el número de iones, el número de moléculas, el número de átomos, cuentas/milivoltio, cuentas, etc. Por ejemplo, en el contexto de los iones, un espectro de masa suele presentar el cociente de masa/carga (m/z) como variable independiente, donde *m* es la masa de la especie iónica y *z* es la carga de la especie iónica, y la variable dependiente es generalmente una abundancia de cada ion molecular y/o sus fragmentos iónicos. El término «ion» se refiere a un átomo o un grupo de átomos que ha adquirido una carga eléctrica neta mediante la ganancia o pérdida de uno o más electrones o la ganancia o pérdida de uno o más protones. Un ion puede formarse de numerosos modos, incluida la ruptura de una molécula de gas por la acción de una corriente eléctrica, de rayos ultravioleta y otros rayos determinados, y/o de temperaturas elevadas.

El término «espectro de masa de referencia», como se utiliza aquí, se refiere a un espectro de masa de control utilizado como referencia para el análisis comparativo.

El término «sustrato de una enzima modificadora», tal y como se utiliza aquí, se refiere a cualquier compuesto (antibiótico o no) que pueda ser hidrolizado por una enzima modificadora de antibióticos. La modificación enzimática de dicho sustrato dará lugar a un producto de reacción con un cociente de masa/carga (o espectro de masa) diferente al del sustrato original. El producto de reacción, en caso de que la conversión enzimática sea una degradación, puede mencionarse aquí como «producto de degradación».

El término «enzima modificadora», tal y como se utiliza aquí, se refiere de manera amplia a una enzima modificadora de compuestos antimicrobianos, como por ejemplo una betalactamasa.

«Modificación», tal y como se utiliza aquí, se refiere a una alteración química o física (preferentemente química) del compuesto antimicrobiano que lo inactiva en lo que respecta a su actividad antimicrobiana. La modificación puede incluir una degradación, que se refiere a la eliminación de fracciones de la molécula del compuesto, lo cual resulta en una masa molecular más reducida, opcionalmente en combinación con un cociente de masa/carga alterado. De forma alternativa, la modificación puede incluir la sustitución o adición de fracciones químicas en la molécula del compuesto, inactivando así el compuesto en lo que respecta a su actividad antimicrobiana, modo este de modificación que altera la masa de la molécula, opcionalmente en combinación con un cociente de masa/carga alterado.

El término «lisado celular», tal y como se utiliza aquí, se refiere a suspensiones celulares o fracciones de las mismas obtenidas por disrupción o lisado de las células. El lisado celular crudo contiene todas las proteínas, glucoproteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos. En los aspectos de la presente invención, el lisado celular puede comprender células enteras, pero consiste principalmente en partes de células o cualquier fracción o mezcla de las mismas obtenidas tras una fase de lisis. No obstante, las disoluciones de lisado celular pueden incluir, entre otros, una disolución de células lisadas tratada de tal forma que las moléculas seleccionadas son eliminadas o inactivadas. La consecuencia es que esta disolución permanece esencialmente «cruda» en lo que respecta a la mayoría de componentes celulares purificados. Por ejemplo, un lisado celular puede ser una disolución de células lisadas tratada con una sustancia que inactive o elimine los inhibidores de la polimerasa. Además, un lisado celular puede ser una disolución de células lisadas tratada con un anticoagulante. Se puede utilizar cualquier método para realizar la lisis celular en una muestra celular. Por ejemplo, el choque osmótico, la sonicación, el calentamiento, la ruptura física, el tratamiento con microondas y la lisis enzimática y/o alcalina son métodos aplicables para llevar a cabo la

lisis celular.

El término «medio de cultivo», tal y como se utiliza aquí, se refiere a un medio que comprende todos los elementos necesarios para la expresión de un metabolismo y/o para el cultivo de microorganismos. El medio de cultivo puede ser sólido, semisólido o líquido. El medio de cultivo puede comprender uno o más elementos en combinación, como aminoácidos, peptonas, hidratos de carbono, nucleótidos, minerales, vitaminas, moléculas activas como antibióticos, enzimas, tensioactivos, tampones químicos, sales de fosfatos, sales de amonio, sales de sodio, sales metálicas, uno o más sustratos que posibiliten la detección de la actividad de una enzima, etc.

