

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 632**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2013** E 13382271 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017** EP 2821499

54 Título: **Método para la determinación rápida de la susceptibilidad o de la resistencia de las bacterias a los antibióticos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2017

73 Titular/es:

**ABM TECHNOLOGIES, LLC (100.0%)
22575 State Highway 6 South
Navasota, US**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ GARCÍA, JOSÉ LUIS;
GOSÁLVEZ BERENGUER, JAIME;
SANTISO BRANDARIZ, REBECA;
TAMAYO NOVÁS, MARÍA y
BOU ARÉVALO, GERMÁN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 625 632 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

Método para la determinación rápida de la susceptibilidad o de la resistencia de las bacterias a los antibióticos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, al campo de la biotecnología y, más en particular, a la microbiología que concierne a la salud del ser humano, la salud veterinaria y la salud medioambiental. Ciertos modos de realización descritos en el presente documento se refieren a métodos para la determinación rápida de la susceptibilidad o de la resistencia de las bacterias cultivadas a los antibióticos.

Antecedentes de la invención

El Centro Europeo para el Control de las enfermedades (ECDC, *European Center for Disease Control*, por sus siglas en inglés) registra cada año 25.000 fallecimientos debidos a patógenos multirresistentes, es decir, patógenos que resisten a varios antibióticos. Los tratamientos con antibióticos bien seleccionados y tempranos tal vez puedan evitar parte de estas muertes. Dada la alta prevalencia de resistencias, los procedimientos actuales requieren un cultivo bacteriano para identificar el microorganismo, seguido de un antibiograma, lo que habitualmente requiere entre 2 y 3 días para que se produzca el crecimiento bacteriano. Para construir un antibiograma, solo la etapa del cultivo bacteriano requiere, por lo general, aproximadamente un día de incubación, o un mínimo de aproximadamente 18 horas. Por consiguiente, existe la necesidad de determinar rápidamente un tratamiento con antibióticos para poder administrar enseguida un tratamiento eficaz.

Tras el cultivo, según las metodologías convencionales, se evalúa la resistencia de las bacterias a los antibióticos por comparación con una concentración mínima inhibitoria (CMI). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se considera generalmente la dosis mínima del antibiótico que inhibe significativamente el crecimiento bacteriano según se determina a través de técnicas convencionales de microdilución o prueba E. Ciertas organizaciones internacionales como el Instituto para la Normalización Clínica y del Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) establecen las concentraciones de cada antibiótico específico que se deberían utilizar como referencia de susceptibilidad, resistencia intermedia y resistencia para cada bacteria en concreto. Por ejemplo, una cepa de *Acinetobacter baumannii* se considera susceptible a imipenem cuando su CMI es $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, intermedia cuando la CMI está comprendida entre $4 \mu\text{g/ml}$ y $8 \mu\text{g/ml}$, y resistente cuando la CMI es $\geq 16 \mu\text{g/ml}$.

Suscita una gran preocupación en todo el mundo el progresivo aumento de enfermedades infecciosas críticas nosocomiales (adquiridas en el hospital), a menudo en pacientes inmunocomprometidos y, frecuentemente, de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Por varias razones, dichas infecciones pueden estar asociadas con una tasa de mortalidad alta. Los patógenos pueden infectar a un paciente a través de medios intrusivos, pero necesariamente médicos, como por ejemplo las vías respiratorias durante la ventilación mecánica, el tracto urinario o los vasos sanguíneos a través de catéteres o incluso a través de heridas cutáneas como puedan ser las incisiones necesarias en una serie de procedimientos médicos. Muchos patógenos asociados con estos problemas pertenecen a la familia de bacilos gram-negativos. Por ejemplo, frecuentemente *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunas enterobacterias son resistentes a diversos antibióticos. Dado el período de tiempo relativamente largo necesario para realizar un antibiograma normal, por lo general, se administran los antibióticos de manera empírica. Este tratamiento puede resultar ineficaz en el 20-40 % de los casos y un cambio de antibióticos más adelante puede que tenga una menor probabilidad de éxito. En estos escenarios de urgencia ante un mayor riesgo de muerte o de complicaciones graves, es de gran interés contar con un sistema rápido para determinar un tratamiento con antibióticos. Por lo tanto, existe la necesidad de determinar de forma rápida la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos con lo que tal vez se salvarían vidas y se reducirían los costes en sanidad.

La primera línea de defensa para combatir enfermedades infecciosas suele depender de la administración de antibióticos conocidos por su eficacia basándose en la probabilidad del patógeno implicado. Sin embargo, el uso incorrecto o el abuso de un antibiótico pueden abocar en cepas de bacterias cada vez más resistentes. Para evitar un uso incorrecto, los facultativos pueden tratar de aislar las bacterias desde muestras de sangre o muestras de otro fluido para realizar pruebas *in vitro*, tales como un antibiograma, simultáneamente con los antibióticos iniciales.

Un antibiograma es el resultado de un ensayo clínico de una cepa de bacterias aislada *in vitro* para determinar su susceptibilidad a antibióticos. Una metodología habitual para construir un antibiograma basado en la difusión es el método de Kirby-Bauer (Bauer A W, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493-496). En el método de Kirby-Bauer semicuantitativo, se colocan varios discos que contienen diferentes antibióticos en diferentes zonas de un cultivo bacteriano rico en nutrientes. Como el antibiótico se difunde en el agar hacia fuera del disco, el diámetro alrededor del disco en el que no crecen las bacterias es indicativo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ese antibiótico a la cepa de bacterias cultivada. Un método cuantitativo puede basarse en una serie de viales que tienen concentraciones del antibiótico en cuestión progresivamente más bajas. El vial con la concentración de antibiótico

más baja en la que la bacteria no puede crecer proporciona la concentración mínima inhibitoria de ese antibiótico para la cepa de bacterias ensayada.

5 Los métodos de difusión y dilución se basan cada uno de ellos fundamentalmente en la inhibición de la proliferación de bacterias en un medio rico en nutrientes y requieren un período de tiempo suficiente para que tengan lugar muchos ciclos de reproducción de las bacterias. Siendo así, ambas metodologías pueden requerir un mínimo de 18 horas a 24 horas.

10 Las anteriores tentativas para mejorar la velocidad de evaluación de la susceptibilidad bacteriana a antibióticos no han conseguido proporcionar una significativa reducción del período de tiempo requerido para satisfacer las necesidades antes descritas. El documento WO/1992/019763 describe un método anterior en el que se incorpora un compuesto fluorogénico que contiene nutriente que tiene un indicador fluorescente. Un microorganismo que continúa creciendo en presencia de un antibiótico metaboliza el compuesto liberando el indicador fluorescente, mientras que los procesos metabólicos de cepas susceptibles liberan menos indicadores fluorescentes. Esta metodología sigue requiriendo un período de incubación suficiente que permita la liberación de un número suficiente de indicadores fluorescentes y es posible que se tarde en torno a ocho horas para obtener resultados.

