

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 679**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2015** **E 15382009 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 3048174**

54 Título: **Procedimiento para la determinación rápida de la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2019

73 Titular/es:

ABM TECHNOLOGIES, LLC (100.0%)
22575 State Highway 6 South
Navasota, TX 77868, US

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ GARCÍA, JOSÉ LUIS;
GOSÁLVEZ BERENGUER, JAIME;
BOU ARÉVALO, GERMÁN;
TAMAYO NOVAS, MARIA;
SANTISO BRANDARIZ, REBECA y
OTERO FARIÑA, FÁTIMA MARÍA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 710 679 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

Procedimiento para la determinación rápida de la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere, en general, al campo de la microbiología y a la industria de la asistencia sanitaria y, más en particular, se refiere a una metodología para la evaluación rápida de la susceptibilidad o de la falta de susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas.

Antecedentes

- 10 Los patógenos resistentes a múltiples antibióticos presentan un riesgo en continuo aumento para la salud, en particular en entornos clínicos. Los pacientes pueden adquirir infecciones por medios médicos invasivos, pero necesarios, tales como infecciones en las vías respiratorias durante la ventilación mecánica, en las vías urinarias o en los vasos sanguíneos, a través de catéteres o incluso a través de heridas en la piel, como las incisiones requeridas para cualquier número de procedimientos médicos. Los pacientes inmunocomprometidos y los internados en unidades de cuidados intensivos (UCI) tienen un mayor riesgo de contraer enfermedades infecciosas nosocomiales, que pueden ser resistentes a uno o más antibióticos. Por diversas razones, estas infecciones pueden estar asociadas con una alta tasa de mortalidad. Anteriormente, el Centro Europeo para el Control de Enfermedades (ECDC) reportó 25.000 muertes anuales debidas a patógenos multirresistentes.

- 15 Los tratamientos tempranos, con antibióticos bien seleccionados proporcionan la mejor defensa contra dichos patógenos multirresistentes. Dada la alta prevalencia de las resistencias, los procedimientos actuales requieren un cultivo bacteriano para la identificación del microorganismo, seguido de un antibiograma, que suele demorar de 2-3 días mientras crecen las bacterias. El paso de cultivar bacterias para construir un antibiograma solo, por lo general, demanda alrededor de un día de incubación o aproximadamente un mínimo de 18 horas.

- 20 Dado el período relativamente largo necesario para realizar un antibiograma estándar, para comenzar, los antibióticos suelen administrarse en forma empírica. Esta primera línea de defensa a menudo se basa en antibióticos que, en general, se sabe que son efectivos en función del probable patógeno involucrado. Sin embargo, tales tratamientos pueden ser ineficaces en el 20-40 % de los casos, y el hecho de tener que cambiar los antibióticos más adelante puede reducir las probabilidades de éxito. Incluso los supuestos basados en los conocimientos pueden contribuir al uso indebido o al abuso de los antibióticos, lo que se traduce en cepas bacterianas cada vez más resistentes, mientras los resultados de un antibiograma están pendientes.

- 25 El antibiograma resulta del ensayo clínico de cepas de bacterias aisladas *in vitro* para determinar la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos. Una metodología común para construir un antibiograma basado en la difusión es el método de Kirby-Bauer (Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method*. Am J Clin Pathol 1966;45:493-496). En el método semicuantitativo de Kirby-Bauer, varios discos que contienen diferentes antibióticos se colocan en diferentes zonas de un cultivo de bacterias ricas en nutrientes. Debido a que el antibiótico se difunde hacia el agar, alejándose del disco, el diámetro que rodea al disco en el que no crecen las bacterias sugiere la concentración inhibitoria mínima (CIM) de ese antibiótico a la cepa cultivada de las bacterias.

Santoso y colaboradores, BMC 2011, 11: 191 describen un procedimiento *in situ* rápido, para la determinación de la susceptibilidad bacteriana o la resistencia a los antibióticos que inhiben la biosíntesis de peptidoglucanos.

- 30 Un método cuantitativo puede basarse en la dilución en una serie de caldos o soluciones de agar que tienen concentraciones progresivamente menores del antibiótico en cuestión. La concentración más baja de todas de antibiótico, en la que las bacterias no pueden crecer proporciona la concentración inhibitoria mínima de ese antibiótico para la cepa de bacterias probada. Este método cuantitativo se puede emplear de forma rutinaria en los hospitales, por lo general, utilizando paneles comerciales de antibióticos y sistemas semiautomáticos de incubación y *software* para la interpretación de datos, como el MicroScan WalkAway™ (Siemens), Phoenix™ (Becton Dickinson) o Vitek™ 2 (bioMérieux). Con tales sistemas automatizados dependientes del crecimiento, los resultados de susceptibilidad o resistencia a los antimicrobianos de un microorganismo específico se pueden obtener en alrededor de 6-9 horas.

- 35 Cada uno de los métodos de difusión y dilución se basa en el principio de inhibir la proliferación bacteriana en un medio rico en nutrientes y esto requiere tiempo suficiente para muchos ciclos reproductivos de las bacterias. En tal sentido, ambas metodologías pueden requerir un mínimo de entre 18 horas y 24 horas. Se puede entender que las pruebas convencionales, como los antibiogramas, no resuelven los problemas descritos con anterioridad.

- 40 Además, se han intentado una serie de enfoques experimentales, con el objetivo de lograr determinaciones más rápidas de susceptibilidad y resistencia. Sin embargo, esos enfoques experimentales no suplantaron al antibiograma convencional que consume mucho tiempo. Por consiguiente, todavía existe la necesidad de realizar pruebas de

susceptibilidad capaces de determinar rápidamente un tratamiento con antibióticos que permita la administración rápida y eficaz de tratamientos efectivos con antibióticos y reducir el uso indebido o el abuso de los antibióticos.

Compendio de la invención

5 Una realización de la invención se refiere a un método para evaluar rápidamente la susceptibilidad de las cepas bacterianas a un antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas. El método incluye el paso de incubar una primera porción de la cepa de las bacterias que experimentan un crecimiento exponencial, con un antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas y a las bacterias que se incuban con el antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas, un agente seleccionado para inducir una respuesta bacteriana que depende de la síntesis de las proteínas o recibe la influencia de esta. Una segunda porción de la cepa de bacterias que experimentan un crecimiento exponencial también se incuban con el agente seleccionado para inducir una respuesta bacteriana que depende de la síntesis de las proteínas o recibe la influencia de esta. Luego, la respuesta bacteriana en la primera porción y la segunda porción de la cepa de bacterias se evalúa, y la cepa de bacterias se clasifica como susceptible o no susceptible al antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, en función de la evaluación de la primera y segunda porciones de la cepa de las bacterias.

15 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-F representan imágenes de nucleoides de *Escherichia coli* obtenidas con un ensayo de Micromax en el ejemplo 1.

Las figuras 2A-F representan imágenes de nucleoides de *Escherichia coli* obtenidas con un ensayo Micromax en el ejemplo 2.

20 Las figuras 3A-F representan imágenes de nucleoides de *Staphylococcus aureus* obtenidas con un ensayo de Micromax en el ejemplo 3.

Las figuras 4A-F representan imágenes de nucleoides de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas con un ensayo de Micromax en el ejemplo 5.

25 Las figuras 5A-F representan imágenes de nucleoides de *Enterococcus faecalis* obtenidas con una variante del ensayo Micromax en el ejemplo 6.

Las figuras 6A-F representan imágenes de nucleoides de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos con una variante del ensayo Micromax en el ejemplo 7.

Descripción detallada de la invención

30 Las realizaciones de la presente invención permiten la determinación rápida de la susceptibilidad bacteriana o de la resistencia a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas. Como ejemplo no limitativo, se describen varios antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas en Lambert T. *Antibiotics that affect the ribosome*. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2012 31: 57-64. Dichos antibióticos pueden probarse rápidamente de acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento. Estos antibióticos afectan la pared celular bacteriana al interactuar con los ribosomas, los orgánulos en los que se sintetizan las proteínas. Los ribosomas bacterianos son complejos de ribonucleoproteínas ensamblados en dos grandes subunidades, 30S y 50S.

40 Los ejemplos de familias de antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas incluyen oxazolinonas, que evitan la formación del complejo de iniciación. Las oxazolinonas parecen unirse al dominio 23S ARNr V de la subunidad ribosomal 50S y ocupan el sitio Aminoacilo (A) de la subunidad ribosomal 50S, lo que induce un cambio conformacional que impide que el ARNt ingrese al sitio y obliga al ARNt a separarse del ribosoma. Las oxazolinonas que pueden analizarse de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención incluyen: eperezolid, linezolid, posizolid, radezolid, ranbezolid, sutezolid, tedizolid, y otros.

45 Los antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas adicionales incluyen tetraciclinas y gliciliclinas (tigeciclina), que se unen a la subunidad ribosomal 30S, evitando la entrada de los ARN de transferencia (t) de aminoacilo al sitio Aminoacilo (A) del ribosoma que está bloqueado por el antibiótico. Una lista no exhaustiva de tetraciclinas que pueden analizarse de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención incluye: doxiciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, lemeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, penimepiciclina, rolitetraciclina y otras.

50 Otra familia más de antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas incluye aminoglucósidos, tales como: tobramicina, estreptomina, dihidroestreptomina, gentamicina, kanamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina, dibekacina, neomicina, framisetina, paromomicina, ribstamicina, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicin, astromicina, higromicina B y otros. Los aminoglucósidos que afectan el inicio, la elongación y la terminación de la síntesis de las proteínas aumentan la tasa de error con la terminación prematura de la cadena de peptidilo y también afectan la translocación ribosomal. Se unen a la subunidad 30S, específicamente al ARN ribosomal (r) 16S y al sitio A de decodificación de la 2-desoxistreptamina (2-DOS) 4,6-sustituida.

Otras familias más de antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas incluyen macrólidos, lincosamidas, fenicoles (cloranfenicol), estreptograminas y pleuromutilinas y quinupristina/dalfopristina que bloquean el paso de transferencia de peptidilo de la elongación del péptido en la subunidad 50S. Se unen al componente 23S ARNr del ribosoma 50S cerca del centro peptidil-transferasa (es decir, el dominio V del 23S ARNr), bloqueando la elongación de la cadena peptídica que causa una terminación prematura y conduce a una disociación prematura del peptidil-ARNt del ribosoma. Las pleuromutilinas se unen al centro de la peptidil-transferasa, así como a los fenicoles. Estos últimos se unen específicamente a los nucleótidos dentro del bucle central del dominio V del 23S ARNr. Las proteínas ribosómicas L16 y el sitio (P) del peptidilo también participan en la unión. Las ortosomicinas también inhiben la traducción al unirse a la subunidad ribosomal 50S. Los macrólidos que pueden probarse de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención incluyen: azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, fluritromicina, josamicina, midecamicina, miocamicina, oleandomicina, rokitamicina, roxitromicina, espiramicina, troleandomicina, tilosina, cetólidos, telitromicina, cetricina, solitromicina y otros. Las lincosamidas que pueden analizarse de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención incluyen: clindamicina, lincomicina, pirlimicina y otras. Las estreptograminas que pueden probarse de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención incluyen: pristinamicina, quinupristina/dalfopristina, virginamicina y otras. Las pleuromutilinas que pueden analizarse de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención incluyen: retapamulina, tiamulina, valnemulina y otras. La familia de antibióticos de anfenicoles que incluye cloranfenicol, azidamfenicol, tiamfenicol, florfenicol y otros también puede probarse con ciertas realizaciones de la presente invención.

Además, el ácido fusídico prohíbe la síntesis de las proteínas al evitar la rotación del factor de alargamiento G (EF-G) en el ribosoma.

La retapamulina y la mupirocina también pueden inhibir la síntesis de las proteínas, pero se desconoce su mecanismo preciso.

Los antibióticos adicionales que inhiben la síntesis de las proteínas previstos para uso con ciertas realizaciones descritas en el presente documento incluyen aquellos antibióticos que inhiben la deformilasa peptídica.