El término «sobrenadante», tal y como se utiliza aquí, se refiere a la suspensión líquida que permanece una vez se retiran las células que han crecido en un medio líquido (p. ej. un caldo) mediante centrifugación, filtrado, sedimentación u otros métodos habituales en este campo, y que contiene material disuelto y suspendido.

Los términos «material de matriz» y «material de matriz para MALDI», tal y como se utilizan aquí, son intercambiables y se refieren a un compuesto, ya sea en disolución o sólido, que puede usarse para formar una matriz para su uso en la espectrometría de masas MALDI. Para MALDI, el analito debe estar incrustado en un exceso considerable de moléculas con un alto nivel de absorción a la longitud de onda a la que emite el láser. Estas moléculas de la matriz son generalmente compuestos orgánicos pequeños, principalmente ácidos. Los materiales de matriz adecuados para cada tipo de láser utilizado en MALDI son conocidos en este campo, y el término «material de matriz para MALDI» será entendido claramente por un experto en la materia. Sin limitar el alcance de la presente invención, algunos ejemplos de materiales de matriz utilizados habitualmente son el ácido sinapínico (SA), el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), la 7-hidroxi-4-(trifluorometil)cumarina (HFMC), el ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), el 5-(trifluorometil)uracilo, el ácido cafeico, el ácido succínico, el ácido antranílico, el ácido 3-aminopiracina-2-carboxílico, la tetraquis(pentafluorfenil)porfirina y el ácido felúrico. Las matrices se disuelven adecuadamente en acetónitrilo/agua/ácido fórmico (500:500:1; v/v/v), u otro cociente adecuado en función de la matriz utilizada.

El término «muestra», tal y como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que contiene o que se sospecha que contiene un analito, como un microorganismo o una betalactamasa por caracterizar, un sustrato de la betalactamasa o el producto de degradación de la betalactamasa. Una muestra útil en un método de la invención puede ser un líquido o un sólido, puede estar disuelta o suspendida en un líquido, puede estar en una emulsión o gel, y puede estar unida a o absorbida por un material. Una muestra puede ser una muestra biológica, una muestra ambiental, una muestra experimental, una muestra diagnóstica o cualquier otro tipo de muestra que contenga o se sospeche que contiene el analito de interés. Como tal, una muestra puede ser, o puede contener, un organismo, órgano, tejido, célula, fluido corporal, muestra de biopsia o fracción de los mismos. Una muestra útil en un método de la invención puede ser cualquier material que se sospeche que contiene analitos, como sustratos de betalactamasas y BLEE. En un contexto biológico, una muestra puede incluir fluidos biológicos, organismos enteros, órganos, tejidos, células, microorganismos, sobrenadantes de cultivo, orgánulos subcelulares, complejos proteínicos, proteínas individuales, proteínas recombinadas, proteínas de fusión, virus, partículas víricas, péptidos y aminoácidos.

El término «soporte de la muestra», tal y como se utiliza aquí, se refiere a todos los soportes que son aptos para recibir una muestra para el análisis de espectrometría de masas MALDI. Es habitual el uso de placas de acero inoxidable de 10 x 10 (PerSeptive Biosystems, Framingham [MA, EE.UU.]); si fuera necesario, las placas pueden tener un revestimiento hidrofóbico.

El término «constante de Michaelis-Menten», a menudo denominada «Km», se refiere, tal y como se utiliza aquí, a la concentración del sustrato a la que la velocidad de reacción enzimática alcanza la mitad de su valor máximo. El término «velocidad máxima de reacción», a menudo referida como «V_{máx}», se refiere a la velocidad máxima de una reacción enzimática a concentraciones de saturación de sustrato. La cinética de Michaelis-Menten describe la velocidad de producción de moléculas causada por reacciones químicas enzimáticas. Para determinar la velocidad máxima de una reacción enzimática, la concentración del sustrato se aumenta hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto. Esta es la velocidad máxima (V_{máx}) de la enzima. En este estado, los sitios activos de la enzima están saturados con sustrato. Puesto que la concentración de sustrato a V_{máx} no se puede medir con exactitud, las enzimas pueden caracterizarse por la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es la mitad de su valor máximo. Esta concentración de sustrato se denomina constante de Michaelis-Menten (Km). En el caso de reacciones enzimáticas que presenten una cinética de Michaelis-Menten simple, esta constante constituye la constante de disociación (afinidad por el sustrato) del complejo enzima-sustrato (ES). Los valores bajos indican una elevada afinidad.

