

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 517**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/18** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2015 PCT/EP2015/050526**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2015 E 15700451 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3094739**

54 Título: **Determinación espectrométrica de masas de resistencias midiendo el metabolismo**

30 Prioridad:  
**17.01.2014 DE 102014000646**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.03.2019**

73 Titular/es:  
**BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%)  
Fahrenheitstrasse 4  
28359 Bremen, DE**

72 Inventor/es:  
**KOSTRZEWA, MARKUS y  
SPARBIER, KATRIN**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 706 517 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Determinación espectrométrica de masas de resistencias midiendo el metabolismo

La invención se refiere a un método espectrométrico de masas para determinar resistencias microbianas a los antibióticos.

5 **Definiciones**

En lugar de la "unidad de masa atómica unificada" (u) reglamentaria, este documento usa el "dalton", que se añadió en la última (octava) edición de 2006 del documento "The International System of Units (SI)" del "Bureau International des Poids et Mesures" en pie de igualdad con la unidad de masa atómica unificada. Como se apunta allí, esto se hizo principalmente para permitir el uso de las unidades kilodalton, milidalton y similares.

10 Por razones de simplicidad, solo se usa el término "péptidos" en este documento, aunque las moléculas implicadas podrían ser también proteínas. En la técnica anterior, la transición de los péptidos más ligeros a las proteínas más pesadas es suave y no está definida claramente.

15 Cuando se usa aquí el término microorganismos, denominados también gérmenes y microbios más adelante, se refiere a organismos microscópicamente pequeños que incluyen bacterias, hongos unicelulares (p.ej., levaduras), algas microscópicas y protozoos, por ejemplo. El singular "microorganismo" o "microbio" se usa para una célula microbiana individual, así como una cepa de microbios o aislamiento de células microbianas idénticas genéticamente. El plural "microbios" significa generalmente las células microbianas bajo análisis.

Como es habitual en el lenguaje general, el término "antibiótico" significa una sustancia farmacológicamente activa para el tratamiento de enfermedades infecciosas microbianas.

20 **Técnica anterior**

Desde que se usó la penicilina como primer antibiótico farmacológico, las cepas microbianas han desarrollado cada vez más diversos tipos de resistencia a diferentes tipos de antibióticos, o los han adquirido de otros microbios, es decir, los microbios adquirieron características que les permiten debilitar el efecto de las sustancias antibióticas o neutralizarlo completamente. Mientras tanto, por desgracia, las resistencias son frecuentes; los microbios que aparecen en los hospitales son predominantemente resistentes hoy en día. En algunos casos es posible predecir la resistencia de un microbio transmitido dentro de un hospital a los antibióticos usados habitualmente en el hospital; esto no se aplica, sin embargo, a infecciones que fueron contraídas fuera del hospital. Los métodos usados en el mercado para determinar resistencias que detectan la zona de crecimiento bacteriano en medios nutrientes que contienen antibióticos, o el cambio en opacidad relacionado con el crecimiento en cultivos líquidos que contienen antibióticos, requieren mucho tiempo, y habitualmente llevan más de un día de trabajo; es extremadamente importante, sin embargo, una determinación rápida de la resistencia a los antibióticos de una muestra microbiana o un aislamiento microbiano. Se están desarrollando métodos espectrométricos rápidos.

35 La memoria descriptiva de patente DE 10 2006 021 493 B4 (V. M. Govorun y J. Franzen, 2006, que corresponde a los documentos GB 2438066 B, US 8.293.496 B2; llamado "Govorun" en lo sucesivo) describe métodos espectrométricos de masas para determinar la resistencia de los microbios, en los que se miden por espectrometría de masas perfiles proteínicos de los microbios después de ser cultivados en medios con y sin antibióticos añadidos, y se comparan.

40 Específicamente, para detectar la resistencia a las beta-lactamasas (penicilinas y sustancias relacionadas), se han desarrollado métodos espectrométricos de masas que se describen en los documentos DE 10 2010 023 452 B4 (M. Kostrzewa et al.), que es el documento de prioridad de la solicitud de patente internacional WO 2011/154517 A1, y el documento DE 10 2011 012 060 A1. Se basan en la medida de la descomposición de sustratos específicos, que son similares a los antibióticos, en las inmediaciones de los microbios. El documento WO 2012/023845 A1 (Luider et al.) se refiere a un método para caracterizar la resistencia a los antibióticos de un microorganismo, comprendiendo dicho método las etapas de (a) proporcionar un espectro de masas de referencia de un compuesto antimicrobiano, su producto de modificación enzimática, su diana molecular, o de un compuesto sustrato de su enzima modificadora; (b) exponer un microorganismo, un lisado celular del mismo, o un sobrenadante del medio de crecimiento del mismo, a dicho compuesto antimicrobiano o dicho compuesto sustrato en líquido acuoso para proporcionar de este modo una muestra expuesta; (c) adquirir un espectro de masas de la muestra expuesta; (d) comparar el espectro de masas adquirido en la etapa c) con el espectro de masas de referencia de la etapa (a), y (e) determinar a partir de dicha comparación si se ha producido una modificación de dicho compuesto antimicrobiano, su producto de modificación o su diana molecular o de dicho sustrato después de dicha exposición, y establecer que dicho microorganismo es potencialmente resistente a dicho compuesto antimicrobiano cuando se observa dicha modificación.

45 Crespo et al. (Journal of Microbiological Methods, Vol. 86, No. 1, 1 de enero de 2011, Páginas 8-15) describen la detección de cambios en la emisión de metabolitos volátiles por *Mycobacterium smegmatis* después de la adición de agentes antimicrobianos específicos por espectrometría de masas con reacción de transferencia de protones.