15 Las metodologías que se han descrito se basan en la evaluación del crecimiento microbiano. Los resultados de los ensayos se pueden acelerar aplicando un enfoque de microscopía de lapso de tiempo o microscopía en tiempo real. Se puede emplear un software para facilitar la interpretación de estos resultados. Sistemas comercializados como MicroScan WalkAway, Vitek y Wider pueden ser capaces de determinar la susceptibilidad o resistencia a antibióticos de microorganismos concretos en alrededor de 6-9 horas.

20 Otro enfoque para evaluar la respuesta de una cepa bacteriana a un antibiótico consiste en la evaluación secuencial del aumento de secuencias de ADN bacteriano específicas, que está directamente relacionado con el número de bacterias, utilizando un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (q-PCR). Se pueden obtener resultados de la posible influencia en el crecimiento bacteriano de los antibióticos al cabo de 6 horas de cultivo (Rolain JM, Mallet MN, Fournier PE, Raoult D. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 538-541).

25 Otro enfoque experimental puede caracterizarse por un sistema de electroforesis que detecta cambios en la electrofisiología de las células tras la administración de los antibióticos (Hoettges KF, Dale JW, Hughes MP. Rapid determination of antibiotic resistance in *E. coli* using dielectrophoresis. Phys Med Biol 2007; 52: 6001-6009). Otra posibilidad consiste en medir el calor desprendido por el cultivo bacteriano utilizando sistemas de microcalorimetría (Baldoni D, Hermann H, Frei R, Trampuz A, Steinhuber A. Performance of microcalorimetry for early detection of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2009; 47: 774-776).

30 En el caso de antibióticos que actúan al nivel de pared celular, tales como las β -lactamas, en la patente europea EP0135023, se describen sustratos específicos para detectar la actividad de proteínas o enzimas citoplásmicas liberadas al medio cuando el antibiótico era efectivo. Otra posibilidad es la evaluación de fragmentos de ADN liberados al medio (Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Bou G, Fernández MC, Fernández JL. A rapid in situ procedure for determination of bacterial susceptibility or resistance to antibiotics that inhibit peptidoglycan biosynthesis. BMC Microbiol 2011; 11:19). Se encierran las bacterias en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y se incuban con una solución de lisis que solamente afecta a las células cuya pared celular ha sido afectada y/o debilitada por el antibiótico. Únicamente estas bacterias liberan el nucleóide, que se visualiza por microscopía fluorescente tras la tinción de ADN con fluorocromo de alta sensibilidad. La solución de lisis no afecta a las bacterias resistentes al antibiótico, que no liberan el nucleóide y mantienen pues su forma normal. Se puede adaptar este procedimiento también para determinar la susceptibilidad o resistencia a antibióticos que inducen la fragmentación del ADN bacteriano, como las quinolonas. Para este fin, la solución de lisis debe estar más concentrada, de manera que todas las bacterias liberen los nucleóides de manera detectable. Las bacterias susceptibles a la quinolona presentan ADN fragmentado, es decir, fragmentos de ADN difundidos, en cambio las que son resistentes revelan nucleóides intactos (Santiso R, Tamayo M, Fernández JL, Fernández MC, Molina F, Gosálvez J, Bou G. Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2009; 47: 2593-2595). Sin embargo, esta metodología puede tener como resultado ocasionalmente la identificación de una cepa susceptible falso positivo, lo que puede suponer en consecuencia tratamientos con antibióticos ineficaces. Por ejemplo, ciertas cepas de *P. aeruginosa* encuadradas en la categoría de intermedios o resistentes a carbapenemos, siguiendo los criterios del CLSI, pueden liberar el nucleóide por la afectación de pared celular, de manera que pueden identificarse erróneamente como susceptibles.

35 Por otra parte, HAJIME HASHIMOTO et al ("Rapid Bacterial Testing Measurement with Method Laser L by Size Distribution Light Scattering", Transactions of the Institute of Electronics and Communication Engineers of Japan. Sección E, vol. 68, 5 de mayo 1985 (1985-05-05), páginas 304-308), describen el efecto de un antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular (cloranfenicol, ampicilina) en la distribución del tamaño de células bacterianas (*E. coli* y *S. marcescens*) en presencia de dicho antibiótico y describen como la distribución del tamaño se correlaciona con la prueba de CMI llevada a cabo con un método de tubo convencional.

HAJIME HASHIMOTO *et al.*: "Measurement of bacterial size distribution using laser light scattering", XP002715843 Compendex, No. de acceso a la base de datos EIX85080112894; y HAJIME HASHIMOTO *et al.*: "Measurement of bacterial size distribution using laser light scattering.", Japanese Journal of Medical Electronics and Biological Engineering 1984 abr JAPAN SOC OF MEDICAL ELECTRONICS & BIOLOGICAL ENGINEERING, vol. 22, abril 1984 (1984-04), páginas 782-783, describen el concepto de medición de la sensibilidad de bacterias a antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular, midiendo las variaciones del tamaño celular tras la exposición de las bacterias a dicho antibiótico.

Ninguno de estos enfoques experimentales ha conseguido proporcionar una medida rápida y precisa de la susceptibilidad bacteriana a antibióticos y en este campo se sigue dependiendo de los métodos de dilución y difusión para construir un antibiograma.

Sumario de la invención

La presente invención queda definida con las reivindicaciones adjuntas. Por tanto, la invención se refiere a:

1. Un método para evaluar de forma rápida la susceptibilidad de una cepa de bacterias aislada a un antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular que comprende:

- a) la preparación de un cultivo bacteriano a partir de una cepa de bacterias aislada;
- b) la combinación de una o más dosis de un antibiótico que inhibe la pared celular con diferentes partes del cultivo bacteriano, en la que la concentración de cada una de la una o más dosis se correlaciona con umbrales de resistencia a antibiótico para la cepa de bacterias aislada al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular;
- c) la incubación del cultivo bacteriano y de la una o más dosis de antibiótico;
- d) la evaluación de la longitud celular o del tamaño celular de las bacterias incubadas para cada una de la una o más dosis de antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular; y
- e) la clasificación de la susceptibilidad de la cepa de bacterias aislada al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular, basándose en las longitudes celulares o en los tamaños celulares de las bacterias asociadas con cada dosis de las una o más dosis de antibiótico que inhibe la síntesis de pared celular,

en el que una de las dosis comprende una concentración mínima de antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular determinada empíricamente que tiene como resultado el agrandamiento de la célula o un aumento del tamaño celular en cepas de las bacterias que son susceptibles al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular, y en el que dicha concentración mínima de antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular es más baja que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa de bacterias al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular para indicar susceptibilidad.