El término «espectrometría de masas MALDI con analizador de triple cuadrupolo», tal y como se utiliza aquí, se refiere a una técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz en la que el espectrómetro de masas tiene tres cuadrupolos paralelos a la trayectoria de los iones entrantes. El primer cuadrupolo actúa como filtro de masa. El segundo cuadrupolo actúa como celda de colisión, en donde los iones seleccionados se rompen en fragmentos. Los fragmentos resultantes son escaneados por un tercer cuadrupolo. Los analizadores de masa de cuadrupolos utilizan campos eléctricos oscilantes para estabilizar o desestabilizar selectivamente las trayectorias de los iones que atraviesan un campo cuadrupolar de radiofrecuencia (RF). En cada momento, a través del sistema pasa un único

cociente de masa/carga, pero las variaciones de los potenciales en las lentes magnéticas permiten que se cubra rápidamente una amplia gama de valores m/z , bien sea de forma continua o en una sucesión de saltos discontinuos. Un analizador de masa de cuadrupolo actúa como filtro de masa.

5 El término «cuantificación», tal y como se utiliza aquí, se refiere a cualquier método para obtener una medida cuantitativa. Por ejemplo, la cuantificación de un microorganismo puede comprender la determinación de su abundancia, abundancia relativa, intensidad, concentración y/o recuento, etc.

10 El término «biomolécula estructural», tal y como se utiliza aquí, se refiere a cualquier proteína celular, glucoproteína, polisacárido, lípido, ácido nucleico, etc., cuya cantidad es esencialmente constante entre cada una de las células de un cultivo de microorganismos, y que se puede utilizar para cuantificar esos microorganismos. Si, por ejemplo, se utiliza ADN, la cuantificación se puede realizar mediante la amplificación de ADN o el uso de sondas de ácidos nucleicos (identificables mediante espectrometría de masas). Estos métodos de cuantificación pueden utilizar, por ejemplo, curvas de calibración estándar en donde el contenido de ADN se representa en función del número de células u otro parámetro de biomasa (como la absorbancia en el cultivo o la masa total de carbono).

15 El término «metabolito», tal y como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto generado como resultado de una reacción bioquímica en una célula u organismo, cuya cantidad es esencialmente constante entre cada una de las células de un cultivo de microorganismos, y que se puede utilizar para cuantificar esos microorganismos.

20 *Preparaciones preferidas*

La invención da a conocer un método para caracterizar la resistencia a los antibióticos de un microorganismo. Un primer paso de ese método es el suministro de uno o más espectros de masa de referencia de compuestos antibióticos o sustratos miméticos adecuados de los mismos, o de dianas moleculares del compuesto antibiótico cuya resistencia se vaya a caracterizar. Se pueden obtener espectros de referencia aplicando cualquier técnica de espectrometría de masas que se vaya a utilizar en el análisis de las muestras. Una técnica de espectrometría de masas preferida es MALDI-MS.

30 Cualquier antibiótico betalactámico constituye un sustrato de betalactamasa adecuado. De forma alternativa se pueden utilizar derivados betalactámicos o miméticos que induzcan la expresión de la betalactamasa en el microorganismo, y/o que sean hidrolizados por la actividad enzimática de la betalactamasa. Los sustratos miméticos utilizados en los aspectos de la invención pueden, pero no tienen por qué, mostrar alguna actividad antibiótica.

35 Preferentemente, el sustrato de la betalactamasa es un compuesto del cual se puede diferenciar fácilmente el producto de degradación de la betalactamasa mediante espectrometría de masas, preferentemente de tal forma que el sustrato y su producto de degradación posean diferentes cocientes de masa/carga.

40 El siguiente paso de un método preferido para caracterizar la resistencia a los antibióticos betalactámicos de un microorganismo implica la exposición de un microorganismo, un lisado celular del mismo o el sobrenadante de un cultivo de crecimiento del mismo, al compuesto del sustrato en líquido acuoso para así obtener una muestra expuesta.

45 Una muestra expuesta adecuada puede ser una muestra de fluido corporal o de tejido corporal de un sujeto, es decir, un humano o un animal, del que se sospecha que sea portador de un microorganismo cuya resistencia a los antibióticos betalactámicos se vaya a caracterizar. Una muestra de sangre, de heces o de orina constituyen muestras de fluidos corporales adecuadas.

