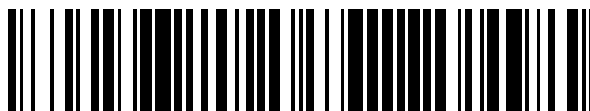


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 367**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2012 PCT/IB2012/052807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2012 E 12738605 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2714922**

54 Título: **Método de detección de los microorganismos resistentes a un agente terapéutico**

30 Prioridad:

03.06.2011 PT 11105744

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

01.02.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DO PORTO (100.0%)
Gabinete UPIN Praça Gomes Teixeira 4º andar
Sala 419
4099-002 Porto, PT**

72 Inventor/es:

**AZEVEDO PINA VAZ, CIDÁLIA IRENE;
AGOSTINHO GONÇALVES RODRIGUES,
ACÁCIO;
SANTOS SILVA DE FARIA RAMOS ANTUNES,
ISABELCRISTINA;
DOS SANTOS ROCHA DO ROSÁRIO, RITA
MAFALDA;
QUINTA E COSTA DE OLIVEIRA MORAIS, ANA
SOFIA y
PINTO E SILVA, ANA TERESA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 652 367 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 de detección de los microorganismos resistentes a un agente terapéutico

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un método de detección de los microorganismos resistentes a un agente terapéutico y a la determinación de los mecanismos de resistencia subyacentes.

10 **Antecedentes de la invención**

Actualmente, hay una necesidad principal de abreviar y de mejorar los procedimientos actuales de laboratorio para la detección y sobre todo para la evaluación de la susceptibilidad de los microorganismos. Una tecnología ideal de diagnóstico daría un perfil de susceptibilidad de forma cronológica para permitir el establecimiento del tratamiento apropiado basándose en ello.

En el caso de las infecciones más graves asociadas concretamente a septicemia, la velocidad es esencial. Se ha demostrado que el riesgo de mortalidad aumentaría sustancialmente por hora si se retarda el tratamiento antimicrobiano apropiado.

Los criterios de referencia de los métodos de diagnóstico actuales se basan en el cultivo que es lento, muy laborioso, que proporciona identificación fenotípica y ensayo de susceptibilidad antimicrobiano, que requiere 48-72 h después de recoger las muestras. Tiene que iniciarse tratamiento empírico a menudo con un antibiótico de amplio espectro, lo que da lugar al aumento de resistencia antimicrobiana.

Usando los ensayos clásicos, los productos biológicos como orina tiene que cultivarse en medios sólidos y solamente entonces podría tener lugar la identificación y la evaluación de la susceptibilidad. La sangre habitualmente se inocular en medios de caldo (cultivos sanguíneos) y se analiza automáticamente; cuando se vuelven positivos se siembran en medio sólido y solamente después de 24 h como mínimo se forman colonias para la evaluación de la susceptibilidad. Por otro lado, se necesitan otras 24 h para la determinación del perfil de susceptibilidad ya que se basan en la capacidad de crecer en presencia de un panel de fármacos.

La resistencia clínica podría estar relacionada con la ausencia de susceptibilidad antimicrobiana de la cepa, pero también a bajos niveles de fármaco antimicrobiano activo sobre la infección local. Hay protocolos bioquímicos disponibles para solamente unos pocos fármacos, por ejemplo, vancomicina, gentamicina y ampicacina, y podrían ser inactivos.

El documento C Pina-Vaz: Journal of Medical Microbiology, vol. 54, n.º 1, 1 de enero de 2005, páginas 77-81, XP55038987, ISSN: 0022-2615, describe un método seguro, fiable y rápido para estudiar la susceptibilidad a estreptomycin, isoniacida, rifampicina y etambutol. Los aislados de micobacterias, cultivados durante 72 h en ausencia o en presencia de fármacos antimicobacterianos en el tubo indicador de crecimiento de micobacterias (MGIT), se inactivaron por calor, se tiñeron con SYTO 16 (un tinte fluorescente de ácido nucleico que solamente penetra en las células con lesión grave de la membrana) y después se analizan por citometría de flujo.

El documento Pina-Vaz C et al., Clinical microbiology and infection, vol 7, n.º 11, páginas 609-618, XP001128799, ISSN: 1198-743X, divulga una determinación rápida y fiable de la susceptibilidad de cepas de *Candida* a anfotericina B (Am B), fluconazol (Flu) y 5-fluorocitosina (5-FC), usando métodos citométricos.

El documento de patente EP0118274 se refiere a procesos de ensayo microbiológico y aparatos para identificar productores de penicilinasa, en que a un recipiente para incubación de ensayo de una suspensión de cultivo de microorganismo con una densidad celular de aproximadamente 10⁸ por ml se proporciona penicilina, tamponamiento pobre y un indicador fluorescente, por ejemplo, una cumarina tal como 4-metil-umbeliferona, en cantidad suficiente para discriminar los productores de penicilinasa y los no productores después de tiempos de incubación durante aproximadamente una hora (hasta 18 horas).

El documento de patente WO 2009/095258 divulga un método para la detección de resistencia a un antibiótico en un microorganismo, que comprende las etapas de exponer el microorganismo sospechoso a un antibiótico marcado (fluorescente) y observar las diferencias entre este y un microorganismo no resistente del mismo tipo.

El documento Pina-Vaz C et al., Journal of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, vol 42, n.º 2, páginas 906-908, XP002547425, ISSN: 0095-1137 se refiere al uso de un citómetro láser de barrido para la detección de micobacterias directamente en muestras clínicas (frotis teñidos con yoduro de propidio-auramida).

65 **Sumario de la invención**

Esta invención se refiere a un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana realizado sobre cultivos microbianos puros -

un cultivo de laboratorio que contiene una única especie de organismo - o directamente de muestras biológicas - no cultivadas - por citometría de flujo. Algunas realizaciones preferidas a adoptar no requieren el uso de un cultivo puro obtenido de un producto biológico - que dura al menos 24 horas para que los microorganismos crezcan - de modo que se realiza un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana directamente de muestras biológicas - no cultivadas como orina, cultivos de sangre o de agua por análisis de fluorescencia como una citometría de flujo.

La materia objeto divulgada se refiere a un método para detectar microorganismos resistentes a un agente terapéutico en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- a. inocular dicha muestra, en un primer tubo con, y en un segundo tubo sin, al menos un agente terapéutico e incubarla, preferiblemente incluyendo un agente de lisis y/o un tampón;
- b. añadir a ambos tubos un marcador fluorescente;
- c. realizar un análisis de fluorescencia para obtener uno o más parámetros de fluorescencia o de crecimiento para cada uno de los dos tubos;

donde el fenotipo resistente de los microorganismos de la muestra biológica a dicho agente terapéutico se obtiene comparando el uno o más parámetros de fluorescencia entre los dos tubos.

La materia objeto divulgada también se refiere a un método para detectar microorganismos resistentes (una bacteria, un hongo o un protista) a un agente terapéutico en una muestra biológica. Concretamente, directamente de las muestras biológicas - no cultivadas - como una muestra de orina, cultivo de sangre, agua o una suspensión de microorganismos obtenidos de cultivos puros, que comprende las siguientes etapas:

- a. inocular dicha muestra, no cultivada, en un primer tubo con, o en un segundo tubo sin, al menos un agente terapéutico; preferentemente incluyendo además al menos un agente de lisis y/o un tampón, y/o un medio de cultivo adecuado, o poner la muestra en un tubo de suero de separación; e incubarla;
- b. añadir a ambos tubos un marcador fluorescente;
- c. realizar un análisis citométrico de flujo para obtener uno o más parámetros citométricos de flujo para cada uno de los dos tubos;

donde el fenotipo resistente de los microorganismos de la muestra biológica a dicho agente terapéutico se obtiene comparando el uno o más parámetros citométricos de flujo entre los dos tubos.

En otra realización, el uno o más parámetros citométricos de flujo comprenden parámetros de dispersión frontal y/o dispersión lateral y/o fluorescencia. Los parámetros de la señal de dispersión de fluorescencia podrían ser intensidad, perfil espectral y/o recuento de células.