2. El método según se reivindica en la reivindicación 1, en el que la etapa de preparación de un cultivo bacteriano a partir de una cepa de bacterias aislada comprende además preparar un cultivo bacteriano de crecimiento exponencial.

3. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de cada una de las una o más dosis del antibiótico que inhibe la pared celular se correlaciona con los valores límite de las clasificaciones susceptible-intermedio-resistente.

4. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las concentraciones para cada una de las una o más dosis se correlacionan, según una determinación de la respuesta a dosis de la presencia o no de agrandamiento celular o aumento del tamaño celular de múltiples cepas de una bacteria, en el que las múltiples cepas presentan un intervalo de resistencias a antibiótico determinado previamente.

5. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la una o más dosis del antibiótico que inhibe la síntesis de la pared comprende una única dosis proporcionada a una concentración que induce el agrandamiento celular o un aumento del tamaño de la célula en cepas de las bacterias que son susceptibles al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared.

6. El método según se reivindica en la reivindicación 5 en el que la cepa bacteriana se clasifica como susceptible al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular si se evalúa un aumento de la longitud celular o del tamaño celular.

7. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de inmovilización de una muestra de cultivo celular sobre un portaobjetos antes de la etapa d).

8. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de evaluar la longitud celular o el tamaño celular se realiza por microscopía de campo brillante, microscopía de campo oscuro, microscopía fluorescente, microscopía de contraste de fases o microscopía de luz polarizada.

9. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de evaluación de la longitud celular o el tamaño celular comprende además la difusión a través de un filtro.

10. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de evaluación de la longitud celular o del tamaño celular comprende además la tinción de la bacteria que se está evaluando.

11. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la reivindicación 9, en el que la etapa de evaluación de la longitud celular o del tamaño celular se realiza por citometría de flujo.

12. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas b) a e) de la reivindicación 1 se realizan en dos horas, en una hora y media o en una hora.

13. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de preparación de un cultivo bacteriano a partir de una cepa de bacterias aislada comprende además el aislamiento de bacterias responsables de producir una enfermedad infecciosa en un paciente.

14. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular comprende un antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglicano.

15. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular comprende un antibiótico de la familia de las β -lactamas o un glicopéptido.

16. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular comprende una cefalosporina o un carbapenem.

17. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bacteria comprende bacilos gram-negativos.

18. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de preparación de un cultivo bacteriano se realiza en un caldo de cultivo líquido o en un medio con agar.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 ilustra un diagrama de flujo de un método de acuerdo con ciertos modos de realización que se describen en el presente documento.

La FIG.2 ilustra imágenes de cepas de *A. baumannii* incubadas con antibióticos de acuerdo con ciertos modos de realización descritos en el presente documento.

Si bien la presente invención puede realizarse introduciendo diversas modificaciones y formas alternativas, se ilustra en las figuras y se describen en el presente documento modos de realización concretos a modo de ejemplos ilustrativos.

Modos de realización de la presente invención

Tal como se utiliza a lo largo de la presente descripción, el término "crecimiento" cuando se utiliza en conjunción con bacteria, bacteriano, microbio, microorganismo y similares, deberá entenderse como un aumento del número de células, como por ejemplo la proliferación de las bacterias en un cultivo.

De manera similar, deberá entenderse que términos como "inhibición de crecimiento" se refieren a la inhibición del aumento del número de células, como por ejemplo la inhibición de la proliferación bacteriana en un cultivo bacteriano.

Tal como se utiliza a lo largo de la presente descripción y las reivindicaciones, el término "agrandamiento" cuando se utiliza en conjunción con microorganismo, bacterias, y similares, deberá entenderse como un aumento de la longitud y/o tamaño de microorganismos individuales.

Los modos de realización de la presente invención han demostrado que se puede determinar de forma fiable la actividad de ciertos antibióticos y, en particular, antibióticos que inhiben la síntesis de pared celular o que inhiben la síntesis de peptidoglicano en diferentes bacterias, a través de la evaluación del agrandamiento del tamaño o la longitud de la célula. Para distinguir cepas susceptibles de cepas intermedias o resistentes, se puede incubar las bacterias con dosis de antibióticos que son mucho más bajas que las empleadas como valores límite de susceptible, intermedio o resistente, establecidos por organizaciones internacionales como el Instituto para la Normalización Clínica y de laboratorio (CLSI) para los antibiogramas normalizados basados en la evaluación del crecimiento bacteriano por microdilución o prueba E. Las concentraciones de antibióticos establecidas por el CLSI son adecuadas para discriminar entre susceptibilidad o resistencia basándose en el efecto lítico de la célula y en la inhibición del crecimiento celular.

Las concentraciones límite de diferentes antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular indicadas por el CLSI son más altas que las concentraciones que tienen como resultado agrandamiento. Se puede observar un agrandamiento celular por la actividad de antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular cuando se incuban con las concentraciones establecidas por el CLSI para susceptibilidad, incluso en cepas de bacterias resistentes. Sorprendentemente, la presente invención da evidencia de que es posible establecer una correlación entre las concentraciones de los valores límite del CLSI para susceptibilidad bacteriana y la concentración de nuevos valores límite basándose en el efecto del agrandamiento/no agrandamiento como respuesta a un antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular. Si bien se ha sabido que diversos antibióticos tienen efectos en la longitud de la célula bacteriana, nunca se ha considerado el agrandamiento de la célula bacteriana como parámetro para determinar la susceptibilidad/resistencia de bacterias a estos antibióticos. Para este fin, es necesario identificar una concentración mínima del antibiótico a partir de la cual empieza a ser significativo el agrandamiento del tamaño o longitud de la célula, en una cepa específica de una especie específica de bacterias.