50 La exposición del microorganismo al compuesto del sustrato puede, por tanto, implicar una exposición *in vivo* o *in vitro*.

La exposición puede comprender, en ciertas preparaciones, una fase de incubación en donde el microorganismo es incubado durante un breve periodo de tiempo, por ejemplo entre 1-5 minutos y 1-3 horas en una disolución que contenga las sustancias antimicrobianas de interés. Adicionalmente se pueden utilizar lisados de microorganismos y sobrenadantes de cultivos microbianos. Cuando las enzimas específicas están presentes, las sustancias antimicrobianas o sus sustratos miméticos se modifican o inactivan, lo que resulta en una composición de elementos diferente en comparación con la forma activa del fármaco. Esto conduce a un cambio en la masa de la sustancia antimicrobiana que puede detectarse mediante espectrometría de masas.

60 Una ventaja de la presente invención es el hecho de que los lisados celulares crudos también se pueden utilizar para obtener una muestra expuesta. Por lo tanto, no es necesario que el microorganismo que se va a caracterizar siga siendo viable, ni es preciso purificar antes la muestra expuesta para poder detectar en ella alguna actividad de la betalactamasa.

65 Cuando un microorganismo contiene un gen de betalactamasa pero no sintetiza la propia enzima bajo las condiciones de crecimiento actuales, se puede inducir la síntesis de betalactamasa en ese organismo mediante el

cultivo del microorganismo en presencia de un antibiótico betalactámico o un compuesto que sintetice betalactamasa. Preferentemente se lleva a cabo un paso opcional de inducción o activación de la síntesis de betalactamasa antes de la lisis celular bacteriana.

5 En general, es posible detectar la capacidad de la muestra expuesta para modificar un compuesto antibiótico mediante la detección de un descenso del sustrato antibiótico (o su mimético) o de un aumento del producto de reacción de la hidrólisis que tiene lugar entre la enzima modificadora y el compuesto del sustrato. Por lo tanto, es posible detectar la actividad de la betalactamasa en la muestra expuesta mediante la detección de un descenso del sustrato de la betalactamasa o un aumento del producto de reacción de la hidrólisis que tiene lugar entre la
10 betalactamasa y el sustrato.

De manera alternativa, se puede detectar la capacidad de la muestra expuesta para modificar un compuesto antibiótico mediante la detección de una modificación en la diana molecular del compuesto antibiótico. Por ejemplo, la resistencia a la eritromicina, la ciprofloxacina, la vancomicina, la meticilina y la tetraciclina se basa en la
15 modificación de la diana, como la metilación de ARN. Estas modificaciones de la diana también se pueden detectar mediante espectrometría de masas, tal y como se describe aquí. Por lo tanto, la presente invención no se limita a la detección de betalactamasas como enzimas modificadoras y, por tanto, la caracterización de resistencia a los antibióticos betalactámicos. Aplicando aspectos de la presente invención se puede caracterizar también otra resistencia a compuestos antibióticos que no se basa en la modificación del fármaco. Aunque habitualmente las betalactamasas inactivan los antibióticos por hidrólisis, también se pueden detectar y determinar otros tipos de
20 modificación enzimática aplicando medios y métodos de la presente invención. Por ejemplo, los aminoglucósidos se modifican por la adición de una fracción de fosfato. Estas modificaciones del sustrato de la enzima modificadora también se pueden detectar con los métodos de la presente invención.

25 Un importante hallazgo de los presentes inventores es que se puede medir con gran precisión el cambio en la (cantidad de) reacción o compuestos objetivo mediante espectroscopia de masas. Por lo tanto, tras el paso de incubación, la muestra expuesta se prepara para la espectrometría de masas aplicando los protocolos genéricos de preparación de la muestra de espectrometría de masas, como la precipitación de proteínas con disolventes orgánicos, la extracción en fase sólida (SPE) o la extracción líquido-líquido (LLE). Aproximadamente 1 µl de la disolución preparada se utiliza para el análisis mediante espectrometría de masas. En preparaciones preferidas de la
30 presente invención, se utiliza espectrometría de masas MALDI y, más preferentemente, la espectrometría de masas MALDI con analizador cuadrupolar. Si se utiliza la espectrometría de masas MALDI, los compuestos de la reacción se pueden medir con tal precisión que los tiempos de exposición (periodos de incubación) pueden ser muy breves. Se han logrado resultados satisfactorios con un tiempo de incubación de aproximadamente 5 minutos.