55 En los documentos de solicitud EP 13002450.8 (K. Sparbier et al) y EP 13002699.0 (K. Sparbier y C. Lange), se

describen métodos espectrométricos de masas adicionales para determinar resistencias, por los que se mide la absorción de componentes nutrientes marcados isotópicamente, o el aumento en la biomasa microbiana en presencia de antibióticos. La absorción de nutrientes marcados isotópicamente o el aumento en biomasa indica resistencia. Estos métodos no se limitan a tipos específicos de resistencia, y por lo tanto no solo indican resistencia a las beta-lactamasas. Estos dos documentos de solicitud son por lo tanto para ser incluidos aquí a modo de referencia. También contienen introducciones al problema de las resistencias en general y de la determinación espectrométrica de masas de resistencias en particular, y se explica la importancia de unas determinaciones de resistencia rápidas.

Se ha encontrado hasta ahora que cada uno de los métodos de estos dos documentos de solicitud producen resultados óptimos para diferentes especies microbianas y diferentes antibióticos; como es muy a menudo el caso, no hay disponible aquí (aún) ningún método aplicable universalmente tampoco. Hay por lo tanto una necesidad definida de métodos adicionales para determinar resistencias.

### Objetivo de la invención

El objetivo de la invención es proporcionar un método espectrométrico de masas con el que la resistencia de los microbios a uno o más antibióticos pueda determinarse con certeza, a bajo coste y, lo más importante, rápidamente. La determinación de la resistencia para patógenos de crecimiento rápido, y por tanto especialmente peligrosos, debe llevar menos que una hora, si fuera posible.

### Breve descripción de la invención

La invención proporciona un método para la determinación espectrométrica de masas de resistencias microbianas a un antibiótico, por el que los microbios se cultivan en un medio de cultivo que contiene una concentración específica del antibiótico. El método se caracteriza por el hecho de que implica una determinación espectrométrica de masas de si al menos un componente nutriente del medio de cultivo disminuye durante el cultivo o aparece y aumenta una nueva variante modificada químicamente de un componente nutriente. Una disminución en un componente nutriente o un aumento en una variante modificada químicamente de un componente nutriente indican resistencia al antibiótico a esta concentración particular. Las variantes modificadas químicamente pueden producirse por metilación, acilación, acetilación, oxidación o reacciones similares, pero particularmente por la descomposición de un componente nutriente. La aparición de una nueva sustancia y su aumento es habitualmente más fácil de medir que la disminución en un componente nutriente ya presente.

Los componentes nutrientes preferidos son péptidos, cuya disminución o modificación química se determina. En particular, se usan péptidos que tienen un núcleo de D-aminoácidos, midiéndose por espectrometría de masas la formación y aumento en péptidos que comprenden solo este núcleo. También es posible usar péptidos que consisten en aminoácidos marcados isotópicamente, donde la formación de péptidos marcados isotópicamente de longitud acortada en el medio de cultivo se mide por espectrometría de masas. La disminución en un componente nutriente, o el aumento en una variante modificada químicamente, puede determinarse con la ayuda de una sustancia de referencia añadida en una cantidad medida. La medida de una variante modificada químicamente a menudo no requiere una sustancia de referencia, sin embargo, o puede hacerse en comparación con el componente nutriente no modificado. Pueden añadirse una o más sustancias de referencia en cantidades medidas después de que finalice el cultivo. Las sustancias de referencia son preferiblemente péptidos constituidos por D-aminoácidos.

En una realización, los microbios sufren un precultivo en un primer medio de cultivo que contiene antibióticos, antes de que los microbios precultivados sean cultivados adicionalmente en un segundo medio de cultivo. La descomposición de un componente nutriente o el aumento en una variante modificada químicamente de un componente nutriente del segundo medio de cultivo se mide entonces por espectrometría de masas.

En una realización adicional, los microbios sufren un precultivo con el antibiótico antes de que se añada un componente nutriente adicional. La descomposición de este componente nutriente, o el aumento en una variante modificada químicamente de este componente nutriente, se mide por espectrometría de masas. El componente nutriente adicional es preferiblemente un péptido, cuya adición es seguida inmediatamente por la adición de inhibidores para peptidasas secretadas al medio de cultivo.

Los microbios bajo análisis pueden ser divididos, cultivándose las porciones simultáneamente en un primer medio de cultivo sin antibióticos y en un segundo medio de cultivo que contiene un antibiótico. Es preferible que los microbios bajo análisis se cultiven en varios medios de cultivo con el antibiótico a diferentes concentraciones, a fin de determinar la fuerza de la resistencia. Los microbios también pueden ser divididos en un número más alto de porciones, que se cultivan simultáneamente después en un número correspondiente de medios de cultivo, uno sin ningún antibiótico, los otros con diferentes tipos de antibiótico a diferentes concentraciones en cada caso.

La invención proporciona por tanto métodos que, en contraste con los dos documentos de solicitud referenciados anteriormente, no se basan en el método de Govorun; el objetivo de la invención es más bien determinar la disminución en componentes nutrientes especiales, o el aumento en variantes modificadas químicamente de componentes nutrientes específicos, en el entorno alrededor de los microbios en presencia de antibióticos en cultivos de microbios, por ejemplo por descomposición enzimática, y determinar así el metabolismo de los microbios supervivientes por espectrometría de masas. Por lo tanto no son los microbios los que sufren un análisis espectrométrico de masas, sino

los componentes de los medios de cultivo. Los componentes nutrientes especiales y los productos de modificación que se observan por espectrometría de masas se llaman “indicadores” aquí. Son indicadores para el metabolismo intacto o alterado de los microbios en el cultivo cuando están presentes antibióticos.

5 Los microbios absorben los componentes nutrientes de su entorno, en parte para producir energía, en parte para sintetizar sustancias que se usan para la estructura interna de los microbios. Las proteínas, las grasas y especialmente los carbohidratos sirven como componentes nutrientes para los microbios. Las moléculas más pequeñas pueden ser absorbidas directamente a través de la pared celular con la ayuda de diversos mecanismos; están disponibles métodos más complicados para moléculas más grandes, que incluyen digestión externa por enzimas secretadas. Cuando el metabolismo está intacto, los componentes nutrientes también pueden ser modificados por oxidación, acilación, metilación o acetilación.