Se puede establecer de forma empírica una correlación de las concentraciones mínimas de antibióticos que discriminan cepas susceptibles, intermedias y resistentes (o incluso solamente cepas susceptibles y resistentes) a diversos antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular para cada especie de microorganismos a diversos antibióticos. A modo de ejemplo, se pueden incubar distintas concentraciones de antibiótico con un gran número de cepas bacterianas determinadas como susceptibles, según la prueba CMS-CLSI. La prueba CMI-CLSI puede incorporar metodologías de antibiograma tradicionales, como crecimiento/ausencia de crecimiento obtenido por difusión, micro-dilución y/o prueba E. La concentración mínima de antibiótico que tiene como resultado el agrandamiento de estas cepas de bacterias se puede considerar como una concentración correlacionada con el valor CMI-CLSI para cepas susceptibles. Naturalmente, dosis de antibióticos más altas, tales como las dosis correlacionadas como valores límite de resistencia intermedia o resistencia, también demostraran agrandamiento celular.

Para las bacterias que tienen valores CMI-CLSI que indican cepas intermedias, se puede incubar varias concentraciones de un antibiótico con un gran número de cepas bacterianas, determinadas cada una de ellas como de resistencia intermedia según la prueba CMI-CLSI. La concentración mínima de antibiótico que tiene como resultado el agrandamiento de esas cepas de bacterias se puede considerar como una concentración correlacionada con el umbral CMI-CLSI para resistencia intermedia. Naturalmente, dosis más altas, como por ejemplo una dosis correlacionada con los valores límite de resistencia, también tendrán como resultado agrandamiento celular.

Finalmente, se pueden incubar distintas concentraciones de antibiótico con un gran número de cepas bacterianas, determinadas cada una de ellas como resistentes según la prueba CMI-CLSI. La concentración mínima de antibiótico que tiene como resultado el agrandamiento de esas cepas de bacterias se puede considerar como una concentración correlacionada con el valor CMI-CLSI para cepas resistentes. Las dosis a esa concentración o por encima de ellas correlacionadas con el valor límite de cepas resistentes pueden tener como resultado o no el agrandamiento celular, dependiendo del nivel de resistencia en particular de una cepa en particular.

Se pueden incorporar los métodos descritos para determinar diversos antibióticos que tienen como resultado agrandamiento bacteriano y que pueden ser particularmente beneficiosos para someter a ensayo antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular. Una pared celular bacteriana se construye sobre un armazón que puede estar compuesto de peptidoglicano o mureína, que es una cadena lineal constituida por N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmuramicínico (NAM) alternos. Se une un tetrapéptido a NAM y forma un enlace interpeptídico con el tetrapéptido de la cadena más próxima, estabilizando y reforzando la pared celular.

La principal familia de antibióticos que inhiben la síntesis de pared celular corresponde a las β -lactamas. Estos agentes bactericidas interfieren en la formación de los enlaces interpeptídicos a través de reacciones irreversibles que inhiben proteínas de unión a la penicilina (PUP), serina proteasas o transpeptidasas. Las cefalosporinas son una subfamilia de β -lactamas específica, que comprende más de 60 antibióticos, agrupados en cinco "generaciones", aunque el número de generaciones sigue en debate. Las cefalosporinas, como la ceftazidima, se unen a varias PUP, si bien a veces presentan afinidad por las específicas, como PUP 3. Esta acción tiene como resultado el agrandamiento celular o la filamentación de la bacteria al inhibir el desarrollo del tabique intercelular, que es necesario para la división celular.

Los carbapenemos son otras β -lactamas que, a diferencia de las penicilinas y las cefalosporinas, presentan un átomo de carbono en la posición 1 del anillo de β -lactama, en lugar de azufre. Imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem, doripenem, panipenem, y panipenem/betamipron son carbapenemos corrientes. Deberá apreciarse que también se contemplan otros antibióticos para su uso en determinados modos de realización de la invención que se reivindica. Por ejemplo, se espera que otros antibióticos que inhiben la síntesis de pared celular proporcionen correlaciones similares con los valores límite del CLSI. En particular, se espera que los antibióticos que actúan para inhibir la producción de peptidoglicano funcionen de manera similar.

La FIG.1 ilustra un diagrama de flujo de un método de acuerdo con ciertos modos de realización de la invención. El método puede empezar en 110 con la etapa de preparación de un cultivo bacteriano a partir de una cepa de bacteria aislada. La bacteria se puede recoger de fluidos del cuerpo de un paciente o un animal para cultivo *in vitro* a través de técnicas y protocolos conocidos. Se puede formar el cultivo bacteriano en un caldo de cultivo líquido, así como en agar rico en nutrientes o incluso en agar mínimo. En un modo de realización, las bacterias se pueden formar en un cultivo puro que presente crecimiento exponencial. En el caso de que el cultivo bacteriano no crezca de forma exponencial, se puede colocar el cultivo en un líquido rico en nutrientes, como por ejemplo un caldo de cultivo, e incubar durante una hora y media antes de las siguientes etapas. Las bacterias recogidas para una rápida detección pueden consistir en cualquier bacteria que cause infección a un paciente, o que se presenta en el tejido o fluidos corporales de un paciente. Sin limitar la invención que se reivindica, las infecciones que pueden ser problemáticas y que se pueden beneficiar perfectamente de la metodología explicada son las producidas por bacilos gram negativos. Otros ejemplos no exhaustivos de bacterias pueden incluir *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, u otras especies de la familia de enterobacterias.

En la etapa 120, se puede combinar el cultivo bacteriano con una o más dosis de un antibiótico. El antibiótico puede comprender un antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular, como por ejemplo una β -lactama (Betalactama)

o un glicopéptido. En otro modo de realización no exhaustivo, el antibiótico se puede seleccionar entre una cefalosporina o un carbapenem. Las concentraciones para cada dosis de antibióticos pueden establecerse antes del despliegue del presente método a partir de la evaluación empírica de múltiples cepas de la bacteria incluyendo una amplia gama de CMI, incluyendo cepas susceptibles, intermedias y resistentes de acuerdo con el CLSI, o de otro organismo complemente que establezca definiciones similares, como por ejemplo, el Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST por sus siglas en inglés) o la British Society of Antimicrobial Chemotherapy BSAC). Por ejemplo, se puede establecer una concentración mínima del antibiótico que induzca el agrandamiento celular únicamente en las cepas de bacterias clasificadas como susceptibles de acuerdo con las normas CMI-CLSI. Esta concentración se puede considerar correlacionada con la norma CMI-CLSI para una cepa de bacteria susceptible. En un modo de realización, esta concentración correlacionada con la clasificación de una cepa susceptible puede ser la única concentración de ese antibiótico empleada para una rápida determinación de si la cepa de la bacteria es susceptible o no susceptible a un antibiótico en particular. Dicho modo de realización, puede proporcionar la información fundamental que necesita el profesional clínico urgentemente. Alternativamente, se pueden emplear múltiples dosis a concentraciones que guardan una correlación con las concentraciones mínimas para diferenciar cepas de bacterias susceptibles, intermedias y resistentes.

La etapa de combinación de una o más dosis puede incluir introducir una o más concentraciones del antibiótico en localizaciones físicas distintas de una placa, por ejemplo un plato Petri, u otra superficie de cultivo plana. La etapa de combinación de una o más dosis puede incluir también introducir dosis en recipientes por separado, tales como tubos de ensayo que tienen un caldo de cultivo.

Se pueden describir varias etapas del método y ejemplos en lo que se refiere a un único antibiótico y una única cepa de bacterias, pero se deberá apreciar que es posible someter a ensayo múltiples antibióticos a la vez de acuerdo con la invención que se reivindica. Por ejemplo, la una o más dosis puede comprender una única concentración determinada previamente a partir de múltiples antibióticos, o puede comprender múltiples concentraciones desde una variedad de diferentes antibióticos.

Una vez combinados, el antibiótico y el cultivo bacteriano se pueden incubar en la etapa 130. Tras una hora de incubación con el antibiótico, se pueden evaluar las bacterias en cuanto a su agrandamiento en lo que se refiere a la longitud de la célula o el tamaño de la célula en la etapa 140. La longitud celular y/o tamaño celular se pueden evaluar basándose en las diferencias relativas, por ejemplo por comparación frente a una dosis de control (es decir, concentración de antibiótico de 0 µg/ml) o incluso por comparación con medidas tomadas antes de la incubación con el antibiótico. La evaluación puede basarse también en medidas cuantitativas. La evaluación del agrandamiento celular puede realizarse con cualquier sistema de microscopía posible, como por ejemplo de campo brillante, de campo oscuro, de contraste de fases, de contraste interferencial, de fluorescencia, etc. En un modo de realización, se pueden emplear un software que sea capaz de determinar la longitud celular o el tamaño celular y que puede incluir además instrucciones para clasificar la susceptibilidad basándose en medidas cuantitativas o en comparaciones relativas. Dicha evaluación se puede realizar asimismo con diversos sistemas de citometría, como por ejemplo citometría de flujo o filtración a través de membranas de diferentes tamaños de poro o a través de cualquier otra metodología que discrimine tamaños de células. En un modo de realización, se pueden modificar los distintos kits que existen. Por ejemplo, se pueden suspender bacterias en un microgel sobre un portaobjetos e incubar en baños de crecientes de alcohol, secar y examinar por microscopio. La microscopía fluorescente tras la tinción de la bacteria encerrada en microgeles deshidratados, con un fluorocromo, como por ejemplo SYBR Gold, proporciona la ventaja de obtener imágenes nítidas perfectas, sin fondo, con una gran calidad para establecer de forma precisa y fiable el tamaño o longitud celular. La adaptación del procedimiento de microgel da cabida a un sistema tecnológico integrado, presentado como un kit que complementa los existentes para una determinación rápida de la susceptibilidad o resistencia a antibióticos que actúan en la pared celular.

Una vez evaluada la longitud celular o el agrandamiento celular, ya sea por comparación relativa o a través de medidas cuantitativas, se puede clasificar la cepa de bacterias. A modo de ejemplo, se pueden clasificar las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes, de acuerdo con las definiciones establecidas por el CLSI. En lo que se refiere a la FIG.2, se pueden realizar clasificaciones rápidamente basándose en la evaluación del agrandamiento como respuesta a una o más dosis del antibiótico. Sin embargo, también se pueden emplear otras definiciones de otras agencias. Las concentraciones de dosis pueden correlacionarse de forma empírica a través de la misma metodológica que la que se ha descrito. También, por ejemplo, las concentraciones del valor límite de CMI del antibiótico establecidas por el CLSI u otras organizaciones reguladoras pueden ser revisadas periódicamente y podrían cambiar. En tal caso, las concentraciones de valor límite para el criterio de agrandamiento /no alargamiento deberían correlacionarse con los nuevos valores límite de CMI.

Las etapas 110 a 150 se pueden realizar en una hora y media, que incluye una hora para la incubación con el antibiótico y aproximadamente 15 minutos para la preparación del microgel, la deshidratación con alcoholes, el secado y la tinción para determinar el agrandamiento celular. Sin embargo, en caso de que no creciera exponencialmente el cultivo bacteriano, es posible que se requiera una hora y media extra de incubación en un caldo de cultivo para establecer el crecimiento exponencial.

Ejemplo 1

Se correlacionaron las concentraciones del antibiótico cefalosporina ceftazidima con los valores límite para la clasificación de cepas de *Acinetobacter baumannii* susceptibles, intermedias y resistentes, de acuerdo con los criterios del CLSI. En la FIG. 2 se muestran imágenes de diferentes cepas de *A. baumannii*, incluyendo una cepa susceptible, una cepa intermedia y dos cepas resistentes a la ceftazidima, de acuerdo con los criterios CMI-CLSI. Se incubaron varias cepas de *A. baumannii* con ceftazidima durante una hora, a continuación, se encerraron en un microgel sobre un portaobjetos, se deshidrataron, se tñieron con SYBR Gold y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

La primera fila de la FIG. 2 ilustra imágenes de una cepa de *A. baumannii* susceptible (que tiene una CMI de 2,5 µg/ml) expuesta a un control sin antibiótico, una segunda concentración de 2 µg/ml de ceftazidima, una tercera concentración de 4 µg/ml de ceftazidima y una cuarta concentración de 8 µg/ml de ceftazidima. La segunda fila de la FIG. 2 ilustra imágenes de una cepa de *A. baumannii* intermedia (que tiene una CMI de 12 µg/ml) expuesta a las mismas concentraciones de ceftazidima. La tercera fila ilustra imágenes de una cepa de *A. baumannii* resistente (que tiene una CMI de 32 µg/ml) expuesta a las mismas concentraciones de ceftazidima y la cuarta fila ilustra una cepa altamente resistente. De acuerdo con los criterios del CLSI, se clasifica una cepa de *A. baumannii* como susceptible cuando sus CMI ≤ 8 µg/ml; intermedia cuando 8 µg/ml ≥ CMI ≤ 16 µg/ml; y resistente cuando CMI ≥ 32 µg/ml.

Se establecieron las concentraciones del nuevo valor límite de ceftazidima a partir de la inspección de los portaobjetos ilustrados en la FIG. 2. Por ejemplo, la cepa susceptible ilustrada en la fila de arriba presentó agrandamiento a partir de concentraciones de 2 µg/ml y superiores. La CMI determinada por prueba E para la cepa susceptible fue 2,5 µg/ml. La cepa intermedia ilustrada en la segunda fila presentó un agrandamiento iniciado a concentraciones de 8 µg/ml y superiores. La CMI determinada por la prueba E para la cepa intermedia fue 12 µg/ml. La cepa resistente ilustrada en la tercera fila presentó un agrandamiento a partir de concentraciones de 8 µg/ml y superior. La CMI determinada por la prueba E para la cepa susceptible fue 32 µg/ml. La cepa altamente resistente ilustrada en la cuarta fila no presentó agrandamiento en ninguna de las concentraciones de ensayo. La CMI determinada por la prueba E para la cepa altamente resistente fue superior a 256 µg/ml.

En suma, las concentraciones de valor límite de ceftazidima siguiendo el criterio de agrandamiento celular (concentraciones de antibiótico encima de las columnas) son 4 veces más bajas que las indicadas por el CLSI para CMI. De acuerdo con el CLSI, las CMS de valor límite fueron ≤ 8-16-≥ 32 µg/ml (susceptible-intermedia-resistente), que son equivalentes a concentraciones de ≤ 2-4-≥ 8 µg/ml en el caso de agrandamiento celular. Es decir, en lugar de of 8 µg/ml del CLSI, se podría incubar con 2 µg/ml, que discrimina perfectamente las cepas susceptibles de las no susceptibles, basándose en el agrandamiento/no agrandamiento celular como criterio.

Ejemplo 2

Para validar las concentraciones de valor límite correlacionadas establecidas en el ejemplo 1, se trataron 320 cepas de *A. baumannii*, de las cuales se determinó que 51 cepas eran susceptibles a ceftazidima de acuerdo con CMI-CLSI establecido según una prueba E, 35 cepas eran intermedias y 234 cepas eran resistentes.

Se incubó con ceftazidima cada una de las 320 cepas de *Acinetobacter baumannii* durante una hora. Cada dosis se correlacionó con los valores límite de susceptibilidad establecidos en el Ejemplo 1. Para determinar el agrandamiento se evaluaron las muestras incubadas con un microscopio. Se determinó el criterio de alargamiento/no alargamiento por comparación con una dosis de control de 0 µg/ml. Se consideró que las cepas eran susceptibles cuando presentaron un agrandamiento como respuesta a concentraciones de 2 µg/ml y superiores. Se consideró que las cepas eran intermedias cuando presentaron un agrandamiento como respuestas a concentraciones de 4 µg/ml y superiores. Se consideró que las cepas eran resistentes, cuando presentaron un agrandamiento como respuesta únicamente a 8 µg/ml de dosis, o no lo presentaron con ninguna concentración. Valiéndose del criterio de agrandamiento/no agrandamiento y las concentraciones de valor límite correlacionadas, se identificó correctamente cada una de las 320 cepas.

Ejemplo 3

Se evaluó también *Klebsiella pneumoniae*, otro patógeno importante en situaciones clínicas. De acuerdo con los criterios del CLSI, se clasifica una cepa de *K. pneumoniae* como susceptible a ceftazidima cuando la CMI ≤ 4 µg/ml y resistente cuando CMI ≥ 16 µg/ml. Cuando se utiliza la longitud bacteriana (agrandamiento), se correlacionaron empíricamente las concentraciones de nuevo valor límite para ceftazidima de manera similar a la descrita en el Ejemplo 1, con la excepción de que de acuerdo con las normas CMI-CLSI, no se determinó un valor adicional para resistencia intermedia. Dichas concentraciones de valor límite correlacionadas para el agrandamiento fueron 0,5 µg/ml para cepas susceptibles y más de 1,25 µg/ml para cepas resistentes. Dicho de otra forma, se consideró que las cepas eran susceptibles cuando presentaron un agrandamiento celular como respuesta a concentraciones de 0,5 µg/ml y 1,25 µg/ml y se consideró que eran intermedias cuando presentaron un agrandamiento celular como respuesta únicamente a la dosis de 1,25 µg/ml. Se consideró que las cepas eran resistentes cuando no hubo

agrandamiento en ninguna ni en una ni en otra concentración. Se estudiaron las 61 cepas de *K. pneumoniae* que incluían 31 susceptibles, 16 intermedias y 14 resistentes a ceftazidima, de acuerdo con el criterio normal de influencia en el crecimiento tal como indica CMI-CLSI.

- 5 Se incubó cada cepa con 0,5 µg/ml y 1,25 µg/ml de ceftazidima y se evaluó para determinar el agrandamiento de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 2. Se identificó correctamente cada una de las sesenta y una cepas utilizando las concentraciones del nuevo valor límite y valorando el agrandamiento /no agrandamiento.

Ejemplo 4

- 10 Se evaluó también *Pseudomonas aeruginosa*, una fuente común de infecciones nosocomiales peligrosas. De acuerdo con los criterios del CLSI, una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se clasifica como susceptible a ceftazidima cuando la CMI ≤ 8 µg/ml y resistente cuando la CMI ≥ 32 µg/ml. Se correlacionaron las concentraciones de nuevo valor límite para ceftazidima basándose en el agrandamiento celular, tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. Dichas concentraciones de valor límite correlacionadas para el agrandamiento fueron 0,5 µg/ml para cepas susceptibles y más de 1,0 µg/ml para cepas resistentes.

- 20 Se estudiaron las 130 cepas de *P. aeruginosa*, que incluían 117 cepas susceptibles a ceftazidima, 8 cepas intermedias y 5 cepas clasificadas como resistentes a ceftazidima de acuerdo con los criterios de CLSI. Tras la incubación durante una hora con 0,5 µg/ml de ceftazidima y 1 µg/ml de ceftazidima, se clasificó correctamente cada una de las cepas basándose en la evaluación del agrandamiento /no agrandamiento. Las cepas susceptibles resultaron agrandadas tras la incubación con 0,5 µg/ml y 1 µg/ml, las cepas intermedias solamente tras 1 µg/ml, en cambio las cepas resistentes no resultaron agrandadas en ningún momento tras ninguna de las dos dosis.