35 La espectrometría de masas MALDI implica la colocación de la muestra expuesta junto con un material de matriz en un soporte de muestras para espectrometría de masas y el secado de la muestra sobre el soporte para producir una muestra para espectrometría de masas. Arriba se indican materiales de matriz adecuados, no siendo la naturaleza del material de matriz particularmente restrictiva. La preparación de la muestra para espectrometría de masas a partir de la muestra expuesta se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos por los expertos en el campo de la espectrometría de masas.

Una vez la muestra se ha montado en el espectrómetro de masas, el espectro de masa de la muestra se obtiene mediante procedimientos estándar que dependen del tipo de equipamiento y los métodos de espectrometría de
45 masas utilizados.

En un método de la invención, el paso de detección de modificación del sustrato o de la diana (como la degradación del sustrato de la betalactamasa o la metilación de ARN) se lleva a cabo utilizando la espectrometría de masas, preferentemente mediante espectrometría de masas en tándem (MS-MS) o mediante desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). La espectrometría de masas proporciona un potente medio para determinar la estructura e identidad de moléculas orgánicas complejas, incluidas proteínas y péptidos. En la espectrometría de masas, un compuesto de muestra es bombardeado con electrones de alta energía que provocan que se fragmente de una forma característica. Los fragmentos, que poseen pesos y cargas diversas, atraviesan a continuación un campo magnético y se separan de acuerdo con sus cocientes de masa/carga. El patrón de fragmentación
50 característico resultante del compuesto de muestra (el espectro de masa) se utiliza para identificar y cuantificar ese compuesto. Un procedimiento habitual de espectrometría de masas comprende los siguientes pasos:

1. Carga de una muestra en el espectrómetro de masas, aplicando opcionalmente (en caso de una forma especial de espectrometría de masas denominada MALDI) la muestra junto con una matriz sobre un soporte de
60 muestras para espectrometría de masas y secando la muestra o la mezcla sobre el soporte por evaporación de los disolventes.
2. Ionización de los componentes de la muestra mediante uno de los diversos métodos posibles (p. ej. dirigiendo hacia ellos un haz de electrones), lo que resulta en la formación de partículas cargadas (iones).
3. Aceleración de los iones positivos mediante un campo eléctrico.
- 65 4. Cálculo del cociente de masa/carga (m/z) de las partículas a partir de los detalles del movimiento de los iones cuando atraviesan los campos electromagnéticos.

5. Detección de los iones, que han sido clasificados en el paso 4 conforme a m/z .

En la espectrometría de masas MALDI, la matriz está formada por moléculas cristalizadas, tres ejemplos adecuados de las cuales son el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (α -ciano o α -matriz) y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). La disolución de la matriz se mezcla con la muestra expuesta. El disolvente orgánico permite que las moléculas hidrofóbicas se disuelvan en la disolución, mientras que el agua permite que las moléculas solubles en agua (hidrofílicas) hagan lo mismo. Se aplica una gota de esta disolución en una placa o soporte de MALDI (generalmente una placa metálica diseñada para este fin). Los disolventes se evaporan, dejando únicamente la matriz recristalizada junto con las moléculas de la muestra dispersas por todos los cristales de la matriz.

Entre las aplicaciones de la espectrometría de masas adecuadas que se pueden utilizar en aspectos de la invención se incluye la espectrometría de masas MALDI-TOF, la espectrometría de masas MALDI-FT, la espectrometría de masas MALDI-FT-ICR y la espectrometría de masas MALDI con analizador de triple cuadrupolo. Cuando se utiliza la espectrometría de masas MALDI-TOF se calcula un rendimiento de 1 minuto por muestra. Cuando se utiliza la espectrometría de masas MALDI con analizador de triple cuadrupolo, la duración de la prueba se puede reducir a aproximadamente 5 segundos por muestra sin perder sensibilidad ni especificidad.

Tras la obtención de los espectros de masa, los espectros de masa derivados de la muestra se comparan con los espectros de masa de referencia del compuesto antimicrobiano, de su producto de modificación enzimática, de su diana molecular o de un sustrato de su enzima modificadora de una forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. Mediante esta comparación se puede determinar la presencia cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa de modificación del sustrato o la diana y/o la producción de productos de modificación.