Las bacterias resistentes a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas se manifiestan mediante una serie de mecanismos, Lambert T. *Antibiotics that affect the ribosome*. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2012 31: 57-64.

Un mecanismo por el cual las bacterias pueden exhibir una resistencia a la síntesis de las proteínas que inhiben las bacterias consiste en la inactivación enzimática. Las enzimas de desintoxicación, codificadas principalmente por genes de plásmidos o transposones, pueden metabolizar antibióticos tales como aminoglucósidos, eritromicina, lincosamidas, cloranfenicol y estreptograminas, limitando así su eficacia antibacteriana.

Otro mecanismo bacteriano que muestra una resistencia a las bacterias inhibidoras de la síntesis de las proteínas es la alteración de la diana. Las mutaciones pueden afectar los ARNr (por ejemplo, 16S ARNr o 23S ARNr) o las proteínas ribosómicas (por ejemplo, S12 a la estreptomina, L4 y L22 a macrólidos) involucradas en la unión de antibióticos. Además, las metiltransferasas también pueden afectar a las dianas. Por ejemplo, el 23S ARNr puede ser metilado en adenina 2058 por enzimas Erm, constitutivas o inducibles, lo que lleva a la resistencia a los macrólidos. En su mayoría están transportados por elementos móviles, lo que representa un riesgo potencial de difusión. La monometilación da como resultado un bajo nivel de resistencia a la eritromicina, mientras que la dimetilación confiere una alta resistencia.

Adicionalmente, las proteínas de protección ribosómica, homólogas a los factores de elongación, confieren resistencia a las tetraciclinas, que previenen posiblemente la actividad antibacteriana inhibidora de la síntesis de las proteínas.

Aún otro mecanismo por el cual las bacterias pueden resistir a los antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas es por deficiencias en la captación. Los sistemas de flujo impenetrables o dependientes de la energía reducen la concentración intracelular del antibiótico y pueden producir una resistencia moderada a los aminoglucósidos, y específicamente a las tetraciclinas en bacterias gram negativas.

Ciertas realizaciones descritas en el presente documento proporcionan un medio para determinar rápidamente si las bacterias son susceptibles o no susceptibles en relación con los antibióticos que se están probando. Debe entenderse que el término "susceptible" corresponde a la definición del CLSI [*Clinical and Laboratory Standards Institute*, Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio] por ejemplo, un microorganismo susceptible muestra un nivel de actividad antimicrobiana asociado con una alta probabilidad de éxito terapéutico. Como se usa en el presente documento, el término "no susceptible" se refiere a aquellos microorganismos que no están determinados como susceptibles. En la práctica, esta definición abarca las indicaciones del CLSI de microorganismos tanto resistentes como intermedios.

Mientras que algunos métodos previos de detección rápida de la susceptibilidad se basan en el crecimiento rápido del tamaño celular individual de pequeñas cantidades de bacterias, ciertos antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas pueden prevenir este crecimiento, lo que puede presentar un falso positivo para bacterias resistentes en ciertas condiciones.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se induce una respuesta bacteriana que depende de la síntesis de las proteínas o recibe la influencia de esta. La resistencia bacteriana a los antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas puede evaluarse a través de la capacidad de los antibióticos para suprimir la respuesta bacteriana. Para los fines de esta descripción, debe entenderse que una "respuesta bacteriana" es un cambio químico, biológico, genético o físico en las bacterias a nivel del ADN, al nivel de componente celular o al nivel celular. En algunas realizaciones, la respuesta bacteriana es directa o indirectamente discernible, tal como mediante el uso de ensayos, dispositivos microfluidos o mediante otros protocolos de medición y/o prueba conocidos por los expertos en la técnica.

Los ejemplos de respuestas bacterianas a nivel del ADN incluyen el daño del ADN y la fragmentación del ADN. En particular, el daño o la fragmentación del ADN que depende al menos parcialmente de la síntesis de las proteínas puede indicar la efectividad de los antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas. Como ejemplos no limitativos, esta fragmentación del ADN, que depende al menos parcialmente de la síntesis de las proteínas, puede inducirse en algunas bacterias mediante la exposición a las quinolonas (por ejemplo, norfloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina y otras). Dado que todas las quinolonas producen una respuesta similar en bacterias gram negativas, a saber, la fragmentación del ADN, se espera que las quinolonas funcionen bien como un agente para inducir una respuesta bacteriana. Si bien este es el caso de al menos la mayoría de las bacterias gram negativas, la resistencia a las quinolonas es posible, y en tales cepas no se puede hacer una determinación de susceptibilidad con respecto al antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas. Se puede inducir una respuesta bacteriana en forma de fragmentación del ADN con mitomicina C. La mitomicina C presenta un agente robusto para inducir la respuesta bacteriana, porque en la actualidad, no parece haber ninguna resistencia bacteriana natural a la mitomicina C. La mitomicina C parece producir las respuestas dependientes de la síntesis de las proteínas en al menos *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* y se espera que produzcan una respuesta bacteriana en la mayoría de las bacterias gram negativas.

En otras realizaciones, la fragmentación de ADN que depende de la síntesis de las proteínas puede producirse indirectamente, tal como por la lisostafina que digiere parcialmente las paredes celulares bacterianas después de una exposición corta, que causa la liberación de cantidades significativas de desoxirribonucleasa (DNasa). La DNasa es una enzima que, cuando se libera desde la pared celular bacteriana da como resultado la fragmentación del ADN de una manera que depende de la síntesis de las proteínas. Como otro ejemplo, la fragmentación del ADN se puede inducir incubando bacterias con tensioactivos y/o enzimas que afectan las paredes celulares de las bacterias de una manera que depende de la síntesis de las proteínas y que promueve la autólisis. La autólisis en ciertas bacterias puede ser inducida por la incubación con bilis, desoxicolato, Triton X-100, así como con la enzima lisozima digestora de peptidoglucanos y los inhibidores de antibióticos de la síntesis de peptidoglucanos.

En ciertas realizaciones adicionales, la respuesta bacteriana del daño en el ADN puede ser inducida por agentes alquilantes. Una lista no exhaustiva de agentes alquilantes puede incluir: mostazas nitrogenadas, tales como ciclofosfamida, mecloretamida, uramustina, melfalán, clorambucilo, ifosfamida, bendamustina; diepoxibutano; carzinofilina/azinomicina B; sandramicina, luzopeptinas e isocrisohermidina; biselezin, dímeros de pirrolbenzodiazepina; análogos dinucleares de cis-DDP; psoralenos; ciclofosfamida, alcaloides de pirrolizida y otros. Quizás puedan emplearse incluso agentes "del tipo alquilantes", como los platinos, o análogos del platino, para inducir una respuesta bacteriana. Los agentes de tipo alquilante pueden incluir cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxalipatina, satraplatino o tetranitrato de triplatino.

Los ejemplos de respuestas bacterianas a nivel del componente celular pueden incluir daño de la pared celular, que puede ser causado por agentes que inhiben la síntesis de peptidoglucanos o incluso causan la digestión de peptidoglucanos. La familia de antibióticos beta-lactámicos se puede emplear para inducir un daño en la pared celular, de una manera dependiente de la síntesis de las proteínas. Como ejemplos no limitantes, los betalactámicos contemplados para su posible uso incluyen penicilinas (penems), cefalosporinas (cefemas), carbapenems. Las betalactamas han demostrado ser efectivas para inducir la respuesta bacteriana en varias especies bacterianas, siendo las cepas de bacterias gram negativas las más probadas. Sin embargo, las betalactamas solo pueden ser efectivas como agentes para inducir una respuesta bacteriana en cepas de bacterias que no son resistentes a las betalactamas.

Las familias adicionales de antibióticos para inducir esta respuesta bacteriana pueden incluir cicloserina, fosfomicina, bacitracina y glucopéptidos. La lisis de la pared celular o la digestión con peptidoglucano se pueden inducir con lisozima. Debido a que la mayoría de las bacterias tienen peptidoglucano, se espera que la lisozima proporcione un agente útil para inducir una respuesta bacteriana en bacterias gram negativas y gram positivas.

Los ejemplos de respuestas bacterianas a nivel celular incluyen cambios en el aspecto celular, tales como el tamaño de la célula o el agrandamiento celular. En particular, diversos antibióticos y agentes tóxicos o dañinos para el ADN pueden inducir el agrandamiento celular de una manera que depende de la síntesis de las proteínas o recibe la influencia de esta.

Se puede apreciar que las respuestas bacterianas pueden ocurrir en múltiples niveles en simultáneo, secuencialmente o en intervalos superpuestos. Además, ciertos agentes descritos pueden ser capaces de inducir respuestas bacterianas en múltiples niveles. En los ejemplos que siguen, la respuesta bacteriana se puede describir

en términos de la respuesta bacteriana que se controla mediante ensayos u otros medios. En algunos casos, la concentración del agente empleado puede afectar el tipo de respuesta bacteriana que se induce.

En todas las realizaciones, se induce una respuesta bacteriana en las bacterias, tal como en una cepa de bacterias o en una muestra de bacterias. Como ejemplo no limitativo, se puede generar una muestra de bacterias en un entorno clínico, mediante métodos de cultivo conocidos para aislar e identificar bacterias. El agente que induce esta respuesta bacteriana puede inducirse en dos porciones separadas de las bacterias, tales como una primera porción y una segunda porción. Las porciones pueden estar separadas espacialmente; como ser, dentro de la misma placa de Petri u otro recipiente de incubación, o pueden estar separadas físicamente, como en placas de Petri o recipientes de incubación separados. Independientemente de la manera en que se separen la primera porción y la segunda porción, puede apreciarse que la designación de una “primera” y una “segunda” porciones puede considerarse arbitraria con respecto a la ubicación o la separación, excepto en la medida en que las porciones estén lo suficientemente separadas para la incubación en condiciones diferentes. Además, la designación de una “primera” y una “segunda” porciones puede ser arbitraria con respecto a la cronología de cualquier incubación. La primera y la segunda porciones se pueden incubar con sus respectivos tratamientos simultáneamente, uno tras otro, o de manera escalonada. Como un ejemplo no limitativo, el inicio de múltiples tratamientos puede ser escalonado, de modo que se logre que esos tratamientos se completen al mismo tiempo o casi al mismo tiempo.

En todas las realizaciones, ambas porciones se someten a un agente que induce una respuesta bacteriana que depende de la síntesis de las proteínas o que recibe la influencia de la síntesis de las proteínas. Una de las porciones, la primera o la segunda, se preincuba con el antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas y la otra no. En todas las realizaciones, una de las porciones de la cepa bacteriana se expone al antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas antes de la incubación con el agente para inducir una respuesta bacteriana. En algunas realizaciones, el antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas se introduce en dosis que se reconocen como valores críticos de susceptibilidad y/o resistencia. Por ejemplo, organizaciones internacionales como el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) establecen la concentración de valor crítico de la susceptibilidad o resistencia para cada antibiótico y microorganismo. La susceptibilidad de una bacteria a un antibiótico puede entenderse en algunos casos con referencia a una concentración inhibitoria mínima (CIM), es decir, la dosis más baja del antibiótico que inhibe significativamente el crecimiento de las células bacterianas.

En algunas realizaciones, se aplica un tratamiento adicional a una porción de la cepa bacteriana, que puede estar separada de la primera y la segunda porciones. Esta porción puede considerarse arbitrariamente como una tercera porción y puede incubarse con la proteína inhibidora de la síntesis de las proteínas, pero sin inducir la respuesta bacteriana. En algunos casos, este tratamiento adicional puede servir como control, para la comparación con los tratamientos de la primera y la segunda porciones. Este control permite determinar si el propio antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas induce cambios celulares que dificulten la determinación de la respuesta bacteriana.

En otra realización, se puede aplicar un tratamiento adicional a otra porción de la cepa bacteriana, que puede estar separada espacial y/o físicamente de las otras porciones. Esta porción puede permanecer libre del agente que induce la respuesta bacteriana y libre del antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas y puede servir como control. Esta parte puede considerarse arbitrariamente como una cuarta porción, que puede emplearse junto con la primera y la segunda porciones o junto con la primera, segunda y tercera porciones. Como un ejemplo, la cuarta porción puede servir como un control que aporte información de referencia con respecto a la fragmentación del ADN o quizás incluso al tamaño de la célula. La cuarta porción puede proporcionar un punto de partida para la comparación con la porción sometida solo al agente inductor de respuesta bacteriana. En caso de que no haya diferencias significativas, las bacterias pueden ser resistentes al agente seleccionado para inducir la respuesta bacteriana.

Determinación rápida de la susceptibilidad o no susceptibilidad a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas: evaluación de las respuestas a nivel del ADN.

Ejemplo 1

Como una ejemplificación de los principios descritos con anterioridad, se ensayaron dos cepas de *Escherichia coli* que crecían exponencialmente en un caldo de Mueller-Hinton (figura 1). La primera cepa de *Escherichia coli* fue una cepa TG1 susceptible tanto al aminoglucósido tobramicina (un inhibidor de la síntesis de las proteínas) como a la quinolona ciprofloxacina (un agente que induce la fragmentación del ADN mediante la captura de topoisomerasas en el ADN) (figuras 1A-C). La segunda cepa fue un aislado clínico, resistente a la tobramicina y susceptible a la ciprofloxacina (figuras 1D-F). Se aplicaron cuatro tratamientos a cada cepa para distinguir rápidamente la cepa susceptible y resistente a la tobramicina.

Una porción de ambas cepas bacterianas se incubó con tobramicina, a razón de 4 µg/ml durante 40 minutos (figuras 1A y D), una dosis indicada por el CLSI como el valor crítico de la susceptibilidad a la tobramicina en el antibiograma estándar basado en microdilución. Otra porción de ambas cepas se incubó con ciprofloxacina, a razón de 1 µg/ml durante 30 minutos (figuras 1B y E). Otra porción más de ambas cepas se incubó con tobramicina a razón de 4 µg/ml durante 10 minutos, seguido de ciprofloxacina a razón de 1 µg/ml durante 30 minutos, sin eliminar la tobramicina (figura 1C, F). Una porción final se dejó sin antibiótico.

Después de cada incubación, las células se procesaron utilizando la variante de la tecnología Micromax, para visualizar los nucleoides, es decir, el ADN cromosómico bacteriano, en todas las células de la población. Las células de cada cultivo se sumergieron en un microgel de agarosa, en un portaobjetos y se incubaron con una solución de lisado específica para eliminar la pared celular de todas las células y liberar en el microgel los nucleoides contenidos dentro de las bacterias. Estos se secaron, se tiñeron con un fluorocromo de alta sensibilidad para el ADN, como SYBR Gold y se visualizan bajo microscopía de fluorescencia. La figura 1 ilustra imágenes representativas capturadas en cada una de las condiciones que se describen a continuación.

Como puede verse en las figuras 1A y D, las células incubadas con tobramicina, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, no produjeron ninguna modificación de los nucleoides. Estos resultados fueron similares en cuanto al aspecto a los de los cultivos sin antibióticos en cepas tanto susceptibles como resistentes a la tobramicina.

Las células incubadas con ciprofloxacina sola demostraron nucleoides con muy ADN fragmentado, como se esperaba, ya que ambas cepas son susceptibles a la quinolona, como se ve en las figuras 1B y E.

Las células incubadas con tobramicina seguidas de ciprofloxacina demostraron nucleoides con un nivel reducido de fragmentación de ADN en la cepa susceptible a la tobramicina, la figura 1C. En la cepa resistente de las bacterias, el ADN se fragmentó ampliamente, de manera similar a los provenientes del cultivo incubado solo con ciprofloxacina, en la cepa resistente a la tobramicina, la figura 1F.

Las figuras 1A-F ilustran que una preincubación con tobramicina reduce significativamente el nivel de fragmentación del ADN causado por la ciprofloxacina en la cepa que es susceptible a la tobramicina, figura 1C, mientras que este efecto decreciente no es evidente en la cepa resistente a la tobramicina. Al igual que en la figura 1E, se observa una gran cantidad de fragmentación de ADN en la figura 1F.

La metodología descrita con anterioridad se empleó para determinar rápidamente la susceptibilidad de 12 cepas de *E. coli* a la tobramicina. Una porción de cada cepa bacteriana se incubó con tobramicina a la dosis del valor crítico de la susceptibilidad, 4 µg/ml, durante 40 minutos. Una porción de cada cepa se incubó con ciprofloxacina a razón de 1 µg/ml durante 30 minutos. Otra porción más de cada cepa se incubó con tobramicina a razón de 4 µg/ml durante 10 minutos, seguido de ciprofloxacina, a razón de 1 µg/ml durante 30 minutos, sin eliminar la tobramicina. Una porción final de cada cepa se dejó sin antibiótico. Las cepas de *E. coli* se identificaron como susceptibles o no según los niveles de fragmentación del ADN en la porción de cada cepa incubada con ciprofloxacina y en la porción incubada con tobramicina y ciprofloxacina.

Al comparar las cepas analizadas para determinar la cantidad de fragmentación del ADN, esta metodología identificó nueve de las doce cepas como susceptibles a la tobramicina y tres de las doce cepas como no susceptibles. Se realizó un antibiograma estándar obtenido por microdilución en las mismas cepas, y una comparación entre los resultados señaló a las mismas nueve cepas como susceptibles, y las mismas tres cepas que fueron no susceptibles (resistentes), según el criterio MIC-CLSI (valor crítico de la susceptibilidad ≤ 4 µg/ml) fueron identificadas exitosamente por la prueba rápida.

Puede entenderse que la fragmentación de ADN por la ciprofloxacina depende, al menos en parte, de la síntesis de las proteínas. Si la síntesis de las proteínas se inhibe con éxito mediante la tobramicina (es decir, en la cepa susceptible a la tobramicina), la fragmentación del ADN por la ciprofloxacina disminuye. Si la síntesis de las proteínas no se inhibe con éxito mediante la tobramicina (es decir, en la cepa resistente (no susceptible) a la tobramicina), la fragmentación del ADN por ciprofloxacina permanece masiva, sin cambios. Esta distinción proporciona un medio para determinar cepas susceptibles y no susceptibles. Es importante destacar que esta distinción puede discriminarse rápidamente en un ensayo.

Los principios ejemplificados en el ejemplo 1 se confirmaron con el aminoglucósido amikacina. En pocas palabras, una cepa susceptible y resistente del *E. coli* se expuso a condiciones similares a las descritas en el ejemplo 1, excepto que se utilizó amikacina como el antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas. Específicamente, cada cepa fue sometida a cuatro tratamientos. Una porción no recibió antibióticos, y otra porción recibió solo una quinolona, como ciprofloxacina o norfloxacina para inducir la fragmentación del ADN. Otra porción más recibió un antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas, el aminoglucósido amikacina, seguido por quinolona. Otra porción recibió solo amikacina. Una porción final no recibió ningún antibiótico. La susceptibilidad del *E. coli* a la amikacina se determinó con éxito a través de la metodología descrita con anterioridad.

Los principios ejemplificados en el ejemplo 1 se confirmaron adicionalmente con el aminoglucósido gentamicina. En resumen, la prueba rápida se realizó en 15 cepas aisladas de *E. coli*, de acuerdo con la metodología descrita con anterioridad, excepto que se utilizó gentamicina como el antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas. La fragmentación del ADN suprimida se utilizó para caracterizar la susceptibilidad bacteriana, y esas caracterizaciones se verificaron con el antibiograma estándar para la gentamicina por microdilución. Los resultados se correlacionaron perfectamente, y las 10 cepas susceptibles y las 5 cepas resistentes (no susceptibles) a la gentamicina se identificaron sin ambigüedad con la prueba rápida. Por otra parte, se obtuvieron resultados similares con el cloranfenicol como inhibidor de la síntesis de las proteínas y la quinolona ciprofloxacina.

Ejemplo 2

Se ha descubierto que el daño al ADN o la fragmentación del ADN inducidos por la mitomicina C depende parcialmente de la síntesis de las proteínas. La mitomicina C es un agente alquilante que reacciona con la secuencia de nucleósidos de guanina 5'-CpG-3'. Inhibe la replicación del ADN al reaccionar covalentemente con el ADN, formando enlaces cruzados entre las cadenas complementarias de ADN. La fragmentación del ADN bacteriano puede ocurrir de manera secundaria, como consecuencia de la reparación del ADN y la activación de la respuesta SOS o durante el proceso de muerte celular. La susceptibilidad bacteriana a los antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas puede determinarse utilizando mitomicina C como un agente que induce el daño al ADN o la fragmentación del ADN.

La mitomicina C puede presentar un agente muy sólido para inducir la fragmentación del ADN o el daño del ADN en las bacterias debido a que no se esperan resistencias significativas a la mitomicina C, a diferencia de antibióticos tales como las quinolonas o los inhibidores de la síntesis de la pared celular, descritos con anterioridad. Por esta razón, la mitomicina C puede tener una aplicación más amplia a muchas especies y cepas bacterianas.

Las bacterias pueden incubarse con un antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas antes de la adición de mitomicina C. Si la cepa bacteriana es susceptible al antibiótico que afecta la síntesis de las proteínas, el nivel de fragmentación del ADN del cromosoma bacteriano por la mitomicina C se reduce, en comparación con el producido por la incubación con mitomicina C sola. Si las bacterias son resistentes al antibiótico que afecta la síntesis de las proteínas, el nivel de fragmentación del ADN cromosómico por la mitomicina C permanece prácticamente sin cambios. El antibiótico no puede actuar, por lo que la síntesis de las proteínas es efectiva, y el ADN está fragmentado por la mitomicina C como de costumbre.

Como ejemplo ilustrativo, dos cepas de *Escherichia coli* que crecen exponencialmente en un caldo de Mueller-Hinton se incubaron bajo diferentes tratamientos y luego se analizaron, como se ve en la figura 2. Las figuras 2 A-C representan una cepa TG1 susceptible al aminoglucósido tobramicina, un inhibidor de la síntesis de las proteínas, y a la mitomicina C, un agente que induce daño en el ADN. La otra cepa ilustrada en las figuras 2 D-F fue un aislado clínico resistente a la tobramicina.

Una porción de ambas cepas bacterianas se incubó con tobramicina, a razón de 4 µg/ml durante 90 minutos (figuras 2A y D), una dosis indicada por el CLSI como el valor crítico de la susceptibilidad a la tobramicina en el antibiograma estándar basado en microdilución. Otra porción de ambas cepas se incubó con mitomicina C, a razón de 50 µg/ml durante 60 minutos (figuras 2B y E). Otra porción más de ambas cepas se incubó con tobramicina, a razón de 4 µg/ml durante 30 minutos, seguido de mitomicina C a razón de 50 µg/ml durante 60 minutos, sin eliminar la tobramicina (Fig. 2C y F). Una porción final se dejó sin antibiótico.

Después de la incubación, las células se procesaron utilizando una variante de la tecnología Micromax para visualizar los nucleoides, es decir, el ADN cromosómico bacteriano, en todas las células de la población. Las muestras celulares del cultivo se sumergen en un microgel de agarosa en un portaobjetos y se incuban con una solución de lisado específica, para eliminar la pared celular de todas las células y los nucleoides contenidos dentro de las bacterias liberan en el microgel. Estos se secan, se tiñen con un fluorocromo altamente sensible para el ADN, como el SYBR Gold, y se visualizan bajo microscopía de fluorescencia. Los nucleoides de *E. coli* obtenidos usando el ensayo de Micromax se representan en la figura 2, las figuras 2A-C corresponden a una cepa susceptible a tobramicina (TG1), y las figuras 2D-E a una cepa resistente a la tobramicina.

Como se puede ver en las figuras 2A y D, la incubación con tobramicina, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, no produce modificaciones de los nucleoides que son similares en cuanto a su aspecto a los de los cultivos sin antibióticos, tanto en cepas susceptibles como resistentes a la tobramicina.

Las figuras 2B y E, demuestran que la incubación con mitomicina C produce nucleoides con ADN fragmentado en ambas cepas, como se esperaba. El nivel de fragmentación del ADN puede ser variable en los diferentes nucleoides y en las diferentes cepas.

El ensayo representado en la figura 2C ilustra que la incubación con tobramicina seguida de mitomicina C produjo nucleoides sin fragmentación observable de ADN en la cepa susceptible a tobramicina. En contraste, la figura 2F ilustra que en las bacterias resistentes al antibiótico inhibidor de proteínas (tobramicina en este caso), el ADN permaneció fragmentado, de manera similar a los del cultivo incubado con mitomicina C solamente (figura 2E).

A partir de estos resultados, se puede entender que la fragmentación del ADN por mitomicina C depende en parte de la síntesis de las proteínas y que si la síntesis de las proteínas se inhibe con éxito mediante la tobramicina (es decir, en la cepa susceptible a la tobramicina), la fragmentación del ADN por la mitomicina C disminuye o se suprime. Por otro lado, si la síntesis de las proteínas no se inhibe con éxito con la tobramicina (es decir, en una cepa no susceptible), la fragmentación del ADN por la mitomicina C permanece prácticamente sin cambios. Las cepas susceptibles y no susceptibles se pueden discriminar rápidamente con el ensayo. Se podrían usar otros agentes que inducen daño en el ADN, en lugar de la mitomicina C. La lista es numerosa e incluye principalmente agentes alquilantes, muchos de ellos utilizados en la quimioterapia contra el cáncer.

Ejemplo 3

En un ejemplo adicional, se ha encontrado que el daño en el ADN o la fragmentación del ADN inducida por la desoxirribonucleasa (DNasa) liberada por la lisis de la pared celular del *Staphylococcus aureus* depende de la síntesis de las proteínas. El *S. aureus* es una bacteria gram positiva que sintetiza y secreta la DNasa, que se almacena en la pared celular. Cuando la pared celular es digerida parcialmente por un tratamiento corto con lisostafina, la DNasa se libera, dando como resultado la fragmentación del ADN. La fragmentación del ADN puede visualizarse utilizando el ensayo Micromax (Tamayo M, Santiso R, Gosálvez J, Bou G, Fernández MC, Fernández JL. *Cell wall active antibiotics reduce chromosomal DNA fragmentation by peptidoglycan hydrolysis in Staphylococcus aureus*. Arch Microbiol 2012; 194: 967-975). En una realización, las bacterias se incuban con un antibiótico que afecta a la síntesis de las proteínas antes de la adición de lisostafina. Si la cepa bacteriana es susceptible al antibiótico que afecta la síntesis de las proteínas, el nivel de fragmentación del ADN del cromosoma bacteriano por la DNasa se reduce o suprime, en comparación con el producido por la incubación con la lisostafina sola. La DNasa es una enzima de naturaleza proteica, que se sintetiza en los ribosomas de *S. aureus*. Posiblemente, la cantidad de DNasa sintetizada se reduce por el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, por lo que la cantidad de DNasa almacenada en la pared celular disminuye, en comparación con las células de control que no reciben tratamiento con el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas. En tal caso, la lisostafina libera una menor cantidad de DNasa, por lo que el ADN parece menos fragmentado. De lo contrario, si las bacterias no son susceptibles con respecto al antibiótico que afecta la síntesis de las proteínas, el nivel de fragmentación del ADN cromosómico por la DNasa permanece prácticamente sin cambios. El antibiótico no puede actuar, por lo que la síntesis de las proteínas es efectiva y la producción de DNasa no se modifica y los nucleoides se fragmentan como de costumbre.

En una ejemplificación de este principio, se analizaron dos cepas de *S. aureus* que crecían en agar Mueller-Hinton con 5 % de sangre de oveja. Una cepa era susceptible al macrólido azitromicina (un inhibidor de la síntesis de las proteínas) (figuras 3 A-C), y la otra cepa era un aislado clínico resistente a la azitromicina (figuras 3 D-F). El propósito era distinguir rápidamente las cepas susceptibles y no susceptibles a la azitromicina. Los cultivos se procesaron directamente a partir de placas de agar de crecimiento estándar de 18-24 horas, y no fue necesario que las células crecieran exponencialmente antes del ensayo.

Cada una de estas cepas se sometió a cuatro tratamientos. Una porción de ambas cepas se incubó con azitromicina a razón de 2 µg/ml durante 120 minutos; 2 µg/ml era el valor indicado por el CLSI como el valor crítico de la susceptibilidad a la azitromicina. Las células se lisaron para liberar los nucleoides y se generaron las imágenes de las figuras 3A y 3D. Otra porción de cada cepa se incubó con lisostafina, a razón de 10 µg/ml durante 1 minuto. Las figuras 3B y E representan los nucleoides liberados en cada cepa para este tratamiento. Otra porción más se incubó con azitromicina, a razón de 2 µg/ml durante 120 minutos, seguida de lisostafina, a razón de 10 µg/ml durante 1 minuto, sin eliminar la azitromicina. Los ensayos para estos tratamientos se pueden ver en las figuras 3C y F. Se dejó una porción final sin antibióticos.

Después de la incubación, las células se procesaron utilizando la variante de una tecnología Micromax para lisar las células con las paredes celulares afectadas. Como se indicó con anterioridad, las muestras de las células del cultivo se sumergen en un microgel de agarosa en un portaobjetos y se incuban con una solución de lisis específica para eliminar la pared celular en las células afectadas por lisosina y liberar en el microgel los nucleoides que contienen las bacterias. Estos se secan, se tiñen con un fluorocromo altamente sensible para el ADN, como SYBR Gold, y se visualizan bajo microscopía de fluorescencia.

Como puede verse en las figuras 3A y D, la incubación con azitromicina sola, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, no dio lugar a la modificación del aspecto de las bacterias. Cada cepa parece similar a las de los cultivos sin antibióticos, tanto en cepas susceptibles como resistentes a la azitromicina.

Como se puede ver en las figuras 3B y E, la incubación con lisostafina da como resultado la liberación de nucleoides con una gran cantidad de fragmentación del ADN como se esperaba, debido a la liberación de DNasa.

La incubación con azitromicina seguida de lisostafina dio lugar a nucleoides con un nivel muy reducido de fragmentación de ADN, o incluso con supresión de la fragmentación de ADN en la cepa susceptible a la azitromicina, como se ve en la figura 3C. En contraste, se observa una importante fragmentación del ADN, similar a la del cultivo incubado con lisostafina solamente (figura 3E), en la cepa resistente a la azitromicina (figura 3F).

En tal sentido, la fragmentación del ADN por la DNasa liberada en el *S. aureus* a través de la digestión de la pared celular con lisostafina se modula mediante la síntesis de las proteínas. Si la síntesis de las proteínas se inhibe con éxito mediante la azitromicina (es decir, en la cepa susceptible a la azitromicina), el nivel de DNasa almacenado en la pared celular se reduce, liberando un nivel más bajo de DNasa después de la digestión de la pared celular con lisostafina, por lo que la fragmentación del ADN disminuye. Pero si la síntesis de las proteínas no se inhibe con éxito mediante la azitromicina (es decir, en la cepa no susceptible), la fragmentación del ADN por la DNasa permanece en gran parte, sin cambios. De esta manera, las cepas susceptibles y no susceptibles se pueden discriminar rápidamente con el ensayo.

Ejemplo 4

En otro ejemplo, se ha determinado que el daño o la fragmentación del ADN inducido en la respuesta autolítica de *Streptococcus pneumoniae* depende de la síntesis de las proteínas. Cuando el *S. pneumoniae* (neumococo) gram positivo se incubaba con tensioactivos y/o enzimas que afectan a la pared celular, se activa una respuesta enzimática que da como resultado la autólisis y la fragmentación del ADN. Esta es una respuesta utilizada con anterioridad como prueba para identificar al *S. pneumoniae*. Se puede desencadenar una respuesta bacteriana mediante la incubación con detergentes como la bilis, el desoxicolato o el Triton X-100, así como la enzima lisozima que digiere el peptidoglucano y los inhibidores de los antibióticos de la síntesis del peptidoglucano, entre otros. La principal autolisina activada es la N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa (LytA) (LytA) (Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, Rönnlund D, Blom H, Widengren J, Normark S, Henriques-Normark B. *Lyt A, major autolysin of Streptococcus pneumoniae, requires access to nascent peptidoglycan*. J Biol Chem 2012, 287: 11018-11029).

Como un ejemplo no limitativo, el agente para inducir la respuesta autolítica que muestra la fragmentación del ADN puede incluir Triton X-100 al 0,05%, 2 mg/ml de lisozima, EDTA 25 mM, y puede tener un tiempo de incubación de aproximadamente 5 minutos. El EDTA se puede usar opcionalmente en combinación con los otros agentes, con el propósito de mejorar la calidad de las imágenes. En una realización, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas se proporciona antes de la adición del tratamiento con Triton-lisozima-EDTA. Si las bacterias son susceptibles al antibiótico que afecta la síntesis de las proteínas, la síntesis de las proteínas no es efectiva y la frecuencia de las células lisadas y que muestran la fragmentación del ADN se reduce poderosamente, en comparación con la producida por la incubación con Triton-lisozima-EDTA solo. Por otro lado, si las bacterias no son susceptibles con respecto al antibiótico que afecta a la síntesis de las proteínas, la proporción de células lisadas y que muestran la fragmentación del ADN cromosómico puede no modificarse o solo reducirse apenas. El antibiótico no puede actuar, por lo que la síntesis de las proteínas es efectiva, y el ADN se fragmenta después del tratamiento autolítico inducido, como de costumbre.

En una ejemplificación de este principio, se analizaron dos cepas de *S. pneumoniae* que crecían en el caldo Mueller-Hinton II complementado con cationes y 2-5 % de sangre de caballo lisada, a 37 ° C con CO₂ al 5 %. Una cepa que tenía una CMI de 0,25 µg/ml era susceptible y la otra cepa que tenía una CIM >32 µg/ml era resistente al macrólido azitromicina (inhibidor de la síntesis de las proteínas). El propósito del ensayo era distinguir rápidamente la cepa susceptible y la resistente (es decir, no susceptible) a la azitromicina.

Cada una de estas dos cepas se sometió a cuatro tratamientos. Una primera porción de ambas cepas se incubó con azitromicina, a una concentración de 0,5 µg/ml durante 60 minutos. La dosis era la indicada por el CLSI como el valor crítico de la susceptibilidad a la azitromicina en el antibiograma estándar basado en la microdilución. Otra porción de ambas cepas se incubó con Triton X-100 al 0,05%, 2 mg/ml de lisozima, EDTA 25 mM, durante 5 minutos. Otra porción más de cada cepa se incubó con azitromicina a razón de 0,5 µg/ml durante 60 minutos, seguido de Triton X-100 al 0,05%, 2 mg/ml de lisozima, EDTA 25 mM, por 5 minutos, sin eliminar la azitromicina. Una porción final de cada cepa permaneció sin ningún antibiótico.

Después de la incubación, las células se procesaron utilizando la variante de la tecnología Micromax para visualizar los nucleoides. De la misma manera indicada con anterioridad, las muestras de las células del cultivo se sumergieron en un microgel de agarosa en un portaobjetos y se incubaron con una solución de lisis específica para eliminar la pared celular de todas las células y liberar en el microgel los nucleoides contenidos dentro de las bacterias. Mientras que la incubación se desarrolla, por lo general, durante cinco minutos, en este caso dos minutos a temperatura ambiente demostraron ser suficientes. Los microgeles se secaron, se tiñeron con un fluorocromo de alta sensibilidad para ADN, como SYBR Gold y se visualizaron bajo microscopía de fluorescencia.

La incubación con azitromicina, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, no produjo una modificación de las bacterias que son similares en cuanto a su aspecto a las de los cultivos sin antibióticos, tanto en cepas susceptibles como resistentes a la azitromicina.

La incubación con Triton-lisozima-EDTA da como resultado que las células lisadas muestren nucleoides con ADN fragmentado, como se esperaba. La proporción de células con fragmentación de ADN puede ser variable en las diferentes cepas. En este caso, la respuesta bacteriana comprende 84 % y 93 % de fragmentación de ADN en la cepa susceptible y resistente, respectivamente.

La incubación con azitromicina seguida por Triton-lisozima-EDTA dio lugar a una fuerte disminución en el porcentaje de células lisadas y con ADN fragmentado en la cepa susceptible a la azitromicina. En particular, el ADN fragmentado estaba en alrededor del 40%, demostrando un 44 % menos de fragmentación que la incubación con Triton-lisozima-EDTA solo. En contraste, la proporción de células lisadas y con ADN fragmentado fue del 86 % en la cepa resistente a la azitromicina, solo un 7 % menos.

Por consiguiente, puede entenderse que la lisis y la fragmentación del ADN inducida por Triton-lisozima-EDTA dependen parcialmente de la síntesis de las proteínas. Si la síntesis de las proteínas se inhibe con éxito mediante la azitromicina (es decir, en la cepa susceptible a la azitromicina), la frecuencia de la célula lisada y que muestra la fragmentación del ADN inducida por Triton-lisozima-EDTA disminuye notablemente. Pero, si la síntesis de las

proteínas no se inhibe con éxito mediante la azitromicina (es decir, en la cepa resistente a la azitromicina), la proporción de células lisadas y con la fragmentación del ADN inducida por Triton-lisozima-EDTA permanece inalterada o muy reducida. De esta manera, las cepas susceptibles y no susceptibles se pueden discriminar rápidamente con el ensayo. Se obtuvieron respuestas similares utilizando otros inhibidores antibióticos de la síntesis de las proteínas, como el macrólido eritromicina y la tetraciclina doxiciclina.

Determinación rápida de la susceptibilidad o no susceptibilidad a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas: evaluación de las respuestas a nivel de la pared celular.

Ejemplo 5

También se ha determinado que en la respuesta de las bacterias a los inhibidores de la síntesis de peptidoglucanos, es decir, el daño de la pared celular, también influye la síntesis de las proteínas ribosómicas. La estructura de la pared celular bacteriana está compuesta por el peptidoglucano o mureína. Se trata de una cadena lineal constituida por N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM) alternados. Un tetrapéptido se une al NAM, formando un enlace interpeptídico con el tetrapéptido de la cadena más cercana, estabilizando y fortaleciendo la pared celular.

La familia principal de antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular corresponde a las β -lactamas. Estas son agentes bactericidas que interfieren con la formación del enlace interpeptídico a través de la inhibición de las proteínas de unión a penicilina (PBP, por sus siglas en inglés), serina proteasas o transpeptidasas, después de una reacción irreversible. En segundo lugar, una acumulación de precursores de peptidoglucanos desencadena hidrolasas o autolisinas de mureína, degradando el peptidoglucano y provocando la muerte celular (Kitano K, Tomasz A. *Triggering of autolytic cell wall degradation in Escherichia coli by beta-lactam antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother 1979, 16: 838-848).

En la degradación del peptidoglucano por agentes que inhiben la síntesis de peptidoglucanos influye la síntesis de las proteínas. Las bacterias se incuban primero con un antibiótico que afecta la síntesis de las proteínas, seguido de una incubación con un antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglucanos. Si las bacterias son susceptibles al antibiótico que afecta la síntesis de las proteínas, la alteración del peptidoglucano de la pared celular bacteriana se reduce, en comparación con la producida por la incubación con el antibiótico que inhibe solo la síntesis de peptidoglucanos. Sin embargo, si las bacterias no son susceptibles con respecto al antibiótico que afecta la síntesis de las proteínas, el nivel de afectación del peptidoglucano por el antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglucanos permanece prácticamente sin cambios. En este caso, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas no puede actuar, por lo que la síntesis de las proteínas es efectiva y el peptidoglucano es degradado por el antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglucanos. Puede ser evidente que este procedimiento solo puede aplicarse cuando la cepa bacteriana de interés es susceptible al antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglucanos.

Como ejemplo de este principio, la figura 4 ilustra ensayos de dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que crecen exponencialmente en un caldo de Mueller-Hinton. Ambas cepas fueron susceptibles a la β -lactama meropenem, que inhibe la síntesis de los peptidoglucanos. Una cepa fue susceptible (figuras 4A-C) y la otra resistente (figuras 4D-F) al aminoglucósido tobramicina (inhibidor de la síntesis de las proteínas).

Con el fin de distinguir rápidamente las cepas susceptibles y las resistentes (es decir, no susceptibles) a la tobramicina, cada cepa se sometió a cuatro tratamientos. Una porción de cada cepa se incubó con tobramicina, a razón de 4 $\mu\text{g/ml}$ durante 75 minutos (figuras 4A, D). La dosis utilizada, fue indicada por el CLSI como el valor crítico de la susceptibilidad a la tobramicina. Las figuras 4B y E ilustran un ensayo de otra porción de cada cepa, que se incubó con Meropenem, a razón de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ durante 60 minutos. Las figuras 4C y F, ilustran ensayos de otra porción más de ambas cepas que se incubaron con tobramicina, a razón de 4 $\mu\text{g/ml}$ durante 15 minutos, seguido de meropenem a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ durante 60 minutos, sin eliminar la tobramicina. Otra porción más de ambas cepas se mantuvo sin la adición de ninguno de los antibióticos.

Después de la incubación, las células se procesaron utilizando una variante de la tecnología Micromax para visualizar la afectación o no de la pared celular, en función de la liberación o no de los nucleoides contenidos en el interior de las bacterias. De la misma manera descrita con anterioridad, las muestras de células del cultivo se sumergen en un microgel de agarosa en un portaobjetos y se incuban con una solución de lisis específica que elimina la pared celular solo en aquellas bacterias cuyo peptidoglucano fue afectado, liberando así en el microgel los nucleoides contenidos dentro. Las bacterias cuya pared celular está intacta no se ven afectadas por la solución de la lisis y no liberan el nucleoide, por lo que permanecen con su forma estándar. Las bacterias procesadas en microgel se secan, se tiñen con un fluorocromo de alta sensibilidad para ADN como SYBR Gold y se visualizan bajo microscopía de fluorescencia.

Las figuras 4A y D ilustran que la incubación con tobramicina, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, no produce la lisis de la pared celular ni modificaciones de la forma bacteriana, que es similar en cuanto a su aspecto a la de los cultivos sin antibióticos, tanto en las cepas susceptibles como en las resistentes a la tobramicina.

Las figuras 4B y E ilustran que la incubación con meropenem resulta en la liberación de nucleoides debido a la afectación de la pared celular. Además, es evidente un fondo de fragmentos de ADN. Este resultado se observó en ambas cepas, ya que son susceptibles a meropenem.

5 La figura 4C ilustra un ensayo de la cepa susceptible incubada con tobramicina, seguida de meropenem, que dio como resultado bacterias no lisadas sin cambios. En contraste, los nucleoides se liberaron y en la figura 4F se evidenció un fondo de fragmentos de ADN, que representa un ensayo tomado del cultivo resistente en las mismas condiciones. Puede verse que la figura 4F se asemeja a las figuras 4B y E, los ensayos incubados con meropenem solamente.

10 Por consiguiente, la degradación del peptidoglucano por meropenem depende de la síntesis de las proteínas. Si la síntesis de las proteínas se inhibe con éxito por la tobramicina (es decir, en la cepa susceptible a la tobramicina), se evita la afectación del peptidoglucano por meropenem. Pero si la síntesis de las proteínas no se inhibe con éxito por la tobramicina (es decir, en la cepa resistente a la tobramicina), la afectación del peptidoglucano por meropenem permanece sin cambios. De esta manera, las cepas susceptibles y no susceptibles se pueden discriminar rápidamente con el ensayo.

15 Además, ejemplificando el concepto descrito con anterioridad, se procesaron doce cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 7 susceptibles y 5 resistentes a la tobramicina, utilizando el mismo razonamiento y procedimiento. Específicamente, una porción de cada una se incubó con tobramicina, a razón de 4 µg/ml, durante 75 min. Otra porción se incubó con Meropenem, a razón de 1 µg/ml durante 60 minutos. Otra porción más se incubó con tobramicina, a razón de 4 µg/ml durante 15 minutos, seguido de meropenem, a razón de 1 µg/ml durante 60 minutos, sin eliminar la
20 tobramicina. Una porción final quedó sin antibióticos.

En una evaluación de las cepas sometidas a ensayo, se identificaron correctamente todas las cepas susceptibles y resistentes (es decir, no susceptibles) a la tobramicina con la prueba rápida. En las cepas susceptibles, la inhibición exitosa de la síntesis de las proteínas por la tobramicina no produjo la aparición de lisis de la pared celular por meropenem cuando se usó el ensayo Micromax. De lo contrario, en las cepas resistentes a la tobramicina, la
25 síntesis de las proteínas no se inhibió por el aminoglucósido, por lo que no se suprimió la afectación de la pared celular por meropenem.

Ejemplo 6

Otra respuesta celular afectada por la síntesis de las proteínas es la lisis celular por digestión con peptidoglucanos, que se puede inducir con enzimas líticas de la pared celular, como la lisozima. Cuando una bacteria gram positiva, como el *Enterococcus*, se incuba con lisozima, cataliza la hidrólisis de los enlaces beta-1,4-glicosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglucano de la pared celular. El tratamiento posterior con una solución de lisis da como resultado que la mayoría de las células se lisen ligeramente, lo que propaga el contenido de citoplasma, incluidas las fibras del ADN interno-nucleoide. En ciertas realizaciones de la presente invención, se ha demostrado que cuando se inhibe la síntesis de las proteínas ribosómicas bacterianas, el número
35 de células lisadas por la solución de lisado de lisozima disminuye considerablemente. Sin embargo, cuando la bacteria no es susceptible a la dosis de eritromicina o cloranfenicol, el porcentaje de células lisadas prácticamente no cambia con respecto al cultivo de control solo incubado con lisozima pero sin el antibiótico.

Como ejemplo, dos cepas de *Enterococcus faecalis* que crecen exponencialmente en caldo de Mueller-Hinton se incubaron en cuatro condiciones diferentes y luego se analizaron. Una cepa fue susceptible al macrólido eritromicina (un inhibidor de la síntesis de las proteínas) (CIM: 0,125 µg/ml) y la otra fue resistente (CIM > 128 µg/ml). Cada cepa se sometió a cuatro tratamientos con el propósito de distinguir rápidamente la cepa susceptible de la cepa resistente a la eritromicina.

Una porción de cada cepa se incubó con eritromicina, a razón de 0,5 µg/ml durante 75 minutos. La dosis fue la indicada por el CLSI como el valor crítico de la susceptibilidad a la eritromicina en el antibiograma estándar basado en la microdilución. Otra porción de ambas cepas se incubó con lisozima, 1 mg/ml, por 10 minutos, a 37 °C. Otra porción más de ambas cepas se incubó con eritromicina, a razón de 0,5 µg/ml durante 75 minutos, seguido de lisozima 1 mg/ml durante los últimos 10 minutos, a 37 °C.

Después de la incubación con lisozima, las células se procesaron utilizando una variante de la tecnología Micromax, para visualizar los nucleoides, es decir, la propagación del ADN cromosómico bacteriano, en todas las células de la población. Las muestras de los cultivos se sumergieron en un microgel de agarosa, en un portaobjetos y se incubaron con una solución de lisado específica para eliminar la pared celular de todas las células y liberar en el microgel los nucleoides contenidos dentro de las bacterias. Estos se secaron, se tiñeron con un fluorocromo altamente sensible para el ADN, como SYBR Gold, y se visualizan bajo microscopía de fluorescencia.

Como puede verse mejor en la figura 5B, la cepa susceptible a la eritromicina sometida a ensayo contenía un 92,13 % de células lisadas que liberaban fibras nucleoides después de la incubación con lisozima y la solución de lisis. Como se muestra en la figura 5C, el porcentaje de células lisadas se redujo a 3,87 % en la cepa incubada con eritromicina, antes de la introducción de la lisozima. Como se ve en la figura 5E, la cepa resistente a la eritromicina probada, después de la incubación con lisozima y solución de lisis, contenía un 97,36 % de células parcialmente

lisadas con fibras de nucleóide en expansión. La incubación previa con eritromicina no modificó este porcentaje en la cepa resistente. La figura 5F representa la cepa resistente probada que tiene un 96,77 % de células lisadas. Para generalizar estos hallazgos, se ha reproducido un patrón de respuesta similar en cuatro cepas más susceptibles a la eritromicina y en trece cepas más resistentes a la eritromicina de *Enterococcus*. Esta respuesta inhibitoria no se obtuvo después de la incubación con quinolonas como la ciprofloxacina, por lo que el efecto parece ser más específico de la inhibición de la síntesis de las proteínas ribosómicas bacterianas.

Por consiguiente, la lisis celular por enzimas líticas de la pared celular, como la lisozima, aparece afectada adversamente por la inhibición de la síntesis de las proteínas en el *Enterococcus*, y posiblemente también en otras especies. Si la síntesis de las proteínas se inhibe con éxito mediante la eritromicina (es decir, en la cepa susceptible a la eritromicina), la lisis celular por lisozima y el ensayo de Micromax disminuye y la mayoría de las células aparecen con su forma estándar cercana. Pero si la síntesis de las proteínas no se inhibe con éxito por la eritromicina (es decir, en la cepa resistente a la eritromicina), la lisis celular por lisozima y el ensayo de Micromax no se suprime o está mucho menos reprimida y la mayoría de las bacterias permanecen lisadas, liberando así los nucleóides. De esta manera, las cepas susceptibles y no susceptibles se pueden discriminar rápidamente con el ensayo.

Determinación rápida de la susceptibilidad o no susceptibilidad a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas: evaluación de las respuestas a nivel morfológico.

En realizaciones adicionales, se ha encontrado que la síntesis de las proteínas afecta la modificación del aspecto celular, como la ampliación celular inducida por agentes tales como antibióticos, agentes tóxicos o dañinos para el ADN.

Ejemplo 7

Se ha demostrado previamente que las bacterias susceptibles a los antibióticos que inhiben la síntesis de las proteínas, como la β -lactama, por ejemplo, las cefalosporinas, como la ceftazidima o los carbapenems, como el meropenem, pueden inducir el agrandamiento celular en las cepas susceptibles a dosis específicas del antibiótico. Ahora se ha determinado que esta ampliación depende también de la síntesis de las proteínas, por lo que este efecto se puede suprimir en las cepas bacterianas susceptibles a un antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, mientras que el efecto permanece en las cepas no susceptibles.

Como ejemplo, se sometieron a ensayo dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que crecían exponencialmente en un caldo de Mueller-Hinton. Estas dos cepas fueron susceptibles a la β -lactama ceftazidima, que inhibe la síntesis de los peptidoglucanos. Una cepa fue susceptible y la otra, resistente al aminoglucósido tobramicina (un inhibidor de la síntesis de las proteínas). Con el fin de distinguir rápidamente la cepa susceptible de la resistente a la tobramicina, cada cepa se sometió a cuatro tratamientos.

Una porción de cada cepa se incubó con tobramicina, a razón de 4 $\mu\text{g/ml}$ (el valor crítico de susceptibilidad según el CLSI) durante 75 minutos. Un ensayo de esta porción se representa en las figuras 6A y D. Otra porción de cada cepa se incubó con ceftazidima, a razón de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 60 minutos. Un ensayo de esta porción se representa en las figuras 6B y E. Otra porción de ambas cepas se incubó con tobramicina, a razón de 4 $\mu\text{g/ml}$, durante 15 minutos, seguido de ceftazidima, a razón de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, durante 60 minutos, sin eliminar la tobramicina. Los ensayos de estas cepas se pueden ver en las figuras 6C y F, respectivamente. Una porción final de cada cepa no fue tratada con ningún antibiótico.

Después de la incubación con los antibióticos, las células se procesaron utilizando una variante de la tecnología Micromax, para visualizar la ampliación o no de las bacterias. Las muestras de cada cultivo se sumergieron en un microgel de agarosa en un portaobjetos, se secaron, se tiñeron con un fluorocromo de alta sensibilidad para el ADN, como SYBR Gold, y se visualizaron bajo microscopía de fluorescencia para visualizar la forma y el tamaño de las células.

Las figuras 6A y D, ilustran que la incubación con tobramicina, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, no afecta la forma ni el tamaño de las bacterias en las cepas susceptibles o resistentes. Ambas cepas son similares en cuanto a su aspecto a los cultivos sin antibióticos.

Las figuras 6B y E, representan ensayos de bacterias incubadas con ceftazidima que dan como resultado un aumento significativo de las células. Se observan resultados similares en ambas cepas, ya que ambas son susceptibles a la ceftazidima.

La figura 6C ilustra un ensayo de las bacterias susceptibles incubadas con tobramicina, seguida de ceftazidima, que da como resultado bacterias de tamaño similar a las incubadas con tobramicina sola (figura 6A) o bacterias no tratadas. En contraste, la figura 6F representa un ensayo de la cepa resistente, incubada en las mismas condiciones en las que las bacterias parecían agrandadas de manera similar a las del cultivo incubado con ceftazidima solamente (figura 6E).

Por consiguiente, la ampliación por la ceftazidima depende de la síntesis de las proteínas y, en tal sentido, los efectos supresores de las proteínas que inhiben la síntesis de las proteínas pueden emplearse para la determinación rápida de la susceptibilidad a los antibióticos inhibidores de la síntesis de las proteínas. Si la síntesis de las proteínas se inhibe con éxito por la tobramicina (como fue el caso en la cepa susceptible a la tobramicina), se suprime el aumento de tamaño celular por meropenem. Pero si la síntesis de las proteínas no se inhibe con éxito por la tobramicina (como lo fue en la cepa resistente a la tobramicina), el aumento de tamaño celular por meropenem no se suprime y las bacterias parecen de mayor longitud. De esta manera, las cepas susceptibles y no susceptibles se pueden discriminar rápidamente con el ensayo.

Ejemplo 8

Se ha descubierto, además, que dosis relativamente bajas de mitomicina C, un agente alquilante que induce el daño en el ADN (ver el ejemplo 3) también puede afectar el aspecto morfológico de las bacterias. En particular, las dosis reducidas de mitomicina C pueden provocar el agrandamiento bacteriano o alteraciones en el tamaño. Además, se ha descubierto que esta modificación de la forma celular depende de la síntesis de las proteínas. En tal sentido, esta modificación puede ser suprimida o reducida en las cepas susceptibles al antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas. Por el contrario, la modificación de la forma celular permanece en cepas no susceptibles.

Como ejemplo, dos cepas de *Escherichia coli* que crecen exponencialmente en un caldo de Mueller-Hinton se incubaron en cuatro condiciones diferentes y luego se analizaron. Una cepa fue susceptible y la otra, resistente al aminoglucósido tobramicina (un inhibidor de la síntesis de las proteínas). Con el fin de distinguir rápidamente las cepas susceptibles de las no susceptibles de tobramicina, cada cepa se incubó en cuatro condiciones.

Una porción de cada cepa se incubó con tobramicina, a razón de 4 µg/ml, durante 90 minutos. Como se describió con anterioridad, esta dosis está indicada por el CLSI como el valor crítico de la susceptibilidad a la tobramicina en el antibiograma estándar basado en la microdilución. Otra porción de ambas cepas se incubó en mitomicina C, a razón de 0,5 µg/ml, durante 60 minutos. Otra porción más de cada cepa se incubó con tobramicina, a razón de 4 µg/ml durante 30 minutos, seguido de mitomicina C, a razón de 0,5 µg/ml durante 60 minutos, sin eliminar la tobramicina. Una porción final de ambas cepas no se incubó con ninguno de los antibióticos.

Después de la incubación, las células se procesaron utilizando una variante de la tecnología Micromax para visualizar cualquier agrandamiento o no de las bacterias. Las muestras de las células tomadas del cultivo se sumergieron en un microgel de agarosa en un portaobjetos, se secaron, se tiñeron con un fluorocromo altamente sensible para el ADN, como el SYBR Gold, y se visualizaron bajo microscopía de fluorescencia para visualizar la forma y el tamaño de la célula. Las imágenes fueron similares a las correspondientes a la figura anterior.

Las bacterias sometidas a ensayo revelaron que la incubación con tobramicina, el antibiótico que inhibe la síntesis de las proteínas, no afecta la forma ni el tamaño de las bacterias, que es similar en cuanto a su aspecto a la de los cultivos sin antibióticos, tanto en cepas susceptibles como resistentes a la tobramicina.

La incubación con mitomicina C dio como resultado un aumento significativo de células tanto en las cepas susceptibles como en las resistentes del *E. coli*.

En la cepa susceptible de las bacterias, la incubación con tobramicina seguida de mitomicina C dio como resultado bacterias de tamaño similar a las incubadas con tobramicina sola o con bacterias no tratadas. En contraste, las bacterias resistentes incubadas con tobramicina seguida de mitomicina C parecían agrandadas, de manera similar a las del cultivo incubado con mitomicina C sola.

Por consiguiente, puede entenderse que el agrandamiento o la expansión de las células que induce la mitomicina C depende de la síntesis de las proteínas. Si la síntesis de las proteínas se inhibe con éxito mediante la tobramicina, se reduce o se suprime el agrandamiento celular inducido por la mitomicina C. Pero si la síntesis de las proteínas no se inhibe con éxito mediante la tobramicina, el agrandamiento celular por la mitomicina C no se suprime, y las bacterias parecen tener una mayor longitud. Esta distinción proporciona un medio para hacer una rápida diferenciación entre las cepas susceptibles y no susceptibles.

Como se demostró en el ejemplo 8, la evaluación de la supresión o no del aumento de tamaño celular por los inhibidores de antibióticos de la síntesis de las proteínas solo se puede realizar en cepas susceptibles al antibiótico inductor de aumento de tamaño celular. Sin embargo, la variante que incorpora mitomicina C como agente para inducir una respuesta bacteriana puede tener una aplicación más amplia en muchas especies y cepas bacterianas, porque no se esperan resistencias significativas a la mitomicina C.

Este hecho se ha ejemplificado en mayor detalle, mediante el uso de mitomicina C en la rápida detección exitosa de la susceptibilidad-resistencia a la tobramicina en el *Pseudomonas aeruginosa* y el *Klebsiella pneumoniae*, así como la susceptibilidad-resistencia a la azitromicina en el *Haemophilus influenzae*.

En un ejemplo, dos cepas de *H. influenzae* que crecían exponencialmente en un caldo de Mueller-Hinton se incubaron bajo cuatro tratamientos diferentes y luego se analizaron. Una cepa fue susceptible y la otra resistente al

macrólido azitromicina (un inhibidor de la síntesis de las proteínas). Con el fin de distinguir rápidamente la cepa susceptible de la resistente a la azitromicina, cada cepa se incubó en cuatro grupos de condiciones.

5 Una parte de cada cepa se incubó con azitromicina, a razón de 4 µg/ml, durante 150 minutos. La dosis de azitromicina correspondió a la dosis indicada por el CLSI como el valor crítico de la susceptibilidad a la azitromicina en los antibiogramas estándar basados en la microdilución. Otra porción de cada cepa se incubó con mitomicina C, a razón de 0,5 µg/ml durante 120 minutos. Otra porción más se incubó con azitromicina, a razón de 4 µg/ml durante 30 minutos, seguido de mitomicina C, a razón de 0,5 µg/ml, durante 120 minutos, sin eliminar la azitromicina. Una porción final de cada cepa no se incubó con ningún antibiótico.

10 En la incubación de la cepa susceptible con azitromicina seguida de mitomicina C, se obtuvieron bacterias de tamaño similar a las incubadas con azitromicina o al control no tratado. De lo contrario, las bacterias parecieron agrandadas de un modo semejante a las del cultivo incubado con mitomicina C solamente, en la cepa resistente a la azitromicina.

15 Se podrían usar otros agentes que induzcan daño en el ADN o toxicidad celular que resulta en una modificación de la forma de la célula, en lugar de antibióticos o mitomicina C. Una lista no exhaustiva de agentes potenciales para inducir una respuesta bacteriana a modo de modificaciones de la forma de la célula incluye a los agentes alquilantes, como los que se utilizan a menudo en la quimioterapia contra el cáncer.

Como puede entenderse fácilmente a partir de lo anterior, los conceptos básicos de la presente invención pueden realizarse de varias maneras. La invención implica numerosas y diversas realizaciones que incluyen, aunque no taxativamente, el mejor modo de la invención.

20 En tal sentido, las realizaciones o elementos particulares de la invención revelados por la descripción o mostrados en las figuras que acompañan a esta solicitud no pretenden ser limitativos, sino ejemplos de las numerosas y variadas realizaciones abarcadas en general por la invención o los equivalentes comprendidos con respecto a cualquier elemento particular del mismo. Además, la descripción específica de una única realización o elemento de la invención puede no describir explícitamente todas las realizaciones o los elementos posibles; muchas descripciones se revelan implícitamente por la descripción y las figuras.

25 El alcance de la presente invención está limitado únicamente por las reivindicaciones.

Además, a los efectos de la presente descripción y de las reivindicaciones, el término “un” o “una” de una entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, “un antibiótico” se refiere a uno o más antibióticos. En este sentido, los términos “un” o “una”, “uno o más” y “al menos uno” deben entenderse como sinónimos, según se los usa en este documento.

30 Se supone que todos los valores numéricos incluidos en este documento están modificados por expresiones tales como “aproximadamente/alrededor de”, ya sea que se indique en forma explícita o no. Para los fines de la presente invención, los intervalos pueden expresarse desde “aproximadamente” un valor particular hasta “alrededor de” otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye desde un valor particular hasta el otro valor particular. La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los valores numéricos subsumidos dentro de ese intervalo. Un intervalo numérico de uno a cinco incluye, por ejemplo, los valores numéricos 1; 1,5; 2; 2,75; 3; 3,80; 4; 5; etc. Se entenderá, además, que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final. Cuando un valor se expresa como una aproximación, utilizando el antecedente “alrededor de/aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización.

40 Asimismo, en cuanto a cada término utilizado, debe entenderse que, a menos que su uso en esta solicitud sea inconsistente con dicha interpretación, debe entenderse que las definiciones comunes del diccionario se incluyen en la descripción de cada término, tal como figura en el Random’s House Webster Unabridged Dictionary, segunda edición.

45

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar rápidamente la susceptibilidad de una muestra de bacterias a un antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas, que comprende:
 - 5 incubar una primera porción de la muestra de bacterias que experimenta un crecimiento exponencial, con un antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas;
 - agregar un agente a la primera porción de la muestra de bacterias, que se está incubando con el antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas, en donde el agente se selecciona de modo tal que induzca una respuesta bacteriana, que depende de la síntesis de las proteínas o recibe la influencia de esta;
 - 10 incubar una segunda porción de la muestra de bacterias que experimenta un crecimiento exponencial con el agente seleccionado para inducir una respuesta bacteriana que depende de la síntesis de las proteínas o recibe la influencia de esta;
 - evaluar la respuesta bacteriana en la primera porción y la segunda porción de la muestra de bacterias y
 - clasificar la muestra de bacterias como susceptible o no susceptible al antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas, sobre la base de la evaluación de la primera y la segunda porciones de la muestra de bacterias.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que la respuesta bacteriana comprende: daño al ADN, fragmentación del ADN, cambios en la pared celular, cambios en la morfología celular, una respuesta autolítica, respuestas metabólicas, respuestas bioquímicas, respuestas fisiológicas, respuestas genéticas o sus combinaciones.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la respuesta bacteriana comprende daño al ADN o fragmentación del ADN inducidos en forma directa o indirecta por el agente.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en el que el agente comprende un antibiótico o una sustancia quimioterapéutica.
5. El método según la reivindicación 4, en el que el agente comprende: un agente alquilante, una quinolona, norfloxacina, ciprofloxacina, monoflaxina, mitomicina C, un detergente, bilis, desoxicolato, Triton X-100, enzimas, lisozima, lisosina, lisostafina, mutanolisina, líticosa o sus combinaciones.
- 25 6. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la respuesta bacteriana comprende cambios en la pared celular en forma de daño de la pared celular, inducido directa o indirectamente por un agente.
7. El método según la reivindicación 6, en el que el agente comprende: beta-lactamas, meropenem, glucopéptidos, antibióticos que dañan la pared celular, agentes de digestión de la pared celular o sus combinaciones.
- 30 8. Método según la reivindicación 6, en el que los cambios en la pared celular comprenden la lisis de la pared celular o la digestión de la pared celular, inducida directa o indirectamente por el agente.
9. El método según la reivindicación 8, en el que el agente comprende: enzima lítica, lisozima, lisostafina, mutanolisina, líticosa o sus combinaciones.
- 35 10. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la respuesta bacteriana comprende cambios en la morfología celular, a modo de cambios en la longitud de las células, en el tamaño de las células o cambios en la forma de las células, inducidos directa o indirectamente por el agente.
11. El método según la reivindicación 10, en el que el agente comprende: un agente que daña al ADN, agentes tóxicos, agentes alquilantes, mitomicina C o sus combinaciones.
- 40 12. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que el paso de evaluar la respuesta bacteriana en la primera porción y la segunda porción de la muestra de bacterias comprende, además, comparar la respuesta bacteriana de la primera porción y la segunda porción de la muestra de bacterias.
13. El método según la reivindicación 12, en el que las similitudes en la primera y la segunda porciones de la muestra de bacterias son indicativas de las bacterias que no son susceptibles al antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas.
- 45 14. El método según la reivindicación 12, en el que las diferencias en la primera y la segunda porciones de la muestra de bacterias son indicativas de qué bacterias son susceptibles al antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas.
15. El método según la reivindicación 12, en el que los efectos obtenidos en la primera porción constituyen una disminución o supresión de los efectos obtenidos en la segunda porción, siendo esto indicativo de bacterias que son susceptibles al antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas.

16. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la primera porción de las bacterias que experimentan la respuesta bacteriana se incuban con una dosis que constituye valor crítico del antibiótico inhibidor de la síntesis de las proteínas.

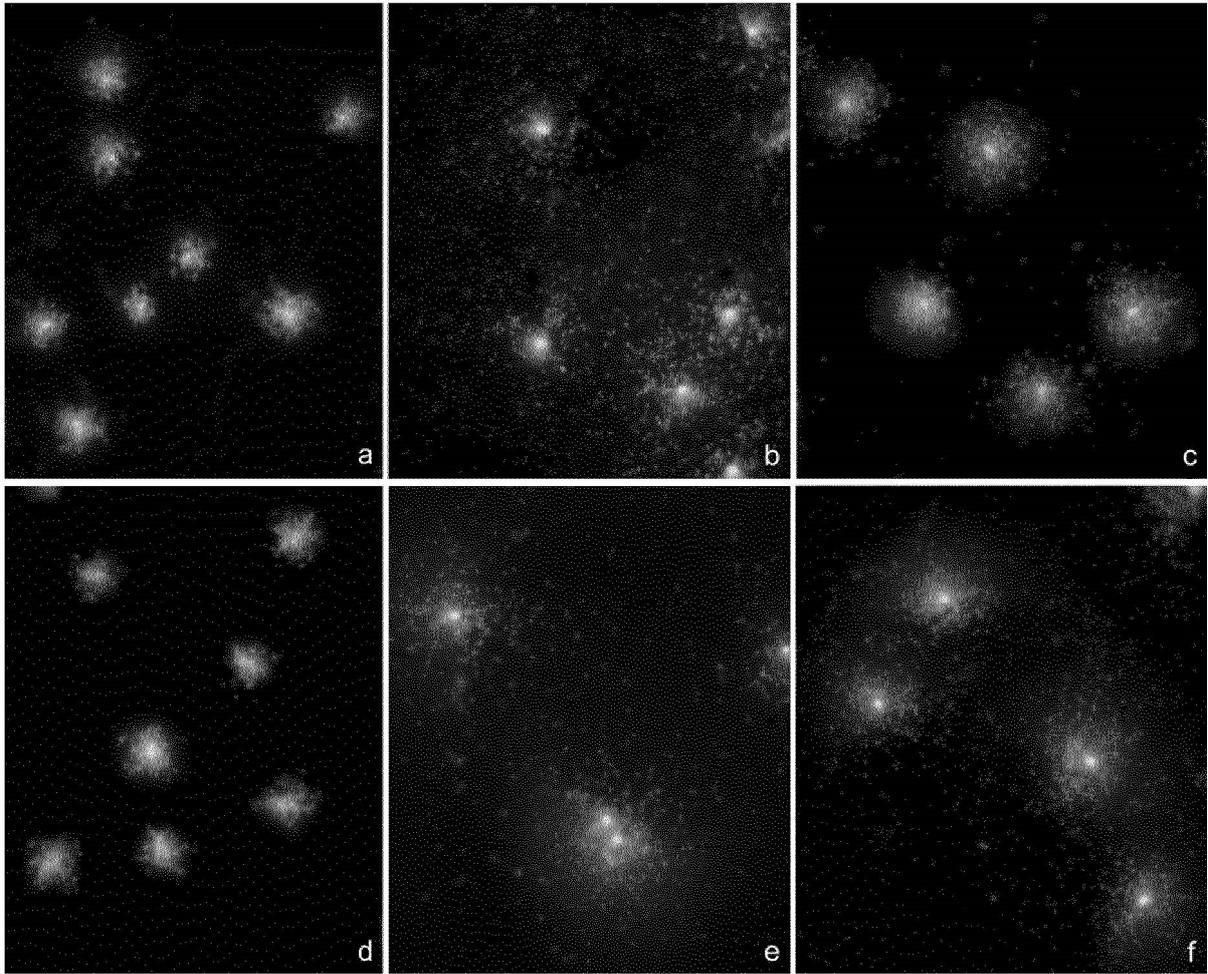


FIG. 1

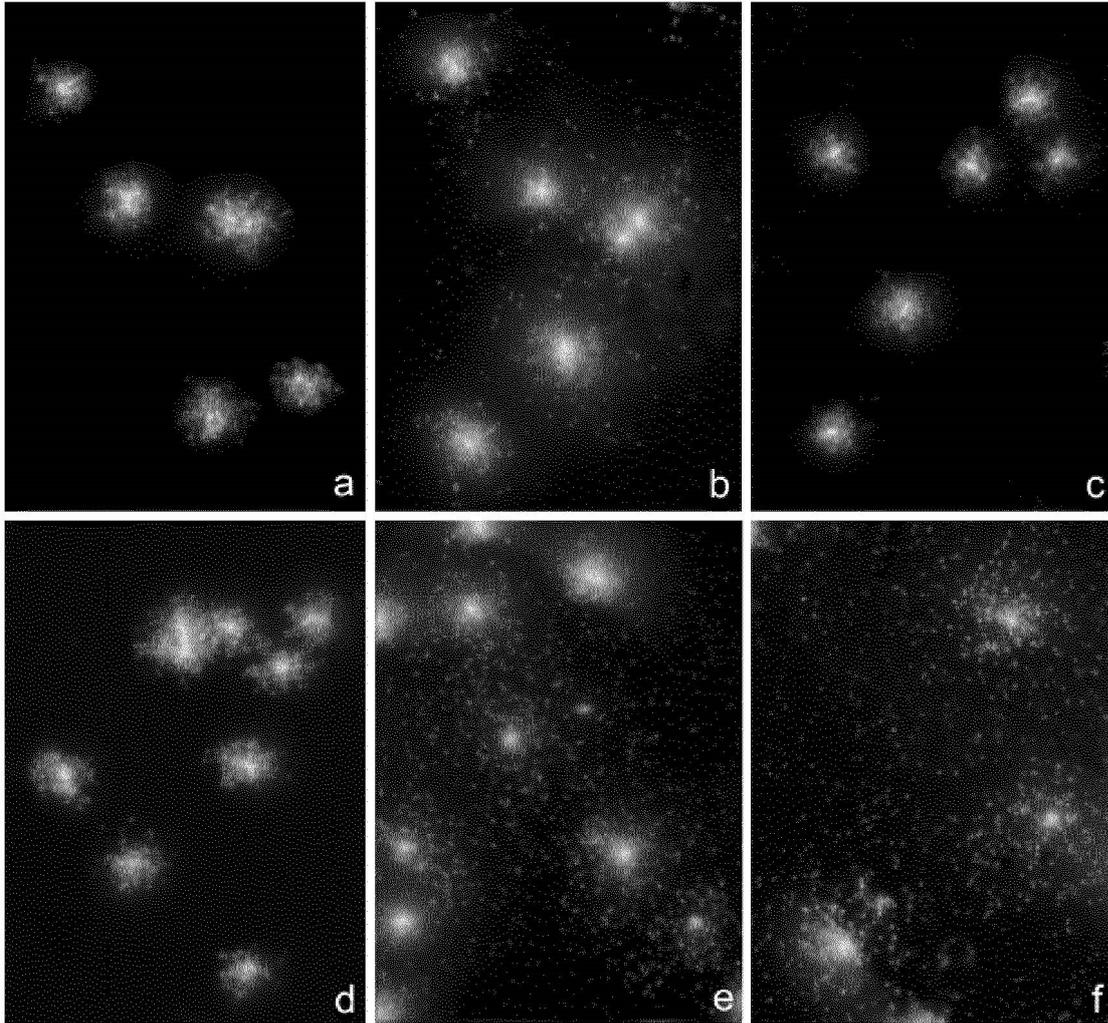


FIG. 2

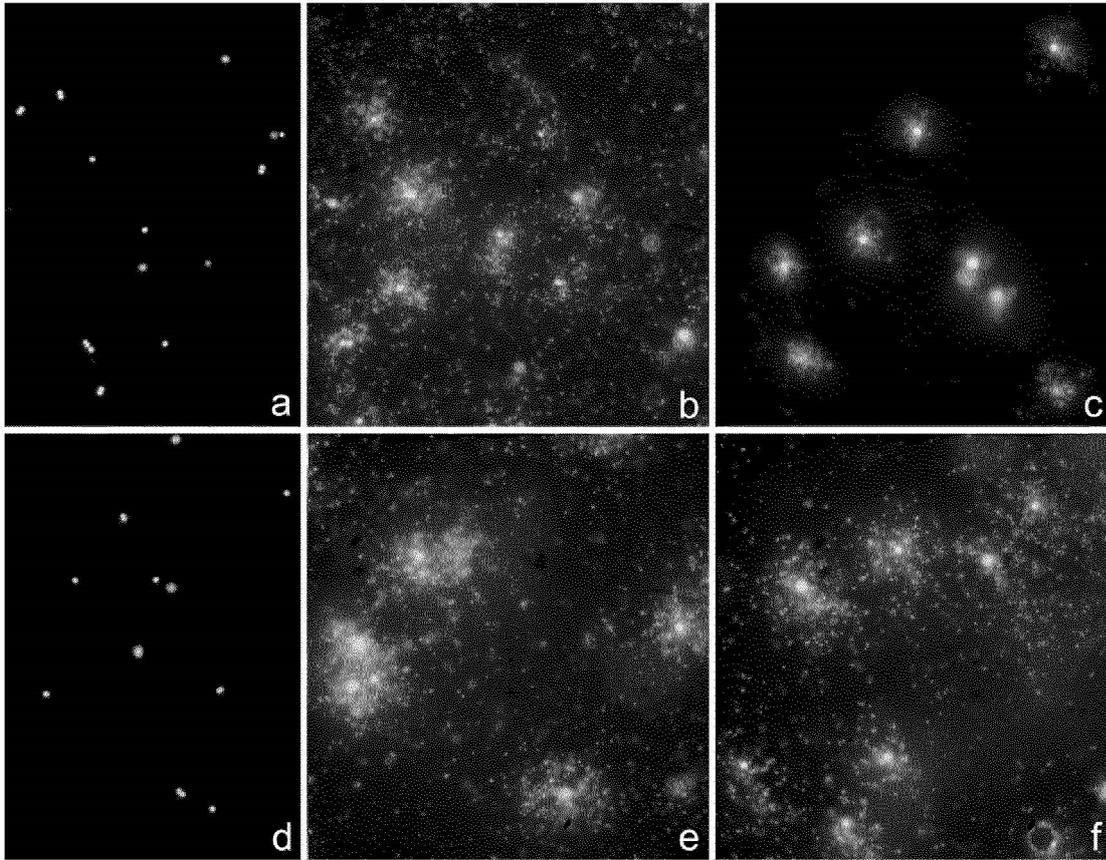


FIG. 3

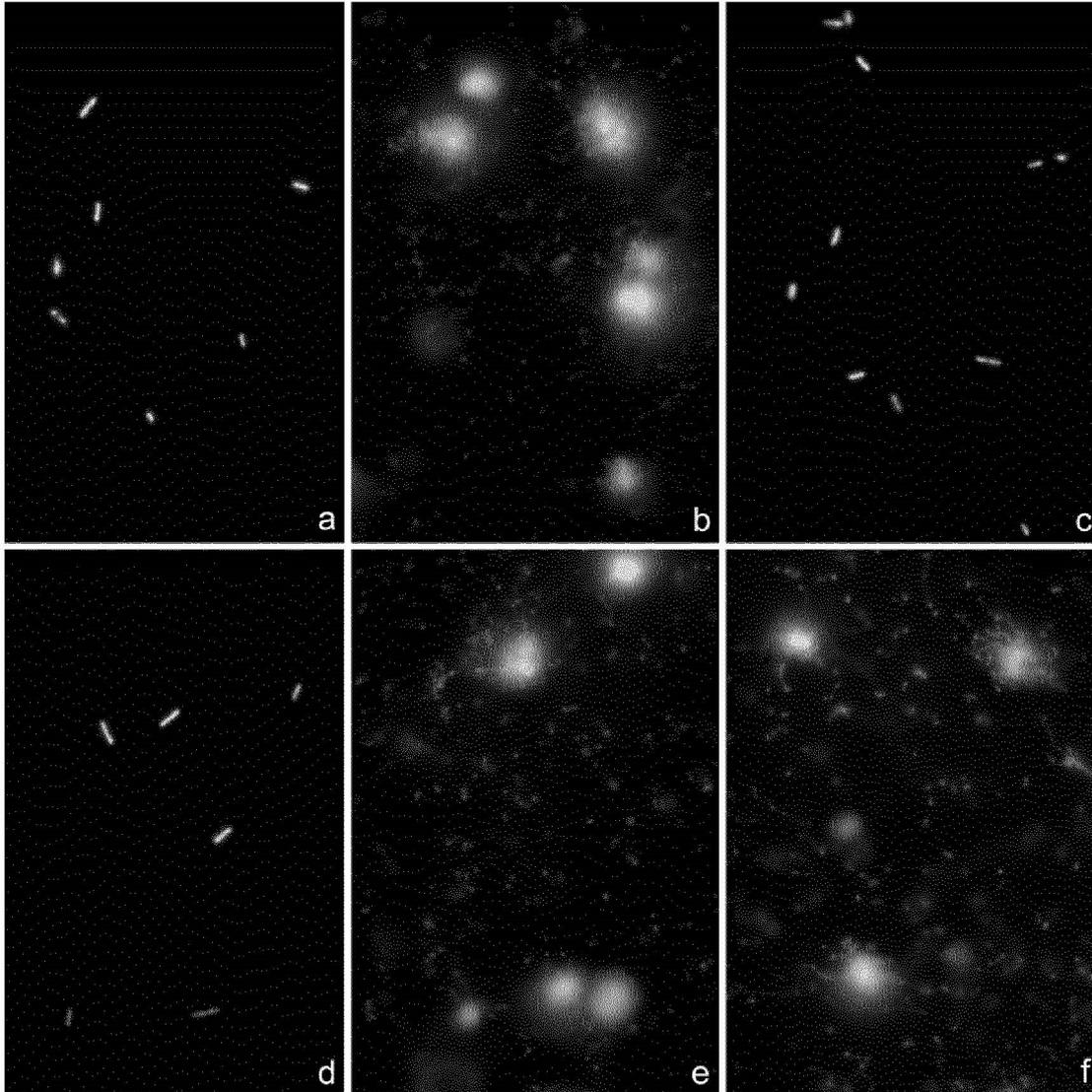


FIG. 4

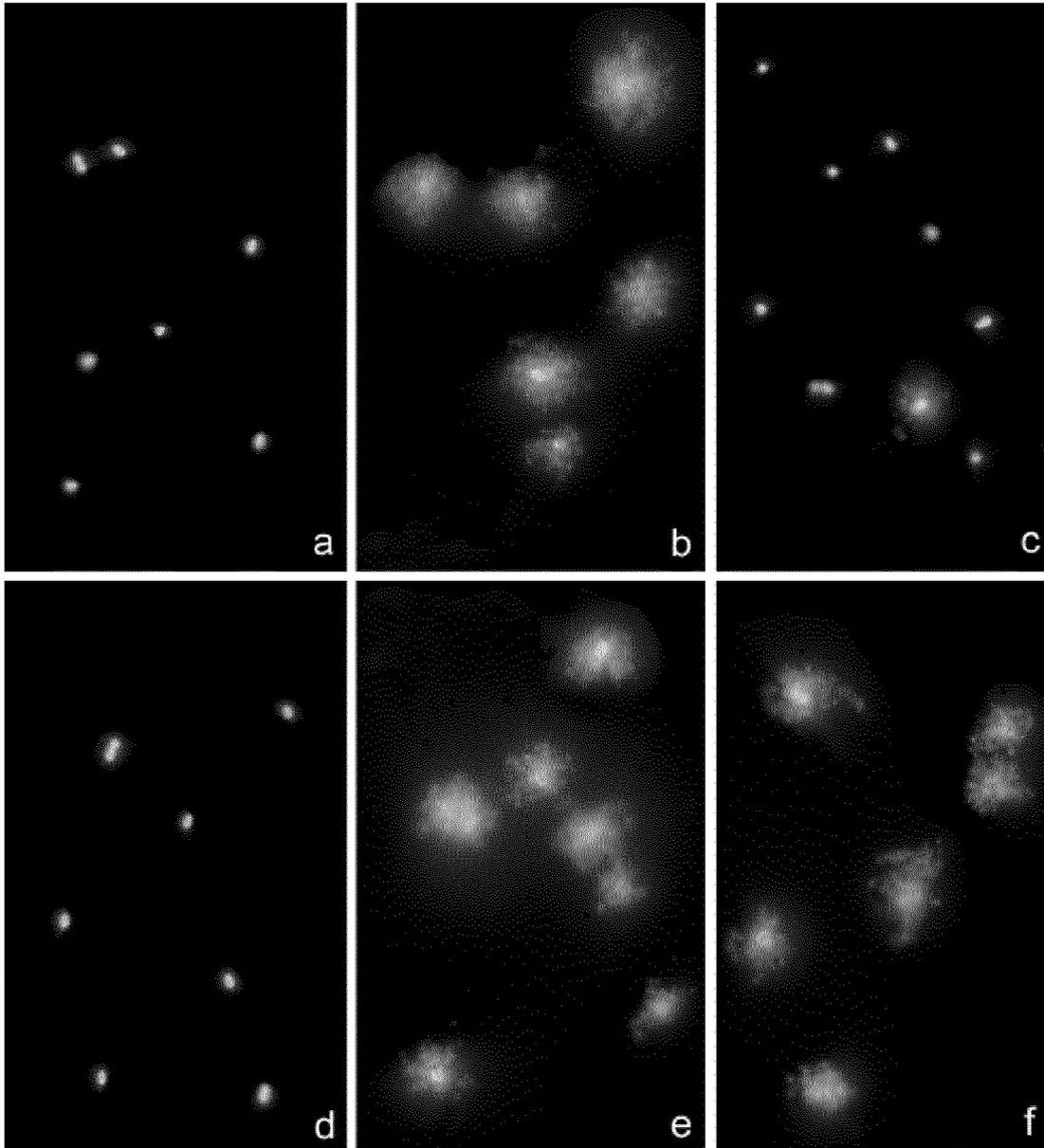


FIG. 5