10 Siempre y cuando los microbios tengan aún un metabolismo intacto en el medio de cultivo en presencia de antibióticos, al menos algunos componentes nutrientes en un cultivo disminuirán o aparecerán en una forma modificada; pueden observarse así por espectroscopía de masas componentes nutrientes elegidos adecuadamente en medios de cultivo constituidos apropiadamente, como indicadores de un metabolismo microbiano normal o anormal. Cuando los antibióticos han causado que la función metabólica, y por tanto las funciones vitales, cese, la disminución en, o modificación de, los indicadores se detiene esencialmente, al menos si las enzimas secretadas antes no continúan actuando como catalizador. Pueden tomarse medidas contra las enzimas secretadas antes. Si los indicadores no continúan disminuyendo entonces en presencia de un antibiótico, y si las formas modificadas ya no aumentan, esto indica que los microbios son susceptibles a este antibiótico. La invención se basa en la medida espectrométrica de masas de la disminución en estos indicadores o la aparición de formas modificadas de los indicadores en el medio de cultivo.

20 Un indicador debe ionizarse bien, ser reconocible claramente en los espectros de masas, ser absorbido preferiblemente por los microbios como nutriente, y no estar presente en una cantidad demasiado grande, para que su disminución pueda ser seguida cuantitativamente. También debe ser posible detectar las formas modificadas químicamente de los indicadores fácilmente. La absorción o modificación de los indicadores no debe ser limitada por un nutriente sobrante que sea más fácil de absorber. Si se usa un péptido como indicador, por ejemplo, el medio de cultivo no debe contener componentes aminoácidos que sean más fáciles de absorber.

25 La detectabilidad del indicador puede ser potenciada por un marcado isotópico, especialmente si se usa un espectrómetro de masas con la posibilidad de análisis de iones fragmento. Si se usa un indicador marcado isotópicamente, también puede observarse particularmente bien por espectrometría de masas una escisión exoenzimática del indicador. También es posible sintetizar indicadores que proporcionen productos de degradación predeterminados que no puedan descomponerse adicionalmente y sirvan como indicadores especiales en el espectro de masas.

30 A fin de cuantificar la disminución en los indicadores, se añaden sustancias de referencia adecuadas en cantidades precisas. Pueden usarse como sustancias de referencia sustancias que de por sí no pueden ser descompuestas o absorbidas por los microbios. Por ejemplo, pueden usarse como sustancias de referencia péptidos que sean similares a los indicadores, pero más largos o más cortos que los indicadores en un aminoácido, y que consistan solo en D-aminoácidos en lugar de los L-aminoácidos naturales. Esto significa que no pueden ser atacados por las peptidasas naturales. Las sustancias de referencia también pueden añadirse preferiblemente solo después de que ha finalizado el cultivo, a fin de evitar cualquier digestión. Las sustancias de referencia pueden marcarse con isótopos. Una disminución en los indicadores en comparación con las sustancias de referencia en la escala esperada, o la aparición de variantes modificadas químicamente de los indicadores, muestra que los microbios bajo análisis son resistentes a los antibióticos a la concentración usada; los microbios susceptibles no exhiben disminución en los indicadores cuando la concentración del antibiótico está por encima de la concentración inhibitoria mínima (MIC).

35 Los componentes nutrientes óptimos para el uso como indicadores dependen de la especie de microbio, pero habitualmente la especie se conoce, dado que la determinación de la resistencia es precedida generalmente de una identificación de la especie de microbio.

40 También pueden usarse como métodos de ionización la desorción láser asistida por matriz (MALDI) y métodos relacionados, y también ionización por electropulverización (ESI), u otros tipos de ionización. Para MALDI, los componentes de los medios de cultivo se secan, junto con sustancias matriz, en un soporte de muestras adecuado durante la preparación. Con ESI, los medios de cultivo se pulverizan en estado líquido. Pueden usarse todos los espectrómetros de masas que estén equipados con fuentes de iones para estos tipos de ionización.

45 Para estimar al menos de manera aproximada la fuerza de la resistencia, pueden usarse cultivos con un antibiótico añadido a diversas concentraciones. Para ensayar la resistencia a varios antibióticos, es posible preparar simultáneamente varios cultivos con varios antibióticos, también con mezclas de varios antibióticos, y donde sea necesario, incluso con diferentes concentraciones de los antibióticos en cada caso.

También pueden proporcionarse medios de cultivos ya preparados para el uso con indicadores adecuados y diferentes antibióticos, y disoluciones con sustratos de referencia. En el caso de soportes de muestras disponibles en el mercado

con sitios de muestra para ionización MALDI, que tengan capas finas preparadas previamente de la sustancia matriz, estas capas finas pueden contener ya sustancias de referencia en cantidades medidas.

### Breve descripción de la figura

5 La Figura 1 muestra un ejemplo de un diagrama de flujo para un método para identificar un microbio y determinar su resistencia a (aquí) dos antibióticos AB1 y AB2 según esta invención.

### Realizaciones del ejemplo preferido

10 Como ya se ha mencionado anteriormente, la invención proporciona métodos que no se basan en el método de Govorun, a diferencia de los dos últimos documentos de solicitud referenciados anteriormente. El objetivo de la invención es más bien determinar la disminución en componentes nutrientes especiales, o la aparición de, y aumento en, variantes modificadas químicamente (por ejemplo por reacciones enzimáticas) de componentes nutrientes especiales, llamados "indicadores" aquí, en el cultivo de microbios, cuando están presentes antibióticos. Esto permite determinar el metabolismo de los microbios supervivientes por espectrometría de masas. Por tanto no son los microbios o sus componentes los que se introducen en el análisis espectrométrico de masas, sino preferiblemente solo componentes del medio de cultivo, por ejemplo después de que los microbios se han sedimentado en el líquido mediante gravitación o después de que se han retirado por centrifugación o filtración.