Tanto el antibiótico inactivado o modificado (p. ej. el producto de degradación) como el sustrato antibiótico intacto (o el sustrato mimético), así como la diana molecular, se pueden medir simultáneamente por espectrometría de masas, y el cociente de producto/sustrato puede, por ejemplo, tomarse como medida de la capacidad del microorganismo para inactivar o modificar los sustratos probados. De forma alternativa o adicional, se puede tomar un descenso de la concentración del sustrato únicamente o un aumento de la concentración del producto únicamente, en la muestra, como medida de la capacidad del microorganismo para inactivar o modificar el antibiótico. Alternativamente, se puede tomar un aumento de la concentración de la diana molecular o un aumento de la concentración de la diana modificada (resistente) como indicación de la resistencia del microorganismo. En caso de que se caracterice una resistencia a los antibióticos que afecte a fármacos que conlleven una modificación de la diana como mecanismo de resistencia, el paso de exposición de un microorganismo, un lisado celular del mismo o el sobrenadante de un medio de cultivo del mismo, a un compuesto antimicrobiano en líquido acuoso equivale al suministro de una muestra del microorganismo, un lisado celular del mismo o el sobrenadante de un medio de cultivo del mismo, y la detección con ello de dianas modificadas.

Por lo tanto, en una preparación de aspectos de la invención, la modificación del sustrato antimicrobiano se toma como prueba de la síntesis de, por ejemplo, una betalactamasa por parte del microorganismo, e indica que el microorganismo probablemente sea resistente a los compuestos antibióticos betalactámicos que han sido inactivados, por ejemplo mediante degradación, por esa betalactamasa específica para la que se ha suministrado un sustrato antimicrobiano o un sustrato mimético adecuado. De esta forma se puede caracterizar la resistencia de dicho microorganismo a, por ejemplo, un antibiótico betalactámico.

Se da a conocer que la presencia de una modificación (en la cantidad relativa o en la composición química) de la diana molecular del compuesto antimicrobiano en la célula microbiana se toma como indicador de que el microorganismo probablemente sea resistente al compuesto antibiótico de interés. De esta forma, se puede caracterizar la resistencia de dicho microorganismo a, por ejemplo, la eritromicina, la ciprofloxacina, la vancomicina, la metilicina y la tetraciclina.

Se da a conocer un método para el diagnóstico rápido de microorganismos que producen enzimas que inactivan o modifican la estructura de sustancias antimicrobianas. El método puede utilizarse para una rápida detección de actividad de BLEE. Esto es necesario especialmente en el ámbito hospitalario, ya que el uso de cefalosporinas de tercera generación está muy extendido en el tratamiento empírico de pacientes con infecciones gravemente enfermos. La rápida detección de actividad de BLEE en la muestra de un paciente es importante para iniciar lo antes posible el tratamiento antibiótico apropiado para ese paciente. Los métodos pueden utilizarse para una rápida detección de actividad de BLEE. Además, los métodos pueden aplicarse sobre sobrenadantes de cultivos microbianos o en microorganismos aislados directamente a partir de una muestra del paciente, p. ej. tras centrifugación de muestras de orina. De esta forma, debería ser posible detectar actividad de BLEE incluso antes de detectar las propias bacterias (cultivadas).

La espectrometría de masas no se ha utilizado para detectar la inactivación enzimática o la modificación química de antibióticos mediante la monitorización del descenso de la intensidad del sustrato y/o el aumento de la intensidad del producto. Además, la espectrometría de masas no se ha utilizado para analizar la actividad enzimática en muestras complejas como microorganismos lisados. Más concretamente, nunca se ha informado sobre la detección y

caracterización específica de enzimas BLEE mediante espectrometría de masas.

Un método diagnóstico para la detección rápida de actividad de BLEE comprende liberar de los microorganismos las enzimas betalactamasas que inhiben los antimicrobianos mediante el lisado de la muestra utilizando un reactivo lítico. Posteriormente estos lisados se pueden transferir, preferentemente utilizando un pipetor automático, a una tira multipocillos, como las tiras ATB™ o Rapidec™, tiras estas que contienen pocillos con reactivos para provocar diferentes reacciones basadas en diferentes compuestos antimicrobianos. Algunos pocillos contienen una cierta cantidad de uno o varios sustratos de la betalactamasa, por ejemplo en una forma seca o inmovilizada (pegada). Algunos pocillos podrían también contener uno o varios patrones internos para facilitar la cuantificación. Algunos pocillos también podrían utilizarse a modo de referencia, sin sustratos, para la autodegradación de los compuestos antimicrobianos.