Ejemplo 5

- 30 Se evaluó *P. aeruginosa* en cuanto al efecto de carbapenemos, meropenem e imipenem, que, según lo corroboran los autores de la invención, inducen agrandamiento celular en cepas de esta bacteria susceptibles. Las concentraciones de valor límite de CLSI de susceptibilidad y resistencia corresponden a CMI ≤ 2 - ≥ 8 µg/ml, respectivamente. Para agrandamiento celular, las concentraciones del nuevo valor límite fueron mucho más bajas: $\leq 0,2$ - $> 0,5$ µg/ml, para susceptibilidad y resistencia, respectivamente. Se estudiaron 130 cepas de *P. aeruginosa* obteniendo 97 susceptibles, 14 intermedias y 19 resistentes a meropenem, siguiendo el criterio normal de influencia en el crecimiento tal como indica CMI-CLSI. Todas estas cepas fueron clasificadas correctamente utilizando los nuevos valores límite para agrandamiento/no agrandamiento. Las cepas susceptibles resultaron agrandadas tras la incubación con 0,2 µg/ml y 0,5 µg/ml, las cepas intermedias únicamente tras 0,5 µg/ml, en cambio las cepas resistentes no resultaron agrandadas en ningún momento tras ninguna de las dos dosis.

- 40 Los Ejemplos 2 y 3 demuestran que tras la incubación de un cultivo de crecimiento exponencial con 2 µg/ml o 0,5 µg/ml de ceftazidima durante 1 hora, es posible distinguir si una cepa de *A. baumannii* o *K. pneumoniae* respectivamente, es susceptible o no a la cefalosporina, a través del examen del agrandamiento celular. Esto constituye una información relevante y urgente que necesita el profesional clínico para determinar tratamientos con antibióticos, como continuar o no con el uso de una cefalosporina o cambiar de antibiótico. De manera similar, los Ejemplos 4 y 5 ilustran que es posible explorar de manera rápida numerosas especies de microorganismos para determinar su susceptibilidad a antibióticos una vez correlacionados los valores con medidas de susceptibilidad y resistencia aceptadas. Es posible valerse del tamaño o la longitud de la célula bacteriana para discriminar rápidamente la susceptibilidad o resistencia a otros antibióticos y especies de bacterianas, una vez obtenidas las concentraciones del valor límite para el agrandamiento celular que se correlaciona con las concentraciones del valor límite normal establecido para crecimiento celular por organismos reguladores específicos, a través de las metodologías que se han descrito.

- 50 Asimismo, para los fines de la presente descripción y las reivindicaciones, el término “un” o “uno” como determinante de una entidad, se refiere a uno o más de dichas entidades; por ejemplo “un antibiótico” se refiere a uno o más antibióticos. Según esto, los términos o expresiones “un” o “uno”, “uno o más” y “al menos uno” deben entenderse como intercambiables, tal como se utilizan en el presente documento.

- 55 Se asume que todos los valores numéricos que aparecen en el presente documento están modificados por el término “aproximadamente”, ya se indique de forma explícita o no. Para los fines de la presente invención, los intervalos se pueden expresar desde “aproximadamente” un valor en particular hasta “aproximadamente” otro valor en particular. Cuando se expresa un intervalo así, otro modo de realización incluye del valor citado en particular al otro valor citado en particular. La cita de los intervalos numéricos por los extremos incluye todos los valores numéricos incluidos dentro de dicho intervalo. El intervalo numérico de uno a cinco incluye por ejemplo los valores numéricos 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc. Debe entenderse que los extremos de cada uno de los intervalos son importantes tanto en relación con el otro extremo, como independientemente del otro extremo. Cuando el valor se expresa como una aproximación utilizando el antecedente “aproximadamente”, debe entenderse que el valor en particular forma otro modo de realización.

Asimismo, en lo que se refiere a cada uno de los términos utilizados, deberá entenderse que, en la descripción de cada término se incluyen las definiciones tal como aparecen en el diccionario Random House Webster's Unabridged Dictionary, segunda edición, a no ser que su utilización en la presente solicitud contradiga dicha interpretación.

- 5 La sección de antecedentes de la presente solicitud de patente proporciona una declaración del campo de emprendimiento en el que se enmarca la invención. En dicha sección se puede incorporar o parafrasear determinadas patentes, solicitudes de patentes, publicaciones de Estados Unidos de la materia objeto de la invención que se reivindica, útiles en lo que se refiere a información, problemas, o preocupaciones acerca del estado de la tecnología que aborda la invención. No se pretende que ninguna patente, solicitud de patente, publicación
10 estadounidense, declaración u otra información citada en el presente documento sea interpretada o considerada o estimada como admitida como técnica anterior en lo que respecta a la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar de forma rápida la susceptibilidad de una cepa de bacterias aislada a un antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular que comprende:
- a) la preparación de un cultivo bacteriano a partir de una cepa de bacterias aislada;
 - b) la combinación de una o más dosis de un antibiótico que inhibe la pared celular con diferentes partes del cultivo bacteriano, en el que la concentración de cada una de la una o más dosis se correlaciona con umbrales de resistencia a antibióticos para la cepa de bacterias aislada al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular;
 - c) la incubación del cultivo bacteriano y de la una o más dosis de antibiótico;
 - d) la evaluación de la longitud celular o del tamaño celular de las bacterias incubadas para cada una de la una o más dosis de antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular;
 - y
 - e) la clasificación de la susceptibilidad de la cepa de bacterias aislada al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular basándose en las longitudes celulares o en los tamaños celulares de las bacterias asociadas con cada dosis de las una o más dosis de antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular,
- en el que una de las dosis comprende una concentración mínima del antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular, determinada empíricamente, que tiene como resultado el agrandamiento celular o un aumento del tamaño celular en cepas de las bacterias que son susceptibles al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular, y en el que dicha concentración mínima de antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular es más baja que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa de bacterias al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular para indicar susceptibilidad.
2. El método según se reivindica en la reivindicación 1, en el que la etapa de preparación de un cultivo bacteriano partir de una cepa de bacterias aislada comprende además preparar un cultivo bacteriano de crecimiento exponencial.
3. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de cada una de las una o más dosis del antibiótico que inhibe la pared celular se correlaciona con valores límite de las clasificaciones susceptible-intermedio-resistente.
4. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las concentraciones para cada una de las una o más dosis se correlacionan, según una determinación de la respuesta a dosis de la presencia o no de agrandamiento celular o de aumento del tamaño celular de múltiples cepas de una bacteria, en el que las múltiples cepas presentan un intervalo de resistencias a antibiótico previamente determinado.
5. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la una o más dosis del antibiótico que inhibe la síntesis de la pared comprende una única dosis proporcionada a una concentración que induce el agrandamiento celular o un aumento del tamaño celular en cepas de las bacterias que son susceptibles al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared.
6. El método según se reivindica en la reivindicación 5, en el que la cepa bacteriana se clasifica como susceptible al antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular si se evalúa un aumento de la longitud celular o del tamaño celular.
7. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de inmovilización de una muestra de cultivo celular sobre un portaobjetos antes de la etapa d).
8. El método tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de evaluar la longitud celular o el tamaño celular se realiza por microscopía de campo brillante, microscopía de campo oscuro, microscopía fluorescente, microscopía de contraste de fases o microscopía de luz polarizada.
9. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de evaluar la longitud celular o el tamaño celular comprende además la difusión a través de un filtro.
10. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de evaluar la longitud celular o el tamaño celular comprende además la tinción de la bacteria que se está evaluando.
11. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o en la reivindicación 9, en el que la etapa de evaluación de la longitud celular o el tamaño celular se realiza por citometría de flujo.
12. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas b) a e) de la reivindicación 1 se realizan en dos horas, en una hora y media o en una hora.

13. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de preparación de un cultivo bacteriano a partir de una cepa de bacterias aislada comprende además el aislamiento de bacterias responsables de producir una enfermedad infecciosa en un paciente.
- 5 14. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular comprende un antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglicano.
15. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular comprende un antibiótico de la familia de las β -lactamas o un glicopéptido.
- 10 16. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular comprende una cefalosporina o un carbapenem.
- 15 17. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bacteria comprende bacilos gram-negativos.
18. El método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de preparación de un cultivo bacteriano se realiza en un caldo de cultivo líquido o en un medio con agar.

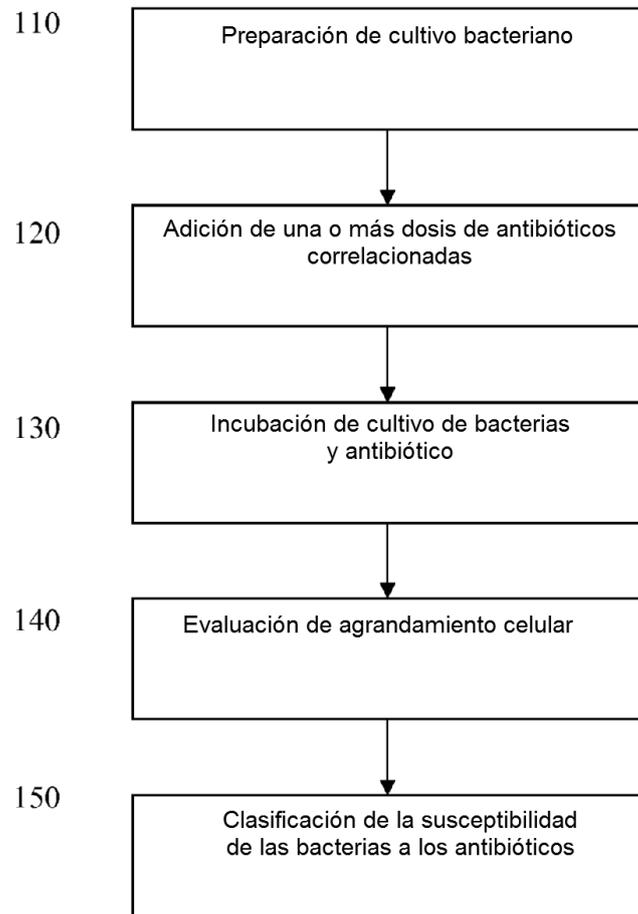


FIG. 1

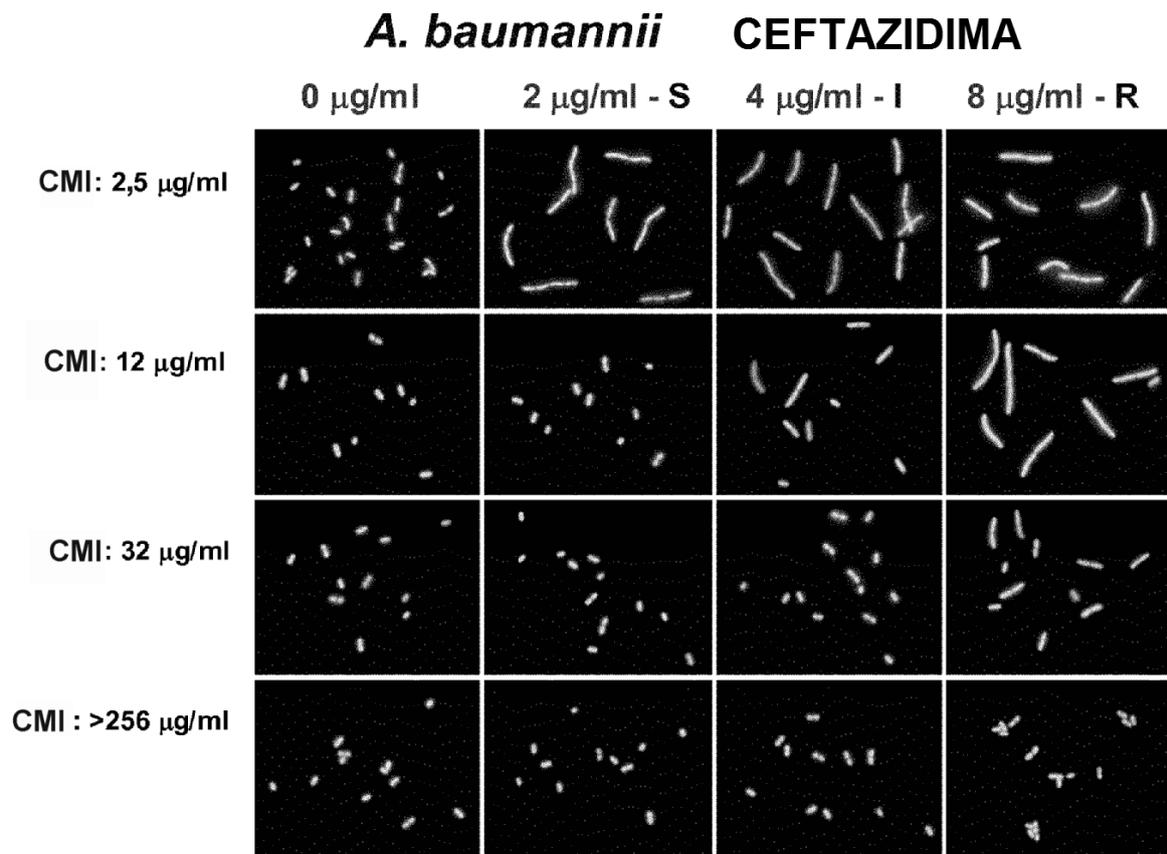


FIG. 2