15 Los microbios pueden absorber los componentes nutrientes de sus alrededores de diferentes maneras. Los componentes nutrientes sirven en parte para producir energía, y en parte para construir la estructura interna de los microbios mediante la síntesis de sustancias. Las proteínas, grasas y carbohidratos pueden servir como componentes nutrientes de los microbios. La absorción de los componentes nutrientes sigue diferentes rutas, a veces muy complejas, que incluyen la modificación química o la escisión enzimática de los componentes nutrientes, a menudo fuera de la célula microbiana.

20 Las paredes celulares de arqueas, levaduras, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tienen una estructura muy diferente, pero habitualmente tienen una estructura de pared dura-elástica (para las bacterias, esta estructura comprende peptidoglicanos, una red relativamente porosa de polisacáridos y tetrapéptidos). Además, tienen membranas, tanto fuera como dentro, con proteínas incrustadas (por ejemplo porinas), que sirven a muchos fines, principalmente el transporte de moléculas a través de la pared celular, especialmente las membranas celulares. Las paredes celulares de los microbios son permeables naturalmente solo a gases y moléculas neutras muy pequeñas que miden hasta unos cientos de daltons. Para los iones y la mayoría de las sustancias biológicamente activas, son una barrera infranqueable a menos que se proporcione asistencia. Todos los procesos vitales y funciones celulares específicas son, sin embargo, dependientes de que la célula participe en un intercambio selectivo de sustancias o partículas con su entorno. Por lo tanto, existen mecanismos extremadamente selectivos que permiten a las moléculas pasar a través de la pared celular, p.ej., canales o los llamados portadores.

25 Para los microorganismos eucarióticos, la endocitosis es un proceso de transporte especial, para desde moléculas grandes hasta partículas más pequeñas. Endocitosis es el término usado para un proceso de invaginación de la pared celular, por el que una célula individual o un compartimento envuelve una gota de líquido, con ciertas sustancias disueltas en el mismo: desde macromoléculas o partículas de nutrientes más grandes hasta otras células más pequeñas. Al final del proceso de invaginación, un llamado endosoma es pellizcado o empujado hacia el interior de la célula y es ahora parte del sistema de la endomembrana. La célula incorpora así una porción del medio circundante a su interior. También es importante la endocitosis mediada por receptores (o controlada por receptores), por la que receptores especiales en la superficie de la célula son responsables de identificar la partícula a ser incorporada. La endocitosis es lo opuesto a la exocitosis, por la que sustancias tales como metabolitos que ya no se requieren son liberadas al exterior. La endocitosis y la exocitosis están normalmente en equilibrio, por lo menos para mantener el área de la pared celular igual en términos de tamaño.

30 Con las bacterias en particular, pero también con las levaduras, las moléculas más grandes también pueden ser descompuestas externamente por enzimas excretadas ("exoenzimas") o modificadas por oxidación, acilación, acetilación o metilación para permitir que sean transportadas a través de la pared celular. Las moléculas que se crean a partir de estas modificaciones también son adecuadas como indicadores de un metabolismo intacto o alterado.

35 Independientemente de con qué exactitud son absorbidos los nutrientes, la absorción de los nutrientes reduce la concentración de algunos componentes nutrientes en el medio nutriente de un cultivo si los microbios son viables en el medio de cultivo y tienen un metabolismo intacto; estos componentes nutrientes pueden ser observados por espectrometría de masas como indicadores de que los microbios tienen un metabolismo normal o anormal. Si la disminución está basada en una modificación química (por ejemplo enzimática), entonces los productos de la descomposición o modificación también aparecen y pueden observarse por espectrometría de masas. Cuando los antibióticos causan que las funciones metabólicas, y por tanto las funciones vitales, cesen, el transporte de los indicadores a las células microbianas se detiene. La degradación de los indicadores y la formación de productos de descomposición también se detiene, a menos que estos procesos sean continuados catalíticamente por enzimas que han sido secretadas antes. Por tanto, si los componentes nutrientes no disminuyen adicionalmente después de un intervalo corto en presencia de un antibiótico, o si los productos de descomposición y modificación ya no aumentan,

esto indica que los microbios son susceptibles a este antibiótico. La invención se basa en la medida espectrométrica de masas de la disminución en, o modificación de, estos indicadores en el medio nutriente.

Como ya se ha indicado, la resistencia también puede determinarse observando por espectrometría de masas la escisión enzimática del indicador, porque se producen entonces productos de descomposición que no estaban presentes previamente en el medio de cultivo. Si el indicador está marcado isotópicamente, entonces pueden encontrarse fragmentos marcados isotópicamente del indicador. En particular, el indicador puede tener una estructura especial que entrega un producto de descomposición identificable fácilmente. Por ejemplo, un péptido que sirve como indicador puede tener una estructura por la que la parte central tiene un núcleo de alrededor de seis a diez D-aminoácidos, continuada al menos en un extremo por varios L-aminoácidos. Dado que las proteasas secretadas pueden degradar solo L-aminoácidos, el núcleo que contiene los D-aminoácidos permanece sin digerir. Este péptido del núcleo aparece entonces (aumentando con el tiempo) como una sustancia nueva, no detectada previamente en el espectro de masas. Pueden servir como indicadores muchos péptidos diferentes, que tienen todos el mismo núcleo de D-aminoácidos, proporcionando en sus extremos los diversos L-aminoácidos requeridos por los microbios. El núcleo de D-aminoácidos puede ser detectado entonces por espectrometría de masas, y medido su aumento. No es importante aquí si los péptidos se descomponen fuera de la célula, o si la descomposición tiene lugar dentro de la célula microbiana y el producto de descomposición indigerible es excretado de nuevo.

El cultivo de bacterias para los métodos según esta invención se emprende mejor en medios nutrientes totalmente sintéticos, que tienen espectros de masas muy limpios sin mucho ruido químico de fondo. Los medios nutrientes sintéticos contienen habitualmente alrededor de diez gramos de glucosa en un litro de agua como fuente de energía y material de partida para las síntesis. En principio, las bacterias pueden sintetizar por sí mismas las proteínas y péptidos endógenos a partir de la digestión de glucosa; para este fin tienen que añadirse alrededor de 0,5 g de  $K_2HPO_4$  como fuente de potasio y fosfato, alrededor de 1 g de  $NH_4Cl$  como fuente de nitrógeno para aminoácidos, 0,2 g de  $MgSO_4$  como fuente de azufre y magnesio para las enzimas, y varios elementos traza. Este proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía, sin embargo; los microbios lo evitan si ya están presentes en el medio nutriente aminoácidos, péptidos o proteínas digeribles, u otros nutrientes digeribles. Si, por ejemplo, solo están presentes unos pocos péptidos, pero por lo demás ningún aminoácido individual, entonces los péptidos pueden servir como indicadores. Los péptidos que comprenden alrededor de ocho a doce aminoácidos son particularmente favorables; esto corresponde a una masa de alrededor de 1.000 a 1.400 daltons. Por ejemplo, pueden servir como indicadores dos péptidos, cada uno con diez aminoácidos, seleccionándose los péptidos de tal manera que contengan todos los 20 aminoácidos. O pueden usarse tres o más péptidos que cubran todos los aminoácidos en una relación que predomine en los microbios. Uno de los péptidos puede servir como indicador, pero también es posible usar varios péptidos simultáneamente como indicadores, dado que pueden detectarse simultáneamente todos en el espectro de masas del medio de cultivo.

Para una sensibilidad espectrométrica alta, también es posible usar fosfolípidos, aunque estos no contienen ningún aminoácido. También es posible añadir péptidos que estén derivatizados de tal manera que puedan ionizarse particularmente bien y tengan por tanto un nivel alto de sensibilidad para la identificación espectrométrica de masas.

Además, muchas bacterias requieren una mezcla vitamínica de biotina (vitamina H; masa  $m = 244$  Da), ácido nicotínico (vitamina B7;  $m = 123$  Da), tiamina (vitamina B1;  $m = 335$  Da), ácido para-aminobenzoico ( $m = 137$  Da), ácido pantoténico (vitamina B5;  $m = 219$  Da), piridoxamina (vitamina B6;  $m = 168$  Da) y cianocobalamina (vitamina B12;  $m = 1.355$  Da). Estas vitaminas también pueden usarse como indicadores.

Los mejores componentes nutrientes posibles para usarse como indicadores pueden depender de la especie de microbio, pero habitualmente la especie se conoce, dado que la determinación de la resistencia es precedida generalmente de una identificación de la especie de microbio.

Los compuestos añadidos como indicadores deben estar presentes en concentración baja para que su disminución sea detectable fácilmente incluso con cantidades pequeñas de microbios, que producen solo un resultado pequeño. Por la misma razón, los microbios, que están presentes generalmente como colonias en agar debido a que se cultivan en esta forma para la identificación, se añaden a un volumen tan pequeño como sea posible de un medio de cultivo líquido, que equivale a solo unos microlitros. Estos volúmenes, sin embargo, deben medirse con exactitud para la adición de las sustancias de referencia. También es posible recoger varias colonias de la misma especie de microbio y añadirlas al volumen de cultivo.

A fin de cuantificar la disminución en los indicadores, se añaden sustancias de referencia adecuadas en cantidades medidas con precisión. Pueden usarse como sustancias de referencia sustancias que en sí mismas no pueden ser descompuestas o absorbidas por los microbios, por ejemplo debido a grupos protectores. Son particularmente adecuados péptidos que consisten solo en D-aminoácidos. Dado que es casi imposible impedir que los microbios absorban estas sustancias a pesar de su indigeribilidad, es ventajoso añadir las sustancias de referencia solo después de que el cultivo ha terminado, a fin de evitar cualquier disminución en la concentración de estas sustancias de referencia en el medio de cultivo. Una disminución en los indicadores o un aumento en los productos de degradación en la escala esperada, medido con respecto a las sustancias de referencia, indica que los microbios analizados son resistentes al antibiótico a la concentración usada; los microbios susceptibles no exhiben disminución en los indicadores si la concentración del antibiótico está por encima de la concentración inhibitoria mínima (MIC). Como se

indica en el diagrama de flujo de la Figura 1, es conveniente aquí preparar también un cultivo sin ningún antibiótico a fin de medir la disminución o cambio natural en los indicadores causado por los microbios, para fines comparativos.

5 Ya se ha hecho mención del hecho de que hay un periodo de transición. Las bacterias en un medio que contiene un antibiótico no detienen inmediatamente todo el metabolismo, aunque la concentración del antibiótico esté muy por encima de la concentración inhibitoria mínima. Habitualmente tienen que absorber primero el antibiótico o dejarlo que haga efecto de otras maneras. A fin de evitar la degradación o modificación de los indicadores en esta fase, puede llevarse a cabo un precultivo con el antibiótico y añadirse el indicador sólo después. La duración más favorable para este precultivo debe determinarse experimentalmente.

10 También es posible, sin embargo, que, dependiendo de la composición del medio nutriente, ya se hayan excretado proteasas en este precultivo y descompongan catalíticamente ahora el indicador después de que se haya añadido, dando así la impresión de un metabolismo intacto (al menos temporalmente). En este caso es útil enjuagar los microbios con antibióticos después del precultivo y ponerlos en un medio de cultivo fresco con indicador y antibiótico. El enjuague puede tener lugar de la manera conocida por centrifugación o filtración cuidadosa.

15 También es posible añadir un inhibidor para las proteasas secretadas después del precultivo a fin de hacerlas inefectivas. La cantidad de inhibidor debe medirse de tal manera que no detenga también las proteasas que continúan siendo secretadas por los microbios vivos. También es posible neutralizar posteriormente cualquier exceso de inhibidor por medio de una sustancia que a su vez inhibe al inhibidor.

20 Tanto los indicadores como las sustancias de referencia deben ser fáciles de ionizar y proporcionar picos reconocibles fácilmente en los espectros de masas. Ya se ha indicado que los fosfolípidos tienen una sensibilidad espectrométrica de masas particularmente buena. También es posible cubrir un intervalo de concentraciones más grande por medio de las sustancias de referencia. Por ejemplo, pueden usarse tres sustancias de referencia en relaciones de 100:10:1 o 25:5:1. Esto puede ser ventajoso particularmente para medidas de los productos de descomposición, cuya concentración aumenta de cero hacia arriba.

25 Pueden usarse como método de ionización todos los métodos que ionizan moléculas orgánicas más grandes, especialmente desorción láser asistida por matriz (MALDI) y métodos relacionados, así como ionización por electropulverización (ESI). Para MALDI, se seca un pequeño volumen de los medios de cultivo, junto con sustancias matriz, en un soporte de muestras adecuado durante la preparación. Para ESI, los medios de cultivo se pulverizan en estado líquido, por ejemplo por el llamado nano-ESI desde la punta de un pequeño capilar. Pueden usarse todos los espectrómetros de masas que estén equipados con fuentes de iones para estos tipos de ionización.

30 Hay fases intermedias entre la resistencia total de los microbios y la susceptibilidad total; el crecimiento es alterado pero no inhibido completamente. Para estimar la fuerza de la resistencia de los microbios, pueden medirse las concentraciones inhibitorias reales de los antibióticos. Los valores MIC de los antibióticos (concentraciones inhibitorias mínimas para microbios totalmente susceptibles después de muchas horas de exposición) se conocen en gran medida; pero las concentraciones inhibitorias reales pueden desviarse de esto, porque no es posible esperar que la acción del antibiótico alcance el equilibrio, lo que lleva horas; además, los valores MIC aumentan con la fuerza de la resistencia. Para medir las concentraciones inhibitorias reales, pueden usarse cultivos con un antibiótico añadido a diversas concentraciones, que pueden corresponder a la concentración 1xMIC, 10xMIC y 100xMIC de los valores MIC conocidos, por ejemplo. La experiencia muestra que, con el método descrito, la inhibición del crecimiento de los microbios a una concentración de 1xMIC solo se observa si los microbios son totalmente susceptibles. Si tienen una resistencia débil, solo son inhibidos a partir de una concentración de 10xMIC hacia arriba, mientras que en el caso de una resistencia muy fuerte, aún se ve crecimiento incluso a una concentración de 100xMIC. El efecto puede verse a partir de los valores de la disminución o cambio en los indicadores. Esto significa que para resistencias intermedias, el crecimiento es diferente para diferentes concentraciones del antibiótico.

45 Si el método se lleva a cabo sin concentraciones graduadas, se ha encontrado que es particularmente adecuada una concentración de 10xMIC.

50 Para determinar las resistencias, es ventajoso tener medios de cultivo sintéticos ya preparados con indicadores disponibles seleccionados favorablemente. Pueden haberse añadido ya diferentes tipos de antibióticos a ellos. También pueden proporcionarse disoluciones ya preparadas con sustratos de referencia. En el caso de soportes de muestras disponibles en el mercado con sitios de muestra para ionización MALDI, que llevan capas finas preparadas previamente de la sustancia matriz, las capas finas pueden contener ya cantidades medidas de sustancias de referencia. Debe aplicarse entonces una cantidad medida del medio nutriente. Las sustancias matriz en cantidades preparadas previamente, que están disponibles en el mercado en pequeñas botellas, también pueden contener ya las sustancias de referencia.

55 El método es sorprendentemente rápido. Los microbios requieren habitualmente un tiempo de demora de alrededor de 20 minutos para ajustarse al medio de cultivo, después de lo cual puede observarse una disminución significativa en los indicadores o un aumento en los productos de descomposición después de 20 minutos adicionales si los microbios son resistentes. Las infecciones peligrosas son causadas habitualmente por microbios de crecimiento rápido con un tiempo de duplicación de solo aproximadamente 20 minutos.

Para ensayar la resistencia a varios antibióticos, es posible preparar varios cultivos con varios antibióticos, donde sea necesario incluso con diferentes concentraciones de cada antibiótico. El tiempo adicional necesitado para preparar y medir las muestras de varios cultivos es casi insignificante en comparación con el tiempo de cultivo en sí.

5 Para un ensayo rápido para gérmenes multirresistentes (ejemplo: MRSA, staphylococcus aureus resistente a la meticilina), los medios pueden proporcionarse también con una mezcla de varios tipos de antibiótico. Si los microbios crecen en esta mezcla, son multirresistentes.

10 La ionización de los componentes secos del medio de cultivo por desorción láser asistida por matriz (MALDI) requiere una placa de soporte de muestras en la que ya esté preparada la sustancia matriz en una capa fina, o bien la producción de una disolución matriz. Las sustancias matriz disponibles en el mercado tienen a menudo la desventaja de que son difíciles de disolver sin ultrasonidos. Por consiguiente, hay ahora en el mercado pequeñas botellas de sustancias matriz purificadas y liofilizadas en cantidades medidas con precisión. Con estas, la sustancia matriz se disuelve inmediatamente cuando se añade el disolvente, y la disolución está lista inmediatamente para el uso en la concentración correcta. Como se define en esta invención, puede añadirse una cantidad medida cuidadosamente de al menos una sustancia de referencia a las sustancias matriz de estos productos, a fin de cuantificar la descomposición o cambio en los indicadores. En el dispositivo usado para preparar las muestras MALDI, la disolución matriz puede aplicarse a los componentes secos del medio nutriente en una cantidad medida cuidadosamente y sin que entre en contacto con ellos. Las placas de soporte de muestras con capas finas de matriz que ya se venden en el mercado como productos también pueden contener sustancias de referencia en cantidades medidas. Cada una de las capas finas se aplica a áreas pequeñas de la muestra, que están bien espaciadas y tienen cada una un diámetro de alrededor de dos milímetros.

15 Un ejemplo típico para la secuencia de un método para determinar resistencias se muestra en el diagrama de la Figura 1. El método se muestra aquí con los microbios siendo cultivados en un agar (101). Los microbios de una colonia (102) se recogen, se digieren y se procesan en una muestra MALDI (103). La adquisición de un espectro de masas (104) conduce a la identificación del microbio comparando su espectro de masas con espectros de referencia (105). En un laboratorio de rutina, solo lleva entre 10 y 30 minutos desde la recogida de una colonia hasta la identificación, dependiendo del número de muestras de microbios a ser identificadas en paralelo. Para determinar la resistencia, pueden recogerse varias colonias adicionales de los mismos microbios al mismo tiempo (106). Estas se mezclan en un medio de cultivo y se dividen para los diferentes tipos de cultivo (107). En el ejemplo mostrado en este diagrama, se preparan tres cultivos: un cultivo en un medio sin antibiótico (108), y dos cultivos con los antibióticos Ab1 (109) y Ab2 (110). En este ejemplo, los medios de cultivo ya contienen los indicadores. No es necesario decir que pueden prepararse cultivos adicionales con antibióticos adicionales y, si se va a determinar también la fuerza de la resistencia, cultivos con diferentes concentraciones de los antibióticos. Todos los cultivos ya están preparados a la temperatura óptima para que los microbios no sufran un choque y el calentamiento no cause un retraso de tiempo. La duración del cultivo depende del tiempo de demora y el tiempo de duplicación (periodo de generación) de los microbios, que se conoce a partir de la identificación de los microbios. El cultivo solo necesita durar uno a tres tiempos de duplicación. Son suficientes alrededor de 20 a 40 minutos para microbios de crecimiento rápido.

20 Después se procesan muestras de los medios de los diversos cultivos en muestras MALDI después de haberse añadido las sustancias de referencia, y se adquieren espectros de masas (111). El espectro de masas del medio (108) para los microbios que se cultivaron sin ningún antibiótico se usa para determinar la disminución normal en los indicadores o el aumento en los productos de descomposición, que depende esencialmente del número desconocido de microbios inoculados. A partir de los medios de los cultivos (109) y (110), se adquieren espectros de masas (113) después de la adición de las sustancias de referencia (111) y la preparación de las muestras MALDI (112). A partir de estos espectros de masas, se deriva la disminución o no disminución en los indicadores en relación a la disminución en el medio que no contiene antibiótico. Las disminuciones en los indicadores en los cultivos que contienen antibióticos indican resistencia.

25 Los métodos se han llevado a cabo hasta ahora con ionización MALDI. MALDI tiene la gran ventaja de que forma casi únicamente iones moleculares de carga simple. Esto significa que los espectros de masas no están sobrecargados a pesar de los 100 o 300 picos que aparecen en el intervalo de masas preferido de 500 a 2.000 daltons. Es posible usar cualquier tipo de espectrómetro de masas con fuentes de iones MALDI para esto, por ejemplo espectrómetros de masas de tiempo de vuelo, y también espectrómetros de masas de trampa de iones. Son particularmente ventajosos los espectrómetros de masas tándem, que pueden fragmentar iones seleccionados a fin de conseguir una detección inequívoca de los indicadores. El uso de indicadores marcados isotópicamente es favorable para estos espectrómetros de masas.

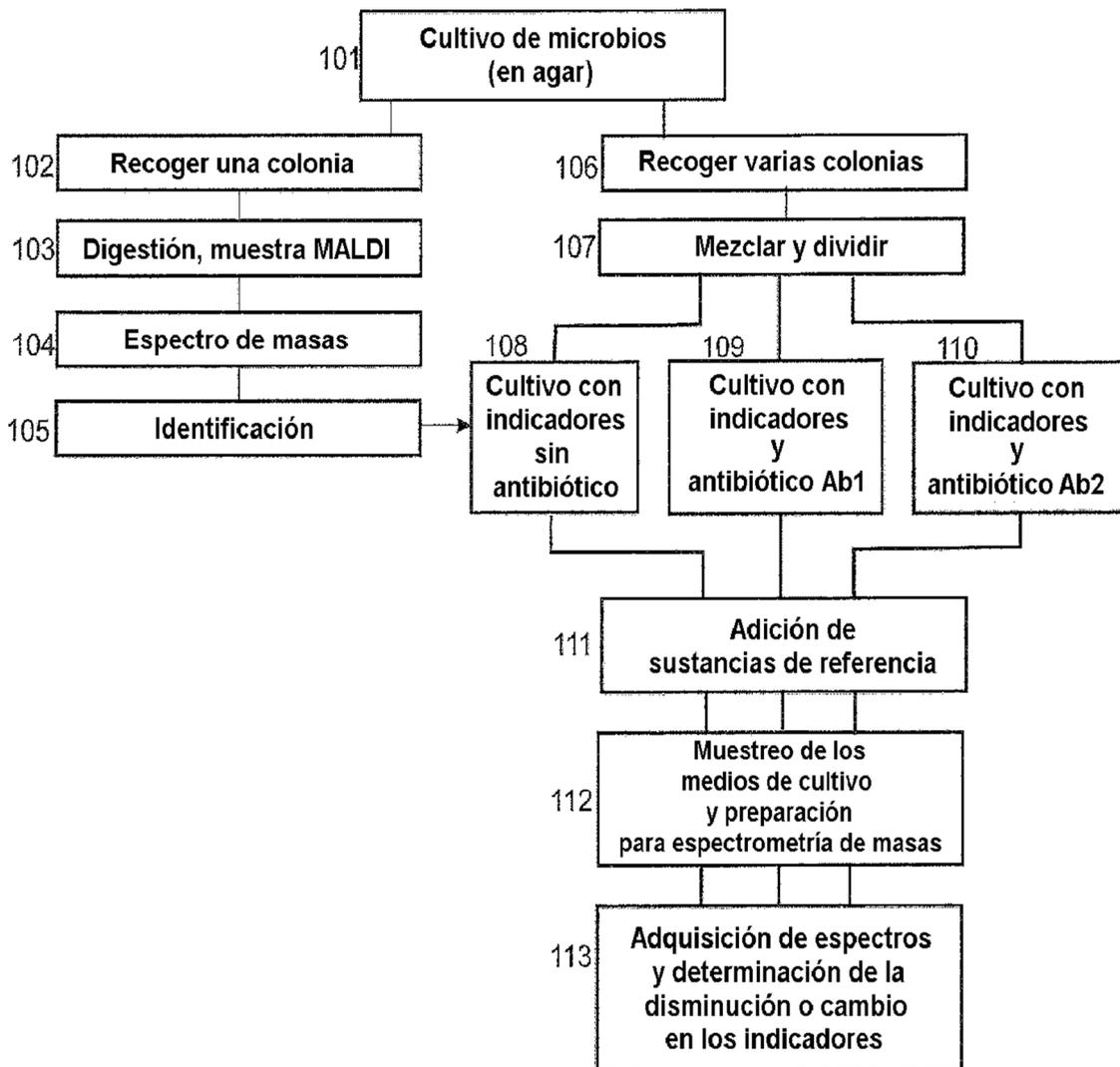
30 También es posible usar otros tipos de ionización, sin embargo. Aunque los métodos basados en pulverización tales como ESI (ionización por electropulverización) o DESI (ionización directa de superficies de muestras sólidas por ionización por electropulverización) tienen la desventaja de que forman cantidades muy grandes de iones de carga múltiple, que pueden sobrecargar los espectros de masas, pueden acoplarse fácilmente con métodos de separación tales como cromatografía líquida (HPLC) o electroforesis capilar (CE), con lo que es posible obtener de nuevo espectros de masas con una estructura más sencilla separando las sustancias.

35 Hay, sin embargo, otros métodos de ionización que producen casi únicamente iones moleculares de carga simple, por

ejemplo ionización química (CI). La ionización química puede usarse conjuntamente con métodos de pulverización neutros, pero también con ablación por láser de muestras sólidas, y conjuntamente con un OTOF-MS (espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con inyección de iones ortogonal).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la determinación espectrométrica de masas de la resistencia microbiana a un antibiótico, por el que los microbios se cultivan en un medio de cultivo sintético que contiene una concentración específica de un antibiótico, en donde se usa espectrometría de masas para determinar si al menos un componente nutriente del medio de cultivo sintético disminuye durante el cultivo o una variante modificada químicamente de un componente nutriente aumenta, por el que una disminución en un componente nutriente o un aumento en una variante modificada químicamente de un componente nutriente indica resistencia al antibiótico a la concentración dada.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en donde la disminución en un componente nutriente o el aumento en una variante modificada químicamente de un componente nutriente se determina por comparación con al menos una sustancia de referencia añadida en una cantidad medida.
3. Método según la reivindicación 2, en donde una sustancia de referencia es un péptido que está constituido por D-aminoácidos.
4. Método según la reivindicación 2 o 3, en donde la sustancia de referencia se añade en una cantidad medida después de que el cultivo ha finalizado.
- 15 5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los microbios sufren un precultivo en un primer medio de cultivo sintético que contiene un antibiótico, antes de que los microbios precultivados sean cultivados adicionalmente en un segundo medio de cultivo sintético, y la descomposición de un componente nutriente o el aumento en una variante modificada químicamente de un componente nutriente del segundo medio de cultivo sintético se mide por espectrometría de masas.
- 20 6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los microbios sufren un precultivo con el antibiótico antes de que se añada al menos un componente nutriente adicional, y la descomposición de un componente nutriente añadido o el aumento en una variante modificada químicamente de un componente nutriente añadido se mide por espectrometría de masas.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, en donde un componente nutriente añadido es un péptido, y se añaden inhibidores para peptidasas ya secretadas inmediatamente después de la adición del componente nutriente.
8. Método según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde se dividen los microbios, y las porciones se cultivan simultáneamente en un primer medio de cultivo sintético sin ningún antibiótico y en un segundo medio de cultivo sintético que contiene un antibiótico.
- 30 9. Método según la reivindicación 8, en donde los microbios se cultivan en medios de cultivo que contienen el antibiótico en varias concentraciones a fin de determinar la fuerza de la resistencia.
10. Método según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde se dividen los microbios, y las porciones se cultivan simultáneamente en varios medios de cultivo sin y con diferentes tipos de antibiótico a diferentes concentraciones.
- 35 11. Método según una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el medio de cultivo sintético contiene al menos un péptido como componente nutriente, y se determina la disminución en este péptido o el aumento en variantes modificadas químicamente de este péptido.
12. Método según la reivindicación 11, en donde se usa al menos un péptido como componente nutriente que contiene un núcleo de D-aminoácidos, y se mide por espectrometría de masas el aumento en un péptido que contiene solo este núcleo.
- 40 13. Método según la reivindicación 11, en donde se usa como componente nutriente al menos un péptido que consiste en aminoácidos marcados isotópicamente, y se mide por espectrometría de masas la formación de péptidos marcados isotópicamente de longitud acortada en el medio de cultivo sintético.
14. Método según la reivindicación 11, el medio sintético no comprende aminoácidos individuales.
15. Método según la reivindicación 11, en donde el al menos un péptido contiene todos los 20 aminoácidos.
16. Método según la reivindicación 11, en donde cada péptido comprende ocho a doce aminoácidos.
- 45 17. Método según una de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la concentración del antibiótico es diez veces la concentración inhibitoria mínima (MIC).
18. Método según una de las reivindicaciones 1 a 17, en donde se usa desorción láser asistida por matriz (MALDI) o ionización por electropulverización (ESI) como método de ionización para la medida por espectrometría de masas.



**Figura**