Tras la transferencia a los pocillos y la incubación allí durante un breve periodo de tiempo tal y como se ha indicado aquí, la muestra expuesta de cada pocillo puede colocarse de forma adecuada sobre una placa de MALDI o cualquier otro soporte de espectrometría de masas. En el caso de MALDI, se añade al soporte un material de matriz adecuado. A continuación se obtienen los espectros de masa. El análisis de espectros se debe realizar utilizando algoritmos de análisis específicos. Los espectros, tal y como se obtienen a partir de la muestra expuesta, se comparan a continuación con espectros de referencia utilizando un software informático, con el fin de determinar la presencia de degradación del sustrato para cada pocillo. En caso de degradación, el software diseñado al efecto puede proporcionar los resultados de la prueba en un informe, el cual puede incluir, por ejemplo: (1) la identidad (nombre de la especie) del microorganismo (identificación que puede realizarse mediante pruebas de referencia, disponibles opcionalmente en la misma tira reactiva o en una paralela), (2) una lista de los antimicrobianos analizados, tal y como se suministra en la tira reactiva multipocillos, (3) una lista de antimicrobianos inhibidos o degradados por el microorganismo, (4) el mecanismo o mecanismos de resistencia a los que se atribuye la inhibición del antimicrobiano, (5) interpretaciones específicas de los resultados.

Alternativamente, el paso de exponer un microorganismo, un lisado celular del mismo o el sobrenadante de un medio de cultivo del mismo, a dicho sustrato en líquido acuoso (para así obtener una muestra expuesta) puede realizarse sobre el soporte de la muestra para espectrometría de masas. Tras permitir que las enzimas betalactámicas, presentes de forma opcional, degraden el sustrato de una betalactamasa sobre el soporte de muestras, la matriz de MALDI puede añadirse directamente a la muestra expuesta.

Se puede aplicar un método de la presente invención utilizando muestras complejas, incluidos lisados celulares crudos o muestras de pacientes. El método permite la evaluación precisa de moléculas en la gama de tamaños de las sustancias antimicrobianas (normalmente entre 200 y 1000 Da) y se puede usar para determinar la actividad de la enzima que inactiva o modifica el antibiótico, por ejemplo al utilizar fármacos antimicrobianos como sustratos.

Un método de la presente invención puede utilizarse además como prueba confirmatoria de BLEE. En la mayoría de laboratorios de microbiología clínica las bacterias se someten en primer lugar a un cribado para determinar el fenotipo de BLEE y, a continuación, el fenotipo de BLEE se confirma utilizando una prueba confirmatoria fenotípica de BLEE independiente. Algunos aspectos de la presente invención pueden utilizarse para confirmar el fenotipo de BLEE en bacterias. El beneficio potencial de un método de la presente invención sobre las pruebas fenotípicas actuales es que el método aquí propuesto no solo funciona con suspensiones bacterianas sino también con lisados de bacterias. El uso de lisados de bacterias neutraliza el sesgo potencial originado por la resistencia basada en otros mecanismos, en particular una reducción de la entrada o un aumento de la salida de fármacos. El uso de lisados bacterianos es incompatible con las pruebas confirmatorias fenotípicas de BLEE actuales, ya que estas pruebas se basan en el crecimiento bacteriano.

Un método de la presente invención puede utilizarse también como método de cribado de alto rendimiento para nuevos inhibidores de betalactamasa en el sector farmacéutico. Actualmente el ácido clavulánico y el tazobactam, inhibidores de betalactamasa, se combinan con la amoxicilina y la piperacilina respectivamente para superar el problema de las bacterias que sintetizan betalactamasa. El ácido clavulánico o el tazobactam inhiben la actividad de las betalactamasas mientras que la amoxicilina o la piperacilina eliminan las bacterias. Teniendo en cuenta el problema creciente de las BLEE, el sector farmacéutico necesita herramientas de cribado para identificar nuevos compuestos que inhiban las BLEE. La presente invención es muy apropiada para este objetivo.