En otra realización de la presente invención, el método divulgado comprende además una o más de las etapas preparatorias:

- identificar el tipo de microorganismo presente en la muestra biológica y, por consiguiente, seleccionar el agente o agentes terapéuticos, concretamente si el tipo es gram positivo o gram negativo;
- concentrar la muestra biológica y eliminar, si hubiera, cualquier residuo, por ejemplo, residuos de muestras sanguíneas, orina u otro producto biológico; preferentemente por centrifugación, filtración o uso de un tubo de suero de separación y centrifugar.

En otra realización de la presente invención, el tiempo de incubación de la muestra puede variar entre 30 minutos - 2 h, preferiblemente entre 30-60 minutos.

En otra realización de la presente invención, la temperatura de incubación de la muestra es entre 30-40 °C, preferiblemente entre 25-35 °C.

En otra realización de la presente invención, el tiempo de reacción de la etapa b) con el marcador fluorescente puede estar entre 5-60 minutos.

En otra realización de la presente invención, para la determinación de los mecanismos de resistencia de los microorganismos, la muestra biológica de la etapa c) puede comprender además un inhibidor enzimático, por ejemplo, en el caso de detección de la presencia de beta-lactamasas de espectro amplio (ESBL). El inhibidor enzimático preferido podría ser ácido clavulánico o tazobactam, o sus mezclas, entre otros.

En otro aspecto preferido de la presente invención, el método comprende además la siguiente etapa para detectar los mecanismos de resistencia de los microorganismos, como por ejemplo debido a la presencia de carbapenemasas - enzimas que degradan los carbapenems, un mecanismo importante de resistencia (se recomienda el ensayo de Hodge, que dura otras 24 horas, que es engorroso y difícil de interpretar):

- i. inocular dicha muestra con un carbapenem e incubarla;

- ii. retirar el microorganismo de la muestra biológica, preferiblemente por filtración;
- iii. añadir una cepa con comportamiento conocido - es decir, una cepa de control con una curva de efecto a la dosis conocida, como por ejemplo incubando una concentración en serie de un carbapenem con un microorganismo como *Escherichia coli*, cepa ATCC 25922 por citometría de flujo;
- 5 iv. añadir a ambas muestras un marcador fluorescente;
- v. realizar un análisis citométrico de flujo para obtener uno o más parámetros citométricos de flujo para cada uno de los dos tubos;
- vi. comparar el perfil generado con la cepa de control.

10 En presencia de carbapenemasas, la cepa ensayada degradará el carbapenem de modo que se reducirá el fármaco activo; el efecto de los carbapenems sobre el tipo de cepa se reduce. Si el efecto de una cierta concentración de carbapenem es inferior a la esperada, el microorganismo es un producto de carbapenemasa.

15 En una realización más preferida de la presente invención, el método comprende además la siguiente etapa para detectar los mecanismos de resistencia de los microorganismos, como por ejemplo debido a la presencia de carbapenemasas:

- obtener una curva de efecto a la dosis citométrica de flujo, incubando una concentración en serie de un carbapenem con un microorganismo como *Escherichia coli*, cepa ATCC 25922 por citometría de flujo;
- 20 • enfrentar una cepa resistente a carbapenems, retirar el microorganismo por filtración del tubo de ensayo que contiene la cepa después de incubación con una cierta concentración del carbapenem;
- este filtrado ahora se incuba con el tipo de cepa (ATCC) y se analiza su efecto por citometría de flujo; su efecto se compara con el resultado esperado respecto a la curva de efecto a la dosis.

25 En otra realización preferida, la cantidad terapéutica de cualquier fármaco en un líquido biológico podría evaluarse además basándose en la misma metodología.

30 En una realización más preferible del método para detectar microorganismos resistentes a un agente terapéutico en una muestra biológica, dicho microorganismo es un *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. *Enterococcus* spp; una enterobacteriacea como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp; una bacteria no fermentativa como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* o *Burkholderia cepaciae*; *Neisseria* spp, *Haemophilus* spp; *Mycobacterium* spp y *Nocardia* spp; *Legionella* spp y bacterias anaeróbicas; un hongo como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii* y moho como *Aspergillus* spp; un parásito como *Giardia* spp u otro microorganismo similar.

35 En otra realización preferida del método para detectar microorganismos resistentes a un agente terapéutico en una muestra biológica, el agente terapéutico podría ser un fármaco antibacteriano como penicilinas, cefalosporinas, otras beta-lactamas (carbapenems, aztreonam) macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos, glucopéptidos, un lipopéptido, tetraciclinas y otros (por ejemplo, colistina, cloranfenicol, clindamicina, fosfomicina, linezolid, nitrofurantoína, sulfonamida, rifampina, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol o tigeciclina); un antifúngico como polienos, 5-fluorocitosina, azoles o equinocandinas u otro agente terapéutico similar.

40 En otra realización preferible del método para detectar microorganismos resistentes a un agente terapéutico en una muestra biológica, el marcador fluorescente puede ser un tinte de ácido nucleico, un tinte metabólico, un tinte potencial de membrana, una sonda para orgánulos, un indicador fluorescente de la morfología celular y flujo de líquidos, una sonda para la viabilidad celular, proliferación y función o sonda para especies de oxígeno reactivo. Más preferiblemente, el marcador fluorescente es colorante de acridina, colorante de cianina, colorante de fluorona, colorante de oxacina, colorante de fenantridina o un colorante de rodamina.

45 En una realización diferente, la susceptibilidad antifúngica a mohos puede realizarse adicionalmente inoculando esporas en viales Bactec Mycosis IC/F o tubos MGIT con y sin antifúngicos como: anfotericina B, voriconazol y fluconazol; el tiempo hasta ser positivos - emisión de fluorescencia - se registrará por un equipo Bactec. En viales con cepas susceptibles con antifúngico se tardará al menos dos veces el tiempo en llegar a ser positivos en comparación con el vial de control - sin antifúngico.

50 La fluorescencia podría ser un citómetro de flujo o un BACTEC MGIT - tubo indicador del crecimiento de micobacterias.

55 La materia objeto divulgada permite la evaluación de la susceptibilidad de un microorganismos - concretamente agentes infecciosos - a los agentes antimicrobianos principales de colonias o de las muestras biológicas; los mohos tienen un protocolo diferente. La materia objeto divulgada permite además la detección de los mecanismos de resistencia e incluso ensayo microbiológico de cuantificación del fármaco en diferentes muestras biológicas.

60 Descripción general de la invención

65 Los métodos de laboratorio para el perfil de susceptibilidad usados en laboratorios clínicos rutinarios requieren un

tiempo mínimo de 48 horas. Este retardo se debe al hecho de que los métodos conocidos se basan en el crecimiento de microorganismos. En su lugar, la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana por análisis de fluorescencia, concretamente citometría de flujo basada en la evaluación del estado fisiológico de la célula después de exposición al fármaco dura un corto periodo de tiempo. La determinación de las lesiones morfológicas o la actividad fisiológica no es posible por la metodología clásica.

Han surgido muchos avances en el campo de la microbiológica, particularmente, respecto a la identificación de microorganismos usando técnicas de biología molecular. Sin embargo, esta tecnología presenta una limitación ya puede aplicarse únicamente a organismo cuyo genoma es conocido. Otro inconveniente se refiere a su alto coste. Además, la biología molecular proporciona únicamente de forma muy ocasional información sobre la susceptibilidad del microorganismo ya que, únicamente de forma ocasional, la presencia de un gen específico se sabe que confiere resistencia a un fármaco particular. Esta relación directa se establece en el caso específico de rifampicina respecto a la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* y resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*.

Las características que permiten que se realice el ensayo directamente del producto son:

- El hecho de que estos productos tengan una densidad celular suficiente (que excede preferiblemente 10^5) para exploración por citometría de flujo

- el cultivo sanguíneo se somete a una incubación previa que proporciona, después de ser positiva, el microorganismo que está a la densidad celular requerida para realizar los ensayos de susceptibilidad;

- las muestras de orina, cuyos criterios de infección corresponden a una densidad celular que excede 10^5 células por mililitro.

- En ambos productos, los microorganismos se encuentran en fase exponencial, esto se requiere porque la evaluación de susceptibilidad de algunos tipos de fármacos antimicrobianos debe tener microorganismos en la fase exponencial debido a su modo de acción.

La aplicación innovadora de citometría de flujo es la posibilidad de realizar una evaluación de múltiples parámetros de una población celular de microorganismos de forma dinámica, a lo largo del tiempo, y correlacionar esto con el estudio de su capacidad de replicación. Para demostrar una actividad letal rápidamente de un fármaco por el método convencional tenemos que demostrar que la célula es incapaz de replicarse. Por citometría de flujo, podríamos ser capaces de demostrar después de un tiempo de incubación de unos pocos minutos con un fármaco específico, una lesión grave de la membrana celular, que significa muerte. Además, los mecanismos de acción e incluso de forma más importante los mecanismos de resistencia podrían investigarse por citometría de flujo. Además, esta nueva estrategia permite el estudio de combinaciones de fármacos que a menudo se usan en pacientes críticos sin evidencias *in vitro* previas de efecto sinérgico.

Descripción de las figuras

Las siguientes figuras proporcionan realizaciones preferidas para ilustrar la descripción y no deben verse como limitantes del alcance de la invención.

Figura 1: Esquema de la metodología para una rápida evaluación de susceptibilidad antimicrobiana directamente de cultivos sanguíneos positivos o muestras de orina antes de la adquisición de citometría de flujo.

Figura 2: Esquema de dos realizaciones distintas de la presente invención - el método de detección de la susceptibilidad de un microorganismo a un agente terapéutico usando cultivos sanguíneos positivos o muestras de orina implementadas y los resultados obtenidos con cepas típicas susceptible y resistentes.

Figura 3: Histogramas de citometría de flujo de un ejemplo típico de una *Staphylococcus aureus* susceptible (MSSA) y resistente a oxacilina (MRSA) después de un tiempo de incubación de 2 horas y tinción con FDA.

Figura 4: Histogramas de citometría de flujo de un ejemplo típico de una *Enterococcus faecalis* susceptible y resistente a vancomicina después de un tiempo de incubación de 1 hora y tinción con FDA.

Figura 5: Histogramas de citometría de flujo de un ejemplo típico de una *Escherichia coli* susceptible y resistente a quinolonas, concretamente ciprofloxacina después de un tiempo de incubación de 1 hora y tinción con SYBR Green.

Figura 6: Histogramas de citometría de flujo de un ejemplo típico de *Escherichia coli* susceptible y resistente a cefotaxima (CTX) después de incubación durante 1 hora con el fármaco y teñida con DiBAC₄(3); en el caso de resistente a CTX se incuba con CTX con y sin ácido clavulánico (CLA) y se tiñe con DiBAC₄(3). La cepa positiva a ESBL se comporta como susceptible cuando se incuba con CLA.

Figura 7: Histogramas de citometría de flujo de un ejemplo típico de cepa de *Candida albicans* después de incubación durante 1 hora con anidulafungina, fluconazol o las asociaciones de ambos y teñida con DiBAC₄(3). A. Células de control (sin antifúngicos) y C después de incubación con los fármacos (C1-anidulafungina, C2-fluconazol y C3-anidulafungina y fluconazol).

Descripción detallada de la invención

Los métodos clásicos de susceptibilidad se basan en cultivos puros en medios sólidos. Se preparan suspensiones de microorganismos y conforme a ello se adecúan las placas/paneles de susceptibilidad (ejemplo: bacilos gram-negativos; cocos gram-positivos; hongos, etc.) respecto a métodos automáticos (sistema VITEK 1 o VITEK 2 - BioMerieux; BD Phoenix System - Becton-Dickinson Biosciences; MicroScan WalkAway System - Dade Behring).

Otros ensayos manuales están disponibles, como los ensayos de macrodilución y microdilución en caldo, ensayo E (AB BIODISK), ensayo de difusión en disco y paneles en forma seca (TREK Diagnostics).

Todos ellos se basan en el estudio de la capacidad de los microorganismos de replicarse en presencia de diferentes antimicrobianos.

En primer lugar, la mayor desventaja es que se realizan en colonias en medios sólidos que necesitan al menos 24 h para crecer. A pesar de que hay métodos semiautomatizados disponibles, se basan en la detección del crecimiento, que tarda tiempo en dar resultados (mín. 18-24 h), necesitan personal muy cualificado y son caros.

Métodos biomoleculares (no implementados en todos los laboratorios rutinarios).

Los métodos moleculares representaron una revolución para el ensayo en laboratorio de diagnóstico de microbiología principalmente relacionado con la identificación de microorganismos y únicamente en raras ocasiones puede ayudar a la evaluación de la susceptibilidad (PCR combinada, micromatrices, etc.).

De hecho, hay varios genes implicados en los mecanismos de resistencia, lo que da lugar, muchas veces, a etapas de secuenciación. Normalmente, hay una ausencia de correlación entre el genotipo y el fenotipo. A pesar de ser muy sensibles y específicos, no proporcionan ninguna información respecto a la viabilidad y son caros.

1. Preparación de una suspensión microbiana**1.1 Cultivos sanguíneos o muestra de orina**

A partir de un cultivo sanguíneo positivo o una muestra de orina:

- Se realiza una tinción gram (máximo: 10 minutos) o análisis de espectrometría de masas (Maldi-TOF) para guiar el posterior análisis. Esta etapa previa nos proporcionará información esencial a cerca del microorganismo, concretamente en términos de:

- Bacterias: cocos o bacilos; gram positivas o gram negativas - que da lugar a la elección de los antibióticos a ensayar;
- Hongos

- Se filtra (para recoger células hemáticas y desechos grandes) y se transfiere el cultivo sanguíneo o la orina a un vial que contiene una solución de lisis de sangre (solución acuosa de NH_4Cl , KHCO_3 y EDTA) o
- Se transfiere a un tubo de suero de separación (por ejemplo, tubo de gel Vacutainer) y se centrifuga. Las células sanguíneas permanecerán en el fondo del gel, los microorganismos en la parte superior del gel
- Se prepara una suspensión microbiológica en medio de cultivo filtrado estéril.

1.2 A partir de cultivos puros

Se hace una suspensión microbiana a partir de una colonia en medio de cultivo de caldo estéril y filtrado (por ejemplo: Müeller-Hinton) y se incuba hasta la fase de crecimiento exponencial.

1. Se incuba la suspensión bacteriana a 37 °C y 150 golpes por minuto, hasta que las bacterias alcanzan la primera fase de crecimiento exponencial (preferiblemente cuando la densidad óptica es de 0,2 a 600 nm de longitud de onda) en caldo Müeller-Hinton (Difco™) estéril y filtrado (0,22 μm).
2. Se diluye el cultivo de caldo hasta una D.O. = 0,06 (aproximadamente 10^6 células por ml, que es la densidad celular óptima para su lectura en un citómetro de flujo) o como alternativa se ajusta a 0,5 MacFarland y después de ello se diluye preferiblemente 1:100 en cultivo de caldo.

2. Tratamiento antimicrobiano *in vitro*

- Se obtiene la densidad celular para el ensayo de susceptibilidad por citometría de flujo, que podría ser, por ejemplo, 10^6 células/ml.
- Se transfiere la suspensión microbiana a un conjunto de viales con diferentes fármacos antimicrobianos (a concentraciones de valor crítico) incluyendo un vial de control (sin fármaco antimicrobiano);
- Se incuban los viales de acuerdo con el fármaco antimicrobiano (0,5-2 horas);

- Se añade el fluorocromo apropiado (dependiendo del fármaco antimicrobiano) de acuerdo con el protocolo optimizado previo.

3. Análisis citométrico de flujo

5 Los ajustes de adquisición se definen usando mezclas de microesferas ajustando el voltaje al tercer decenio logarítmico (log) de todos los canales de fluorescencia. Se usa el umbral FSC.

10 Las muestras se analizan en el canal de fluorescencia FL1, FL2 y FL3 dependiendo de la sonda fluorescente, usando dos transferencias puntuales: SSC frente a FSC y SCC frente a fluorescencia. Los resultados numéricos se expresan usando la intensidad de la fluorescencia y/o el porcentaje de células teñidas.

15 El equipo es un citómetro de flujo (por ejemplo, un FACSCalibur BD Biosciences, Sídney, Australia) con tres PMT equipados con filtros convencionales (FL1: BP 530/30 nm; FL2: BP 585/42 nm; FL3: LP 670 nm), un láser de argón de 488 nm de 15 mW y que funciona con el software de células Quest Pro (versión 4.0.2, BDBiosciences, Sídney). El formato del archivo de datos de citometría de flujo fue FCS 2.0^a.

Ejemplos

20 Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones preferidas y no deben observarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo n.º 1

25 Evaluación de susceptibilidad de *Escherichia coli* a quinolonas

- Agente microbiano: *Escherichia coli*
- Fármaco ensayado: quinolona - ciprofloxacina
[2 concentraciones de valor crítico: 1 y 4 µg/ml]
- Fluorocromo usado: SYBR Green, un colorante que penetra en la membrana que se une a la estructura de ADN bicatenario.

35 1. Se distribuye la suspensión de bacterias con la concentración de 10⁶ células por ml a una serie de viales que contienen:

- Ciprofloxacina a 1 µg/ml;
- Ciprofloxacina a 4 µg/ml;
- Control viable (sin ciprofloxacina).

40 2. Después de treinta minutos de incubación a 35 °C y 150 golpes por minuto, se centrifuga el conjunto de viales a 10 000 rpm durante cinco minutos.

45 3. Se añade SYBR Green (preparado en TE, pH = 7,5) a una dilución final de 1:100 000 durante 30 minutos en la oscuridad.

4. Se realiza la adquisición citométrica de flujo a 530/30 nm - FL1; se compara la intensidad de la fluorescencia de las células tratadas con células no tratadas.

Criterios de interpretación de resultados:

50 La ciprofloxacina actúa inhibiendo la ADN girasa y bloquea la replicación del ADN, que da lugar a menos ADN bicatenario que es la diana para el fluorocromo SYBR Green. Por lo tanto, se espera que las cepas susceptibles (valores de MIC <1 µg/ml) a ciprofloxacina muestren una reducción del ADN bicatenario - correspondiente a menos intensidad de fluorescencia.

55 Se calcula un índice de tinción (SI) basándose en la relación entre la intensidad de la fluorescencia verde (530/30 nm; FL-1) de las células tratadas y de las células no tratadas (control viable)

- Bacterias susceptibles si **SI** < 1 con 1 µg/ml de ciprofloxacina;
- Bacterias resistentes si **SI** ≥ 1 con 4 µg/ml de ciprofloxacina.

Ejemplo n.º 2

65 Evaluación de susceptibilidad para bacterias gram negativas a carbapenems

- Agente microbiano: *Pseudomonas aeruginosa*

- Fármaco ensayado: carbapenems - meropenem
[3 concentraciones de valor crítico: preferiblemente 1, 2 o 4 µg/ml]
- Fluorocromo usado: trimetina oxonol de bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) (DiBAC₄(3)) - un anión lipófilo sensible a voltaje para la medición de potenciales de membrana; las células despolarizadas muestran mayor intensidad de fluorescencia mientras que las células polarizadas muestran un valor inferior.

1. Se distribuye la suspensión de bacterias con la concentración de 10⁶ células por ml a una serie de viales que contienen:

- Meropenem a 1 µg/ml;
- Meropenem a 4 µg/ml;
- Control viable (sin meropenem)

2. Después de treinta minutos de incubación a 35 °C y a 150 golpes por minuto, se añade DiBAC₄(3) a una concentración final de 1 µg/ml durante 30 minutos en la oscuridad.

3. Se realiza la adquisición citométrica de flujo a 530/30 nm - FL1; se compara la intensidad de fluorescencia de las células tratadas con células no tratadas.

Criterios de interpretación de resultados:

El meropenem es un bactericida que actúa inhibiendo la síntesis de la capa de peptidoglucano de las paredes de las células bacterianas. La despolarización de la membrana puede detectarse rápidamente por DiBAC₄(3) en cepas susceptibles. Las células despolarizadas muestran mayor intensidad de fluorescencia mientras que las células polarizadas muestran un valor inferior.

Se calcula un índice de tinción (SI) basándose en la relación entre la intensidad de fluorescencia verde (530/30 nm; FL-1) de las células despolarizadas después del tratamiento con el antimicrobiano y las células de control (no tratadas).

- Bacterias susceptibles **SI < 1** con 1 µg/ml de meropenem;
- Bacterias resistentes **SI ≥ 1** con 4 µg/ml de meropenem;

Ejemplo n.º 3

Evaluación de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a oxacilina

- Agente microbiano: *Staphylococcus aureus*
- Fármaco ensayado: oxacilina
[2 concentraciones: 2, 4 µg/ml]
- Fluorocromo usado: FDA (diacetato de fluoresceína), un indicador fluorescente de viabilidad celular; en células viables tras hidrólisis por esterases, FDA forma fluoresceína.

1. Se distribuye la suspensión de bacterias con la concentración de 10⁶ células por ml a una serie de viales que contienen:

- oxacilina a 2 µg/ml
- oxacilina a 4 µg/ml;
- control viable (sin oxacilina).

2. Después de 120 minutos de incubación a 35 °C, se añade FDA a 1 µg/ml y se incuba durante 60 minutos en las mismas condiciones.

3. Se realiza la adquisición citométrica de flujo a 530/30 nm - FL1; se compara la intensidad de la fluorescencia de las células tratadas con células no tratadas.

Criterios de interpretación de resultados:

La oxacilina es un bactericida que actúa inhibiendo la síntesis de la capa de peptidoglucano de las paredes de células bacterianas. Por lo tanto, se espera que las cepas susceptibles (valores de MIC ≤ 2 µg/ml) a oxacilina muestren una reducción de la actividad metabólica - correspondiente a menos intensidad de fluorescencia de fluoresceína.

Se calcula un índice de tinción (SI) basándose en la relación entre la intensidad de fluorescencia verde (530/30 nm; FL-1) de las células tratadas y células no tratadas (control viable)

- Bacterias susceptibles **SI < 1** con 2 µg/ml de oxacilina;
- Bacterias resistentes **SI ≥ 1** con 4 µg/ml de oxacilina.

Ejemplo n.º 4

5

Evaluación de susceptibilidad de bacterias gram positivas a vancomicina

- Agente microbiano: *Enterococcus faecalis*
- Fármaco ensayado: Glucopéptido - vancomicina
[2 concentraciones de valor crítico: 4 - 16 µg/ml]
- Fluorocromo usado: FDA (diacetato de fluoresceína), un indicador fluorescente de viabilidad celular; en células viables tras hidrólisis por esterases, FDA forma emisión de fluorescencia creciente de fluoresceína.

10

15

1. Se distribuye la suspensión de bacterias con la concentración de 10⁶ células por ml a una serie de viales que contienen:

- vancomicina a 4 µg/ml
- vancomicina a 16 µg/ml;
- control viable (sin oxacilina).

20

2. Después de 60 minutos de incubación a 35 °C y 150 golpes por minuto, se añade FDA a 1 µg/ml y se incuba durante 30 minutos en las mismas condiciones.

25

3. Se realiza la adquisición citométrica de flujo a 530/30 nm - FL1; se compara la intensidad de la fluorescencia de las células tratadas con células no tratadas.

Criterios de interpretación de resultados:

30

La vancomicina es un bactericida que actúa inhibiendo la síntesis de la capa de peptidoglucano de las paredes de células bacterianas. Por lo tanto, se espera que las cepas susceptibles (valores de MIC ≤ 2 µg/ml) a vancomicina muestren una reducción de la actividad metabólica - correspondiente a menos intensidad de fluorescencia de fluoresceína.

35

Se calcula un índice de tinción (SI) basándose en la relación entre la intensidad de fluorescencia verde (530/30 nm; FL-1) de las células tratadas y células no tratadas (control viable)

- Bacterias susceptibles **SI < 1** con 4 µg/ml de vancomicina;
- Bacterias resistentes **SI ≥ 1** con 16 µg/ml de vancomicina.

40

Ejemplo n.º 5 - Estudio de mecanismos de resistencia

Resistencia por β-lactamasas de amplio espectro (ESBL)

45

- Agente microbiano: *Klebsiella pneumoniae*
- Fármaco ensayado: cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ) 2 concentraciones de valor crítico:
 - 1 y 4 µg/ml para CTX
 - 4 y 16 µg/ml para CAZ
- Inhibidor de fármaco ensayado: ácido clavulánico (CLA) - 4 µg/ml
- Fluorocromo usado: trimetina oxonol de bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) (DiBAC₄(3)) - un anión lipófilo sensible a voltaje para la medición de potenciales de membrana.

50

1. Distribuir la suspensión de bacterias con la concentración de 10⁶ células por ml en una serie de viales que contienen:

55

- CTX a 1 µg/ml;
- CTX a 4 µg/ml;
- CTX a 1 µg/ml + 4 µg/ml CLA;
- CTX a 4 µg/ml + 4 µg/ml CLA;
- CAZ a 4 µg/ml;
- CAZ a 16 µg/ml;
- CAZ a 4 µg/ml + 4 µg/ml CLA;
- CAZ a 16 µg/ml + 4 µg/ml CLA;
- Control viable (sin cefalosporinas)

60

65

2. Después de 30 minutos de incubación a 35 °C y 150 golpes por minuto, se añade DiBAC₄(3) a una concentración final de 1 µg/ml durante 30 minutos en la oscuridad.

3. Se realiza el análisis de citometría de flujo con el protocolo apropiado y se lee a 530/30 nm - FL1.

Criterios de interpretación de resultados:

- 5 Se detectan ESBL basándose en su capacidad de hidrolizar cefalosporinas (CTX y CAZ) pero se inhiben por ácido clavulánico (CLA), es decir, se espera que detecte una bacteria que es resistente a cefalosporinas a través de la producción de ESBL cuando se vuelven susceptibles por la exposición a cefalosporinas asociadas con CLA. Se calcula un índice de tinción basándose en la relación entre la intensidad de fluorescencia verde (530/30 nm; FL1) de células despolarizadas (células muertas; células con alta intensidad de fluorescencia) después del tratamiento con las máximas concentraciones de ambas cefalosporinas (4 µg/ml de cefotaxima (CTX) y 16 µg/ml de ceftazidima (CAZ)) con y sin la presencia de CLA - en este caso específico, denominado **índice CLA**.
 10 **Índice CLA > 1,5** (para al menos una cefalosporina) bacteria productora de ESBL
Índice CLA ≤ 1,5 bacteria productora negativa de ESBL

15 **Ejemplo n.º 6**

Evaluación de susceptibilidad de una combinación de fármacos de un cultivo sanguíneo positivo para levaduras

Se filtra y usa el agente de lisis o se usa un tubo separador y se centrifuga

- 20 • Se realiza un análisis Gram - levaduras o MaldiTof - *Candida albicans*
 • Fármaco ensayado: anidulafungina y fluconazol aislados y en asociación
 • Fluorocromo usado: FUN-1, un marcador fluorescente usado para estudiar la viabilidad de levaduras
 NOTA: las células no viables muestran mayor intensidad de fluorescencia que las viables (células no tratadas)
 25 • Después de 60 minutos de incubación con el antifúngico aislado y en asociación a 37 °C, se añade FUN-1 a una concentración final de 0,5 µg/ml durante 30 minutos en la oscuridad.

Se realiza la adquisición citométrica de flujo a 575 nm - FL2; se calcula un índice de fluorescencia como la suma de relaciones entre la fluorescencia de células tratadas con la asociación de antifúngico y la fluorescencia de células tratadas con cada antifúngico individual. La asociación se clasifica como sinérgica, indiferente o antagonista.

30

Criterios de interpretación de resultados:

La evaluación de la interacción de fármacos *in vitro* se determina de acuerdo con el índice de tinción (SI). El SI se calcula como la suma de la intensidad media de la fluorescencia presentada por células tratadas con combinación de fármacos (0,5 x MIC de cada fármaco) dividida por la fluorescencia del fármaco en solitario. Por tanto, SI = (MIF AND + FLU/MIF AND) + (MIF AND + FLU/MIF FLU) (MIF - relación entre la intensidad media de fluorescencia de células tratadas y células viables). Una asociación se define como "antagonismo" para SI < 1, "indiferente" para SI entre 1-4 y "sinergia" para un SI > 4.

40 **Ejemplo n.º 7**

Susceptibilidad antifúngica de *Aspergillus fumigatus*

- 45 • Se prepara una suspensión densa de *Aspergillus fumigatus*;
 • se inoculan 10⁷ esporas/ml en una serie de viales Bactec de Micosis IC/F o en tubos MGIT de equipos Bactec automatizados (Becton Dickinson);
 • cada serie incluye un vial o tubo sin antifúngico (control), uno con anfotericina B, uno con posaconazol y uno con voriconazol;
 • los viales o tubos se introducen en el equipo Bactec respectivo y se registra el tiempo hasta llegar a ser positivos

50

Criterios de interpretación de resultados:

Las cepas susceptibles incubadas con antifúngicos tardarían más del doble del tiempo en llegar a ser positivas en comparación con el control. Los tubos MGIT dieron resultados más rápidos que los viales Bactec (por ejemplo, las muestras de control tardan 7 ± 1 horas en viales Bactec frente a 11 ± 1 horas en tubos MGIT)

55

Ejemplo n.º 8

Cuantificación antimicrobiana microbiológica de un líquido biológico

60

- Se usa una cepa de control con una curva de efecto a la dosis citométrica de flujo conocida cuando se incuba con el antimicrobiano que se desea cuantificar;
 • se incuba la muestra biológica con la cepa de control;
 • se marcan las dos muestras previas con un marcador fluorescente adecuado para evaluar el efecto antimicrobiano;
 65 • se obtiene la fluorescencia citométrica de flujo y las señales de dispersión para generar un perfil de dicho

microorganismo.

Criterios de interpretación de resultados:

- 5 Se compara el perfil citométrico de flujo generado con la curva de la muestra de control y se deduce la concentración presente en la muestra.

- 10 La invención, por supuesto, no debe restringirse de ninguna manera a las realizaciones descritas y un experto en la materia preverá muchas posibilidades de modificaciones de la misma sin alejarse de la idea básica de la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las siguientes reivindicaciones exponen realizaciones particulares de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar microorganismos resistentes a un agente terapéutico en una muestra biológica, en el que dicha muestra biológica es una muestra no cultivada, que comprende las siguientes etapas:

- a. inocular dicha muestra, en un primer tubo con, y en un segundo tubo sin, al menos un agente terapéutico e incubarla, preferiblemente incluyendo un agente de lisis y/o un tampón;
- b. añadir a ambos tubos un marcador fluorescente;
- c. realizar un análisis de fluorescencia para obtener uno o más parámetros de fluorescencia para cada uno de los dos tubos;

en el que el fenotipo resistente de los microorganismos de la muestra biológica a dicho agente terapéutico se obtiene comparando el uno o más parámetros de fluorescencia entre los dos tubos.

2. Un método para detectar microorganismos resistentes a un agente terapéutico en una muestra biológica, en el que dicha muestra biológica es una muestra no cultivada, que comprende las siguientes etapas:

- a. inocular dicha muestra, en un primer tubo con, y en un segundo tubo sin, al menos un agente terapéutico e incubarla, preferiblemente incluyendo un agente de lisis y/o un tampón;
- b. añadir a ambos tubos un marcador fluorescente;
- c. realizar un análisis citométrico de flujo para obtener uno o más parámetros citométricos de flujo para cada uno de los dos tubos;

en el que el fenotipo resistente de los microorganismos de la muestra biológica a dicho agente terapéutico se obtiene comparando el uno o más parámetros citométricos de flujo entre los dos tubos.

3. El método de acuerdo con las reivindicaciones previas, en el que el uno o más parámetros citométricos de flujo comprenden dispersión frontal y/o dispersión lateral y/o parámetros de fluorescencia; preferiblemente en el que dicha señal de dispersión de fluorescencia comprende la intensidad, perfil espectral y/o recuento celular.

4. El método de acuerdo con las reivindicaciones previas que comprende además una o más de las etapas de preparación:

- i. identificar el tipo de microorganismo presente en la muestra biológica y, por consiguiente, seleccionar el agente o agentes terapéuticos, concretamente si el tipo es bacterias gram-positivas o gram-negativas u hongos;
- ii. concentrar la muestra biológica y eliminar, si hubiera, cualquier residuo, en particular con una centrifugación o una filtración.

5. El método de acuerdo con las reivindicaciones previas, en el que en la etapa a) la muestra se inocula en un medio de cultivo adecuado.

6. El método de acuerdo con la reivindicación previa, en el que el tiempo de reacción de la etapa b) con el marcador fluorescente es de 5-60 minutos.

7. El método de acuerdo con las reivindicaciones previas, en el que la muestra biológica en la etapa c) comprende además un inhibidor enzimático en el caso de detección de presencia de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL).

8. El método de acuerdo con la reivindicación previa, en el que el inhibidor enzimático es un ácido clavulánico o tazobactama.

9. El método de acuerdo con las reivindicaciones previas, que comprende además la siguiente etapa:

- i. inocular dicha muestra con un carbapenem e incubarla;
- ii. retirar el microorganismo de la muestra biológica, preferiblemente por filtración;
- iii. añadir una cepa con comportamiento conocido;
- iv. añadir a ambas muestras un marcador fluorescente;
- v. realizar un análisis citométrico de flujo para obtener uno o más parámetros citométricos de flujo para cada uno de los dos tubos;
- vi. comparar el perfil generado con la cepa de control.

10. El método de acuerdo con las reivindicaciones previas, en el que dicho microorganismo es una bacteria, un hongo o un protista, en particular dicha bacteria es una bacteria gram-positiva o negativa; gram-variable o con incapacidad de tinción Gram como *Mollicutes*; o una bacteria ácido-alcohol resistente.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho microorganismo es una *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. *Enterococcus* spp; *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus* spp;

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepaciae*; *Neisseria* spp, *Haemophilus* spp; *Mycobacteria* spp, *Nocardia* spp; *Legionella* spp, bacterias anaeróbicas; *Candida* spp. *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii* o mohos como *Aspergillus* spp; *Giardia* spp.

- 5 12. El método de acuerdo con las reivindicaciones previas, en el que el agente terapéutico es un fármaco antibacteriano como penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, aztreonam, macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos, glucopéptidos, un lipopéptido, tetraciclinas colistina, cloranfenicol, clindamicina, fosfomicina, linezolid, nitrofurantoína, sulfonamida, rifampina, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol o tigeciclina, polienos, 5-fluorocitosina, azoles o equinocandinas.
- 10 13. El método de acuerdo con las reivindicaciones previas, en el que el marcador fluorescente es un tinte de ácido nucleico, un tinte metabólico, un tinte potencial de membrana, una sonda para orgánulos, un indicador fluorescente de morfología celular y flujo de líquidos, una sonda para la viabilidad celular, proliferación y función o sonda para especies de oxígeno reactivo, preferiblemente dicho marcador fluorescente es un colorante de acridina, un colorante de cianina, un colorante de fluorona, un colorante de oxacina, un colorante de fenantridina o un colorante de rodamina.
- 15

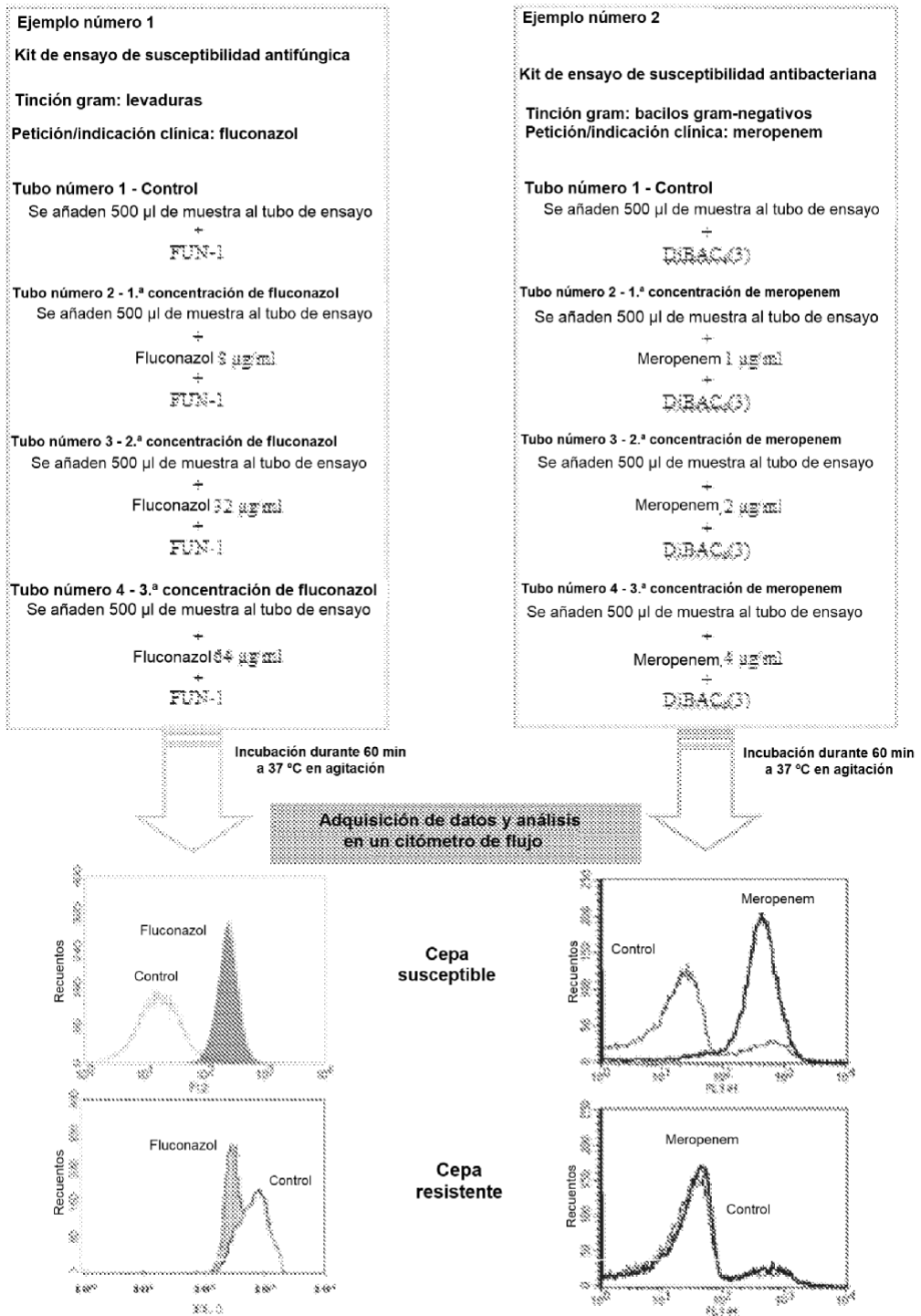
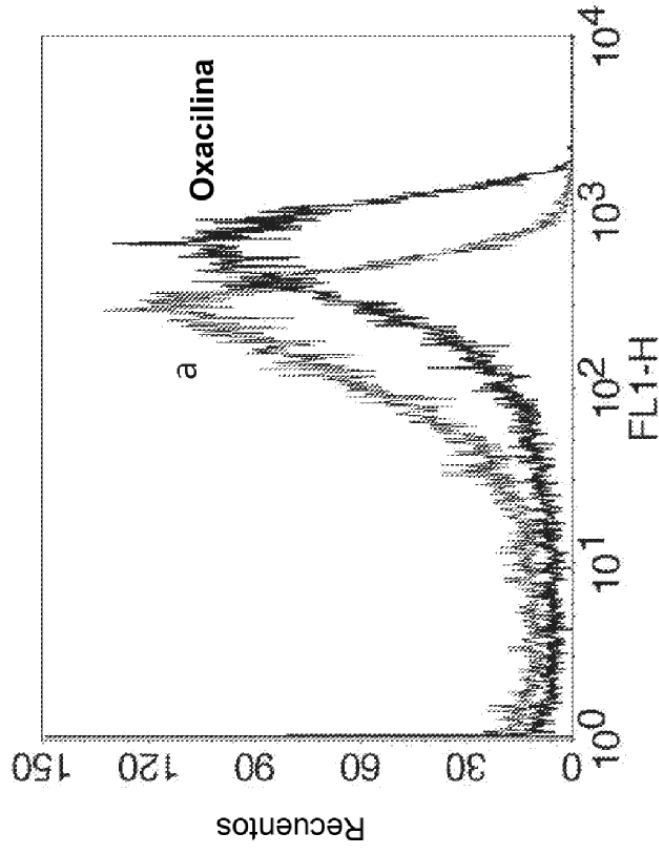
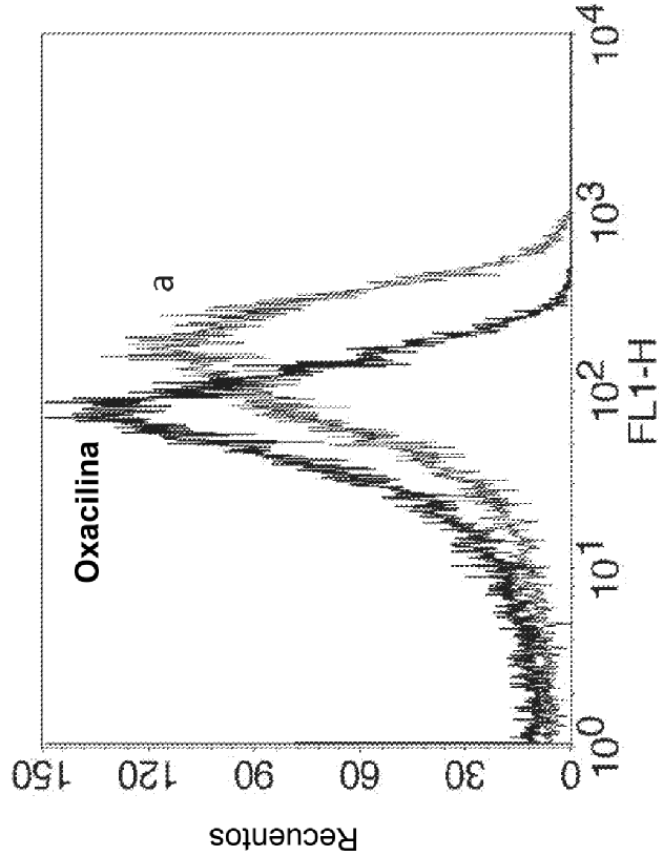


FIGURA 2

Staphylococcus aureus



Cepa resistente



Cepa susceptible

FIGURA 3

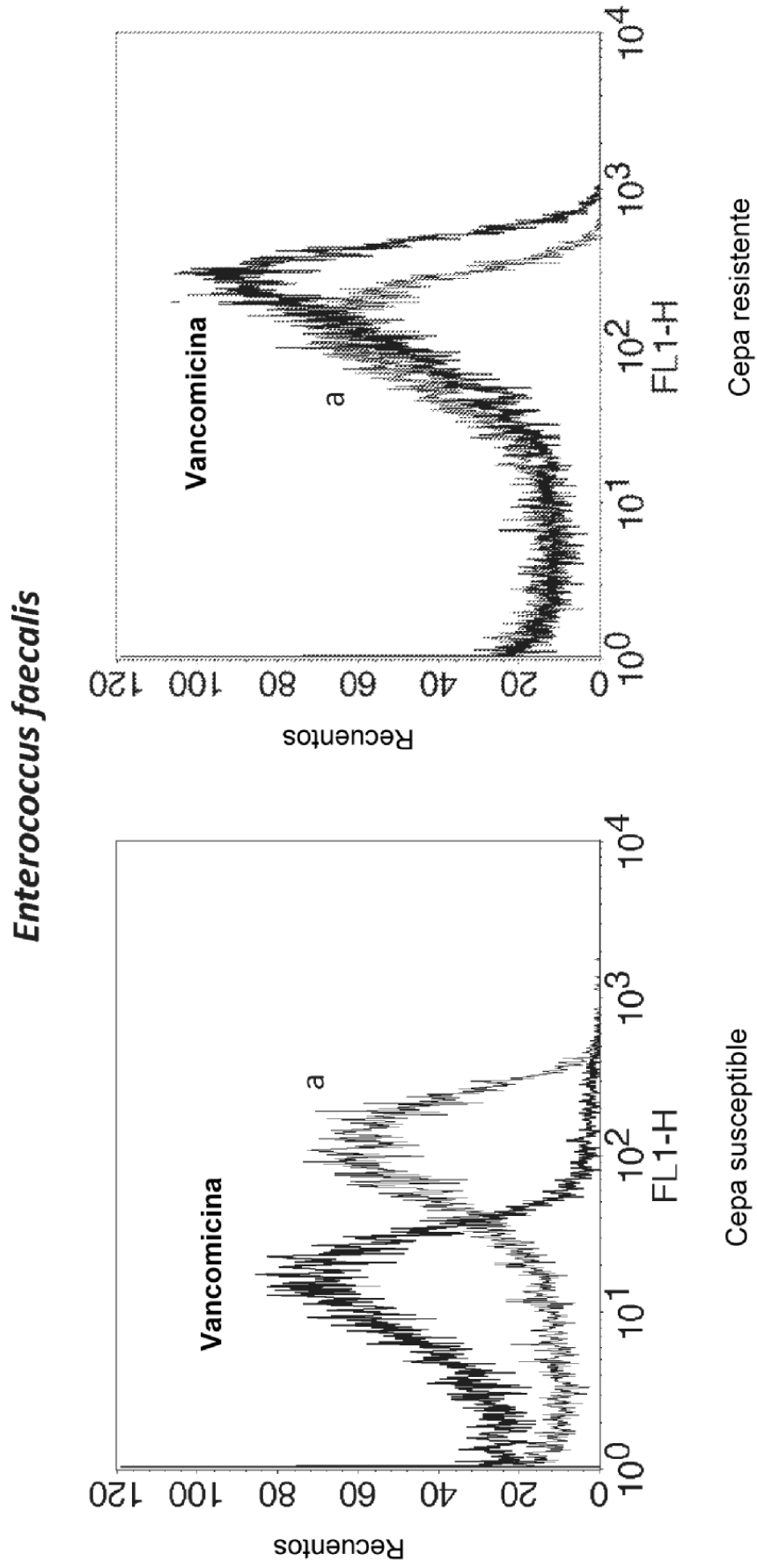
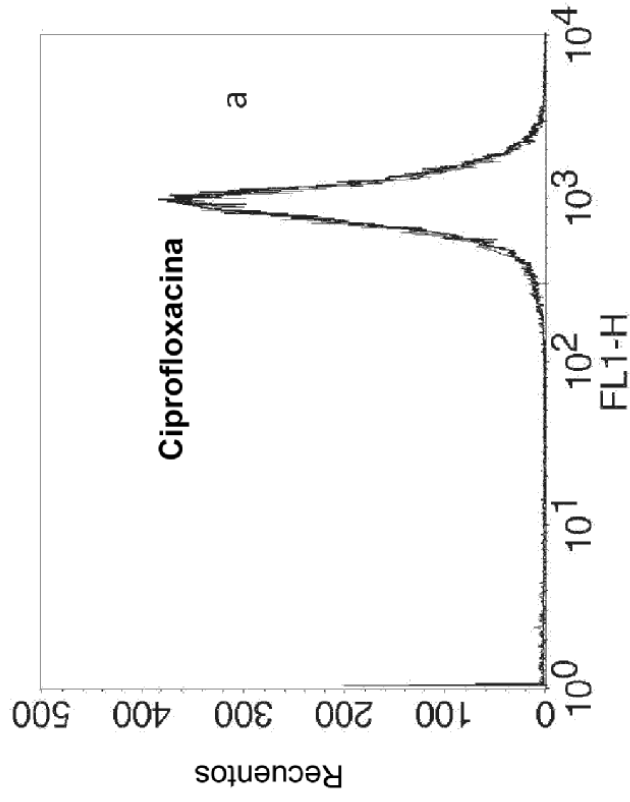
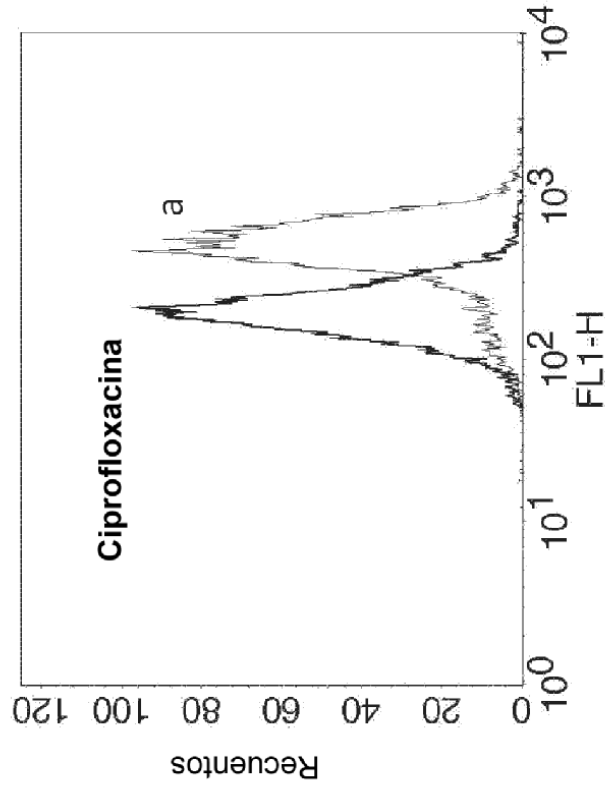


FIGURA 4

Escherichia coli



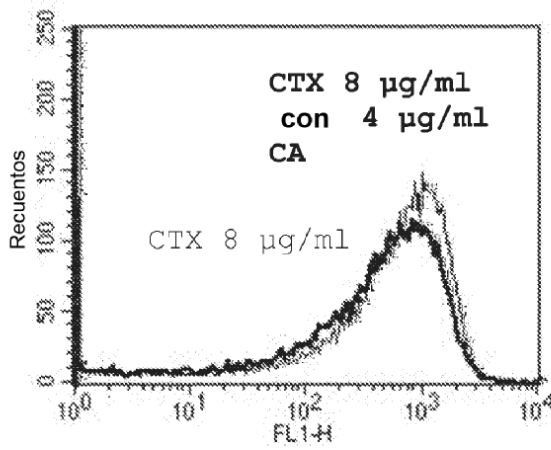
Cepa resistente



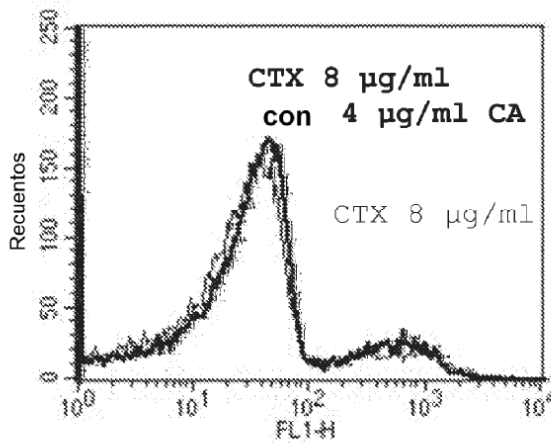
Cepa susceptible

FIGURA 5

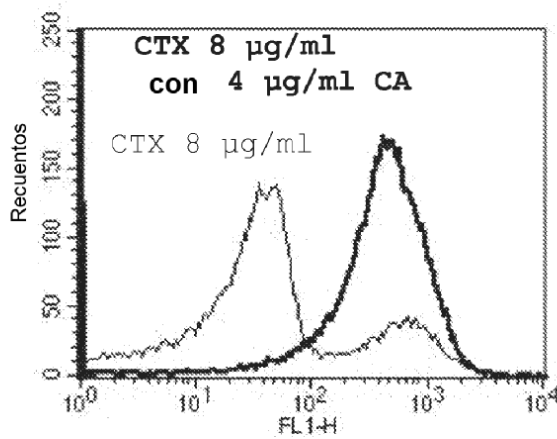
Escherichia coli



Susceptible a cefotaxima (CTX)



Resistente a cefotaxima (CTX)
ESBL negativa



Resistente a cefotaxima (CTX)
ESBL positiva

FIGURA 6

Candida albicans

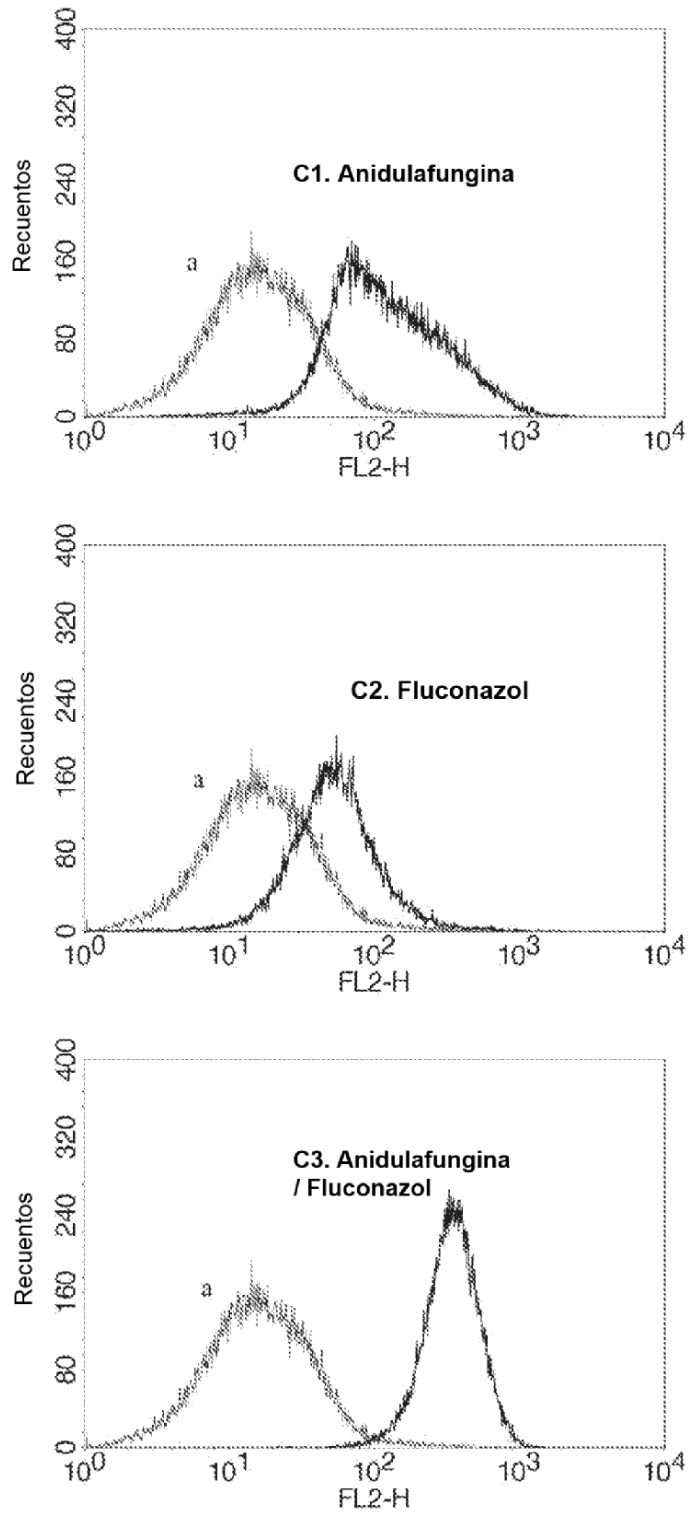


FIGURA 7