Ejemplos

Hemos detectado actividad de betalactamasas en lisados crudos de *E. coli* que sintetizan CTX-M-1 y CTX-M-9 y en *K. pneumoniae* que sintetiza SHV-2 utilizando la bencilpenicilina como sustrato. Hemos sido capaces de monitorizar la cinética enzimática de la penicilinasas pura (de *B. cereus*) utilizando la bencilpenicilina como sustrato.

REIVINDICACIONES

1. Un método para establecer si un microorganismo es potencialmente resistente a un antibiótico betalactámico, que consta de los siguientes pasos:
- 5 (a) proporcionar un espectro de masa de referencia del antibiótico betalactámico o su producto de modificación enzimática;
- (b) exponer un microorganismo, un lisado celular del mismo o el sobrenadante de un medio de cultivo del mismo a dicho antibiótico betalactámico en líquido acuoso para, de ese modo, obtener una muestra expuesta;
- 10 (c) adquirir un espectro de masas de la muestra expuesta;
- (d) comparar el espectro de masa obtenido en el paso (c) con el espectro de masa de referencia del paso (a) y
- (e) determinar a partir de dicha comparación si se ha producido una modificación de dicho antibiótico betalactámico tras dicha exposición, y establecer si dicho microorganismo es potencialmente resistente a dicho antibiótico betalactámico cuando se observa dicha modificación, donde tras el paso (b) dicha muestra expuesta se coloca, junto con un material de matriz, en un soporte de muestras para espectrometría de masas para obtener una muestra de espectrometría de masas para la espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS).
- 15
2. Método según la reivindicación 1, en donde dicha modificación comprende la inactivación enzimática o la degradación enzimática de dicho antibiótico betalactámico.
- 20
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho microorganismo es sospechoso de sintetizar betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y se ha seleccionado de entre *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis*.
- 25
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos espectros de masas se obtienen utilizando la espectrometría de masas MALDI con analizador de triple cuadrupolo, la espectrometría de masas MALDI-TOF o la espectrometría de masas MALDI-FT-ICR.
- 30
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha muestra expuesta es un lisado celular crudo de dicho microorganismo expuesto a un antibiótico betalactámico.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en el paso (b) dicho microorganismo se cuantifica contando en dichas muestras una o más biomoléculas estructurales o metabolitos derivados de dicho microorganismo.
- 35
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha muestra expuesta es una muestra de fluido corporal o de tejido corporal de un sujeto humano o animal del que se sospecha que sea portador de un microorganismo cuya resistencia a los antibióticos betalactámicos se tiene que caracterizar.
- 40
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el antibiótico betalactámico se selecciona del grupo formado por penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefepodoxima y aztreonam.
- 45
9. Método según las reivindicaciones 1 a 8, en donde se mide mediante espectrometría de masas una reducción de la concentración de antibiótico betalactámico únicamente o un aumento de la concentración de un producto de reacción únicamente y se utiliza como medida de la modificación.
- 50
10. Método según las reivindicaciones 1 a 8, en donde tanto el antibiótico betalactámico inactivado o modificado como el antibiótico betalactámico intacto se miden simultáneamente mediante espectrometría de masas y el cociente de producto/sustrato se utiliza como medida de la modificación.
- 55
11. Un método para establecer si un microorganismo es potencialmente resistente a un antibiótico betalactámico, que consta de los siguientes pasos:
- (a) proporcionar un espectro de masa de referencia del antibiótico betalactámico o su producto de modificación enzimática;
- (b) exponer un microorganismo, un lisado celular del mismo o el sobrenadante de un medio de cultivo del mismo a dicho antibiótico betalactámico en líquido acuoso para, de ese modo, obtener una muestra expuesta;
- 60 (c) adquirir un espectro de masas de la muestra expuesta;
- (d) comparar el espectro de masa obtenido en el paso (c) con el espectro de masa de referencia del paso (a) y
- (e) determinar a partir de dicha comparación si se ha producido una modificación de dicho antibiótico betalactámico tras dicha exposición, y establecer si dicho microorganismo es potencialmente resistente a dicho antibiótico betalactámico cuando se observa dicha modificación, donde el paso de exposición del microorganismo, el lisado celular del mismo o el sobrenadante de un medio de cultivo del mismo a dicho antibiótico betalactámico en líquido acuoso se realiza en el soporte de muestras para espectrometría de masas y
- 65

donde dicha muestra se seca en el soporte de muestras para obtener una muestra para espectrometría de masas para la espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS).