

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 112**

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: **29.07.2015 PCT/FR2015/052105**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016580**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2015 E 15756680 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3174994**

54 Título: **Caracterización de microorganismos mediante MALDI-TOF**

30 Prioridad:

**30.07.2014 FR 1457389**

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

**07.08.2019**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)  
69280 Marcy-L'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**RAMJEET, MAHENDRASINGH;  
SURRE, JÉRÉMY y  
FERULLO, AUDREY**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 722 112 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

Caracterización de microorganismos mediante MALDI-TOF.

5 La presente invención se refiere al campo de la microbiología. Más precisamente, la invención se refiere a la caracterización de una población de por lo menos un microorganismo utilizando la espectrometría de masa, y en particular, la espectrometría de masa (SM) por desorción-ionización asistida por matriz y medición del tiempo de vuelo denominada MALDI-TOF.

10 La técnica MALDI-TOF se utiliza desde hace algunos años para realizar una identificación rápida de microorganismos, a nivel de la especie. Diferentes aparellajes adaptados a este tipo de caracterización son comercializados por la solicitante, y por las compañías Bruker Daltonics y Andromas en particular.

15 La identificación de un microorganismo se realiza a partir del espectro de masas MALDI-TOF de las proteínas más abundantes en el microorganismo, por comparación con unos datos de referencia que permiten la identificación de la familia, del género y lo más frecuentemente de la especie del microorganismo. Como rutina, el protocolo utilizado comprende el depósito de por lo menos una porción de colonia del microorganismo sobre una placa MALDI, la adición de una matriz adaptada a la técnica MALDI, la adquisición del espectro de masas y la identificación de la especie por comparación con unos datos de referencia almacenados en una base de datos.

20 Más recientemente, la técnica MALDI se ha utilizado asimismo para permitir detectar la resistencia de un microorganismo a un antibiótico, y en particular para identificar un fenotipo, responsable de la hidrólisis de los antibióticos de tipo beta-lactamina, debido a la secreción de enzimas de tipo beta-lactamasa, y en particular, de tipo carbapenemasa. A este respecto, se pueden citar las solicitudes US 2012/0196309 y WO 2012/023845. La caracterización de la resistencia mediante MALDI-TOF implica la detección de la forma hidrolizada y/o la pérdida de la forma nativa del antibiótico beta-lactamina después de la incubación con dicho antibiótico de la muestra susceptible de contener un microorganismo capaz de producir una beta-lactamasa.

30 Aunque en estas solicitudes de patente, la preparación de la muestra a depositar no esté descrita de manera detallada, se considera, en general, mezclar previamente el microorganismo con el agente antibiótico, y después realizar el depósito de la mezcla sobre la placa MALDI o utilizar un lisado de microorganismo(s) (véase el documento WO 2012/023845, reivindicación 15 en particular).

35 El documento WO 2012/113699 considera por su parte, utilizar la espectrometría de masa para evaluar el efecto inhibitor de una sustancia sobre unas beta-lactamasas, pudiendo esta evaluación llevarse a cabo en presencia de bacterias.

40 Las publicaciones siguientes (Hrabak, Walkova *et al.* 2011, Hooff, van Kampen *et al.* 2012, Hrabak, Studentova *et al.* 2012, Sparbier, Schubert *et al.* 2012) dan una descripción más detallada de los protocolos de preparación de muestras a realizar, que comprenden las etapas siguientes:

- preparación de un inóculo que comprende unas colonias del microorganismo,
- centrifugación del inóculo,
- 45 - resuspensión del residuo bacteriano con una solución del antibiótico con o sin reactivo de lisis,
- incubación durante un tiempo de 30 minutos a 3 horas,
- 50 - centrifugación,
- transferencia de un microlitro del sobrenadante sobre una placa MALDI y adición de un microlitro de matriz, análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF.

55 La preparación de la muestra previa a una detección de resistencia mediante la técnica MALDI-TOF es por lo tanto larga y fastidiosa. En efecto, el procedimiento utilizado para la detección de resistencia mediante la técnica MALDI-TOF necesita la preparación de un inóculo de concentración elevada y/o una o varias etapas de centrifugación. Estas etapas necesitan unos materiales, unos consumibles, un equipo específico y son por lo tanto consumidoras al mismo tiempo de consumibles, de tiempo y de trabajo de operario. Por eso, esta preparación previa dificulta la utilización en rutina de la técnica MALDI-TOF para la detección de resistencia, dado que no se puede considerar la realización de la caracterización de un gran número de muestras por día. En efecto, existe muy frecuentemente una falta de adecuación entre la disponibilidad del aparato para realizar la identificación del fenómeno de resistencia mediante la técnica MALDI-TOF, y la disponibilidad de las muestras obtenidas después de la etapa obligatoria de preparación. Otro problema reside en el hecho de que las bacterias son incubadas con el antibiótico, en unos volúmenes del orden de 10 a 50  $\mu$ l, lo cual presenta un riesgo potencial importante de reducir las interacciones enzima-antibiótico. Por consiguiente, se puede encontrar una disminución

de la eficacia de la actividad enzimática, lo cual afecta a la sensibilidad de detección y por lo tanto, a la robustez de la técnica, en particular, en el caso de microorganismos conocidos porque producen o segregan bajas cantidades de enzimas.

5 Se ha descrito asimismo en las solicitudes WO 2011/045544 y US 2012/0196309 que la detección de resistencia a un agente antimicrobiano puede ser realizada mediante otras técnicas de espectrometría de masa, como la MS-MS y la MRM. En este caso, el análisis por espectrometría de masa y por lo tanto la ionización no se realizan sobre el microorganismo, sino sobre las proteínas obtenidas después de diversas operaciones de purificación.

10 En el marco de la invención, los inventores proponen realizar un nuevo método de preparación de una zona de caracterización de un microorganismo mediante la técnica MALDI, que permita la identificación de una resistencia a un antibiótico, que sea simple de utilizar. Por otro lado, este nuevo método es compatible con la obtención de diferentes caracterizaciones de la muestra presente en la zona de caracterización, de las cuales por lo menos una corresponde a la identificación de una resistencia a un antibiótico y otra que puede corresponder a la identificación de un microorganismo.

15 La invención tiene asimismo por objetivo proponer un procedimiento de caracterización de una muestra que contiene por lo menos un microorganismo mediante la técnica MALDI-TOF, que permita saber si una población de un microorganismo presente es o no resistente a por lo menos un agente antimicrobiano, en un tiempo relativamente corto, del orden de algunas horas a una hora, incluso menos.

20 Asimismo, la invención utiliza un procedimiento de preparación de una zona de caracterización de una placa de análisis para la realización de por lo menos una caracterización de una población de por lo menos un microorganismo en presencia de por lo menos un agente antimicrobiano, utilizando dicha caracterización un análisis por espectrometría de masa durante la cual la población de por lo menos un microorganismo depositada sobre la zona de análisis está sometida a por lo menos una etapa de ionización por bombardeo de la zona de análisis mediante un haz láser según la técnica de espectrometría de masa por desorción-ionización asistida por matriz denominada MALDI,

30 caracterizado por que el procedimiento de preparación de la zona de análisis comprende las etapas sucesivas siguientes:

- una etapa que consiste en disponer de una placa de análisis para una caracterización mediante la técnica MALDI, que comprende por lo menos una zona de análisis portadora de un agente antimicrobiano,
- una etapa de depósito de la población de por lo menos un microorganismo sobre dicha zona de análisis en contacto con el agente antimicrobiano,
- una etapa de incubación, que consiste en conservar la placa de análisis, en unas condiciones y durante un tiempo suficiente, para permitir la interacción del agente antimicrobiano y del microorganismo presente,
- una etapa de depósito sobre la zona de análisis, de una matriz adaptada a la técnica MALDI.

45 De manera preferida, en el marco del procedimiento de preparación utilizado en la invención, se deposita una población de un único microorganismo a caracterizar. Así, la zona de caracterización puede ser después utilizada para la caracterización de un único microorganismo.

50 Según la invención, se prepara la población de microorganismo(s) depositada, sin etapa de puesta en contacto previa con un agente antimicrobiano, es decir que la población de microorganismo(s) depositada no se encuentra antes de su depósito en mezcla con el agente antimicrobiano presente en la zona de caracterización.

55 El procedimiento según la invención se realizará ventajosamente sobre una población de microorganismo(s) obtenida después de una etapa de concentración, enriquecimiento y/o purificación y/o que corresponde a una colonia o a una fracción de colonia obtenida después del crecimiento sobre un medio adaptado, en particular un medio gulosado.

En el marco de la invención, el agente antimicrobiano se selecciona, por ejemplo, de manera que permita la identificación de la resistencia debida a la producción de beta-lactamasa, y en particular de carbapenamasa.

60 El agente antimicrobiano es, lo más frecuentemente, un antibiótico, preferentemente seleccionado de entre las penicilinas, las cefalosporinas, las cefamicinas, los carbapenemos, los monobactamos, y en particular de entre la ampicilina, la amoxicilina, la ticarcilina, la piperacilina, la cefalotina, la cefuroxima, la cefoxitina, la cefixima, la cefotaxima, la ceftazidima, la ceftriaxona, la cefpodoxima, la cefepima, el aztreonam, el ertapenemo, el imipenemo, el meropenemo y el faropenemo.

65 El procedimiento de preparación utilizado en la invención puede comprender una etapa de funcionalización que

permite obtener la placa de análisis para una caracterización mediante la técnica MALDI, que comprende por lo menos una zona de análisis portadora de un agente antimicrobiano, denominada funcionalizada, siendo dicha etapa de funcionalización, preferentemente, realizada por depósito de una solución acuosa del agente antimicrobiano, seguido de un secado.

5 La invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de caracterización de una población de por lo menos un microorganismo tal como se define en la reivindicación 1.

10 En particular, el análisis por espectrometría de masa según la técnica MALDI-TOF, que permite concluir si una población de un microorganismo resistente al agente antimicrobiano está presente en la zona de caracterización, consiste en verificar la presencia del agente antimicrobiano y/o de un producto de degradación del agente antimicrobiano.

15 El procedimiento de caracterización según la invención comprende por lo menos dos caracterizaciones. La caracterización comprende, además de un análisis por espectrometría de masa por desorción-ionización asistida por matriz y medición del tiempo de vuelo denominada MALDI-TOF, de una población de un microorganismo depositada sobre la zona de caracterización, que permite concluir si una población de un microorganismo resistente al agente antimicrobiano está presente en la zona de caracterización, la identificación de la familia, del género o, preferentemente, de la especie de una población de un microorganismo depositada sobre la zona de caracterización.

El procedimiento de caracterización según la invención comprende:

- 25 - la identificación de la familia, del género o, preferentemente, de la especie de una población de un microorganismo depositada sobre la zona de caracterización, realizando un primer análisis por espectrometría de masa de tipo MALDI que corresponde a una primera etapa de ionización de una zona de caracterización, y utilizando para el análisis una primera calibración, y
- 30 - la determinación de la presencia eventual sobre la zona de caracterización de una población de un microorganismo resistente al agente antimicrobiano, realizando un segundo análisis por espectrometría de masa según la técnica MALDI-TOF que corresponde a una segunda etapa de ionización de la misma zona de caracterización, y utilizando para el análisis una segunda calibración.

35 La identificación de la familia, del género o, preferentemente, de la especie de una población de un microorganismo, y la determinación de la resistencia eventual al agente antimicrobiano se refiere, preferentemente, al mismo microorganismo.

El procedimiento de caracterización de una población de por lo menos un microorganismo, según la invención, se caracteriza por que:

- 40 - el primer y el segundo análisis son realizados, respectivamente, por una primera etapa y una segunda etapa de ionización distintas de una misma zona de caracterización que comprende la población de por lo menos un microorganismo y el agente antimicrobiano,
- 45 - el primer análisis utiliza una primera calibración, y el segundo análisis utiliza una segunda calibración diferente de la primera calibración.

Preferentemente, la población depositada comprende un único microorganismo a caracterizar.

50 Un procedimiento de caracterización de este tipo utiliza un procedimiento de preparación de una zona de caracterización de una placa de análisis según la invención.

En el marco de la invención, la misma zona de caracterización y por lo tanto la misma población de microorganismo(s) es sometida sucesivamente a dos ionizaciones que permiten obtener las dos caracterizaciones deseadas: la caracterización de un fenómeno de resistencia de un microorganismo a un agente antimicrobiano y la identificación del microorganismo. La invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de funcionalización de una zona de análisis de una placa de análisis adaptada a la técnica MALDI, caracterizado por que el procedimiento de funcionalización de la zona de análisis comprende:

- 60 - una etapa de funcionalización de la zona de análisis que hace que la zona de análisis sea portadora de un agente antimicrobiano.

La etapa de funcionalización puede ser realizada por depósito de una solución acuosa del agente antimicrobiano, seguido de un secado.

65 Otro objeto de la invención consiste en una placa de análisis destinada a recibir una población de por lo menos

un microorganismo a caracterizar sobre una zona de análisis por espectrometría de masa según la técnica MALDI, caracterizada por que comprende un agente antimicrobiano depositado, en particular en forma de un depósito sólido, sobre dicha zona de análisis de la placa de análisis, que forma una zona de análisis denominada funcionalizada. En particular, en una placa de análisis de este tipo, la o las zona(s) de análisis funcionalizada(s), portadora(s) del agente antimicrobiano, no comprende(n) ningún microorganismo en una cantidad detectable por la técnica MALDI y/o la o las zona(s) de análisis funcionalizada(s), portadora(s) del agente antimicrobiano está(n) seca(s).

Por “seca” se entiende en particular que el agente antimicrobiano no se encuentra en solución, sino en forma de un depósito sólido que se adhiere a la zona de análisis sobre la cual está depositado. En particular, el mantenimiento de un agente microbiano sobre una zona de análisis denominada funcionalizada podrá estar asegurado por unión electroestática, iónica, covalente, de afinidad o también gracias a un agente adhesivo. El agente adhesivo será, en particular, un polímero soluble en agua. A título de ejemplo de agente adhesivo que puede ser utilizado para la inmovilización del agente antimicrobiano sobre la o las zonas de análisis, se puede citar la heptakis(2,6-di-O.metil)- $\beta$ -ciclodextrina.

Según un modo de realización particular, en una placa de análisis de este tipo destinada a recibir una población de por lo menos un microorganismo a caracterizar, la o las zona(s) de análisis funcionalizada(s) será(n) cada una portadora(s) de un único agente antimicrobiano.

La placa de análisis destinada a recibir una población de por lo menos un microorganismo según la invención podrá ser acondicionada en un embalaje hermético. El embalaje hermético estará, en particular, adaptado para proteger la placa de la luz y de la humedad.

La o las zona(s) de análisis funcionalizada(s) podrá(n) ser obtenida(s) por depósito de una solución acuosa del agente antimicrobiano, seguido de un secado.

Unas placas de este tipo podrán comprender varias zonas de análisis funcionalizadas, siendo cada una portadora de un agente antimicrobiano, con en particular por lo menos una primera zona de análisis funcionalizada portadora de un primer agente antimicrobiano, y una segunda zona de análisis funcionalizada, distinta de la primera zona, portadora de un segundo agente antimicrobiano distinto del primer agente antimicrobiano.

Lo más frecuentemente, dichas placas comprenden por lo menos una zona de análisis de referencia, destinada a recibir ulteriormente una población de un microorganismo de referencia, y la superficie de la zona de análisis de referencia está desprovista de agente antimicrobiano.

La invención se refiere asimismo a la utilización de una placa de análisis según la invención, en un procedimiento de caracterización según la invención.

La descripción siguiente, en referencia a las figuras adjuntas permite comprender mejor la invención.

La **figura 1** es una vista esquemática por arriba de una placa MALDI.

Las **figuras 2 a 4** son unos espectros de masa obtenidos en los ejemplos mediante la técnica MALDI-TOF. En estas figuras, la escala de intensidad es una escala relativa con respecto al pico más intenso del espectro. Por ejemplo, en un intervalo de masa seleccionado (en particular de 200 a 1200 m/z), si el pico más intenso es de 100 mV, se anotará 100% (como se menciona a la izquierda de los espectros). Los picos menos intensos se anotarán con respecto al pico más intenso: un pico de intensidad 75 mV alcanzará por lo tanto 75% de la escala (sobre el espectro que contiene el pico de intensidad máxima de 100 mV). Por lo tanto, en un mismo espectro, la intensidad de los picos entre las cepas no puede ser comparada. Por el contrario, estos espectros permiten comparar, para una misma cepa, el nivel de intensidad entre el pico nativo del agente antimicrobiano y el de su producto de degradación. También será posible comparar, para una misma cepa, el nivel de intensidad entre los picos nativos o hidrolizados y un pico de control que no está sometido a las variaciones inducidas por la actividad biológica/enzimática del microorganismo a ensayar. Se podrán considerar como picos de control, un pico de la matriz HCCA, el pico de un péptido o una molécula de referencia añadido(a) a la matriz o previamente secado(a) sobre la zona de análisis.

La **figura 5** muestra el aspecto de zonas de análisis (puntos) sobre las cuales se ha depositado un antibiótico, el faropenemo, en presencia y en ausencia de agente adhesivo (el Heptakis), antes y después del raspado con una “oese”.

La **figura 6** muestra la variación de las proporciones de intensidades de los picos del faropenemo nativo y del faropenemo hidrolizado, obtenidos mediante la técnica MALDI-TOF, con respecto al pico de control de HCCA en función de las proporciones [Heptakis]/[faropenemo].

La **figura 7** presenta los espectros de masa obtenidos en la segunda serie de adquisiciones del ejemplo 5.

La **figura 8** muestra la variación de las proporciones de intensidades 304/308 y 304/330 en función de la concentración en inóculo utilizada para las 2 cepas ensayadas en el ejemplo 5.

La **figura 9** representa un modelo de caja que integra una placa MALDI que podría ser adaptado al depósito de una población de microorganismo en forma líquida.

#### Placas de análisis MALDI

Una placa de análisis MALDI presenta, por lo menos una y, en general, varias zonas de análisis. Las zonas de análisis forman un punto, lo más frecuentemente de forma circular. Con el fin de favorecer la ionización ulterior, por lo menos a nivel de la o de las zonas de análisis, la superficie de la placa es conductora. A título de ejemplo, una placa de análisis de este tipo está formada por un polímero tal como el polipropileno, estando dicho polímero recubierto de una capa de acero inoxidable. El polímero puede contener un material recubierto de una capa de acero inoxidable. El polímero puede contener un material conductor tal como el negro de carbón. Dicha placa puede ser, por ejemplo, la comercializada por la compañía Shimadzu, bajo la referencia Fleximass<sup>TM</sup> DS disponible MALDI targets.

Diferentes placas MALDI están disponibles en el comercio tales como las placas Fleximass DS de bioMérieux (desechables o reutilizables) y las placas Maldi Biotarget de Bruker Daltonics. Estas placas comprenden lo más frecuentemente de 48 a 96 zonas de análisis **1** o puntos, y por lo menos una, e incluso dos o tres zonas de análisis de referencia **2**, que pueden ser como en el ejemplo ilustrado en la **figura 1** de tamaño diferente de las zonas de análisis.

En el marco de la invención, se denomina “zona de caracterización” una zona de análisis portadora de un agente antimicrobiano, de una población de microorganismo(s) y de una matriz adaptada a la técnica MALDI.

#### Funcionalización de la zona de análisis

Por “agente antimicrobiano”, se entiende un compuesto capaz de disminuir la viabilidad de un microorganismo y/o disminuir su crecimiento o su reproducción. Unos agentes antimicrobianos de este tipo pueden ser unos antibióticos, cuando están dirigidos contra unas bacterias. Sin embargo, la invención es aplicable a cualquier tipo de microorganismo de tipo bacteria, levaduras, mohos o parásitos y, por lo tanto, a los agentes antimicrobianos correspondientes.

Preferentemente, el agente antimicrobiano será un antibiótico tal como una beta-lactamina, seleccionada en particular de entre las penicilinas, las cefalosporinas, las cefamicinas, los carbapenemos, los monobactamos y en particular de entre la ampicilina, la amoxicilina, la ticarcilina, la piperacilina, la cefalotina, la cefuroxima, la ceftioxima, la cefixima, la cefotaxima, la ceftazidima, la ceftriaxona, la cefpodoxima, la cefepima, el aztreonam, el ertapenemo, el imipenemo, el meropenemo y el faropenemo.

Los carbapenemos se utilizan, en particular, como último recurso para luchar contra las bacterias gram negativas tales como la familia de las enterobacterias, de las *Pseudomonas* y los *Acinetobacter*. Un antibiótico de este tipo será depositado por lo tanto sobre la zona de análisis cuando se sospeche que el microorganismo presente es una enterobacteria u otra especie gram negativa susceptible de presentar una resistencia a los carbapenemos.

El depósito se realiza, preferentemente, a partir de una solución acuosa del agente antimicrobiano.

Un tampón adaptado a la solubilidad del agente antimicrobiano, así como a una actividad óptima del mecanismo origen de la resistencia diana, también podrá ser utilizado para preparar la solución del agente antimicrobiano. La adición de sales de zinc (en particular de tipo cloruro o sulfato de zinc) en la solución antimicrobiana también podrá ser considerada para una actividad óptima de las metalo-beta-lactamasas.

Se podrá depositar una gota, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 2 microlitros, de la solución antimicrobiana, de tal manera que toda la zona de análisis esté recubierta. El agua contenida en la solución se evapora a continuación, por ejemplo, por simple secado al aire ambiente y a temperatura ambiente. Se puede dejar la placa de análisis a una temperatura que pertenece, por ejemplo, al intervalo comprendido entre 17 y 40°C, y en particular a temperatura ambiente (22°C). Es posible transferirla asimismo a un recinto termostático, por ejemplo, a 37°C, para acelerar el secado.

De manera muy simple, el agente antimicrobiano estará depositado en solución acuosa, siendo este depósito seguido de una operación de secado. Se obtiene así una zona de análisis portadora de un agente antimicrobiano, denominada funcionalizada. Es también posible que el agente antimicrobiano esté inmovilizado sobre la zona de análisis por unión electrostática, iónica, covalente o unión de afinidad o gracias a un agente adhesivo. Un simple depósito del agente antimicrobiano podrá no asegurar una inmovilización satisfactoria de

este último. En efecto, en este caso, si el agente antimicrobiano no se adhiere suficientemente a la zona de caracterización, podría provocar una pérdida del agente antimicrobiano durante el depósito de la población de microorganismo(s), que necesita así una cierta destreza por parte del manipulador cuando tiene lugar la realización del depósito, o también una pérdida del agente antimicrobiano por despegue del depósito cuando tiene lugar el almacenamiento de la placa MALDI para una utilización ulterior. Asimismo, en lugar de un simple depósito, el agente antimicrobiano podrá estar unido a la zona de análisis por unos enlaces electrostáticos, iónicos, covalentes, con o sin la utilización de un brazo o de una pareja de unión específica (anticuerpos, proteínas recombinantes de fago) o no, por la utilización de interacción biotina/estreptavidina previamente injertada en la superficie de la zona de análisis y en el agente antimicrobiano, o mediante cualquier tipo de unión adaptada a la naturaleza del agente antimicrobiano y a la superficie de la zona de análisis, o también gracias a un agente adhesivo. El modo de unión o de depósito se seleccionará no obstante de manera que no perturbe la eventual interacción del agente antimicrobiano con un microorganismo, lo cual podría tener como consecuencia ocultar un fenómeno de resistencia. En particular, se preferirá realizar la inmovilización del agente antimicrobiano mediante la utilización de un agente adhesivo, en lugar de por unión covalente o de afinidad para evitar unos cambios de conformación del agente antimicrobiano y asegurar una buena accesibilidad de este último al sitio activo de la enzima que sería generada por el microorganismo.

En el caso de la utilización de un agente adhesivo, es decir de un agente que se adherirá a la placa y por lo tanto mejorará la inmovilización del agente antimicrobiano sobre esta última, se depositará entonces una mezcla del agente adhesivo y del agente antimicrobiano en solución acuosa. El agente adhesivo será, en particular, un polímero soluble en agua. A título de ejemplo de agente adhesivo que puede ser utilizado para la inmovilización del agente antimicrobiano sobre la o las zonas de análisis, se puede citar la heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina. El agente adhesivo se seleccionará en función del agente antimicrobiano a inmovilizar sobre la zona de análisis. En particular, se seleccionará en función de su masa, de manera que su presencia no falsee la detección ulterior mediante MALDI que tiene como objetivo determinar la presencia o la ausencia del agente antimicrobiano presente y/o de sus productos de degradación. El experto en la materia ajustará la cantidad de agente adhesivo utilizada que no deberá ser demasiado importante para asegurar la accesibilidad del agente antimicrobiano por la población de microorganismo(s) cuando ésta haya sido depositada. Por ejemplo, en el caso de la heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, se podrá seleccionar una relación másica heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina/agente antimicrobiano de 1/20 a 1/2, preferentemente de 1/10 a 1/5.

La cantidad depositada de agente antimicrobiano sobre una zona de análisis será adaptada por el experto en la materia, en función del agente antimicrobiano en cuestión. En efecto, según el grado de ionización de la molécula, se deberá depositar una cantidad suficiente para poder detectar en MALDI-TOF el (los) pico(s) que corresponde(n) al agente antimicrobiano con unas intensidades por encima del ruido de fondo. A la inversa, una cantidad demasiado importante de agente antimicrobiano tendría el riesgo de ocultar la detección del fenómeno origen de la resistencia a caracterizar, de tal manera que la disminución de intensidad del pico que corresponde al agente antimicrobiano nativo no podría ser observada. El exceso de agente antimicrobiano podría, en particular, comprometer la detección de beta-lactamasas que tienen una baja actividad. Por ejemplo, se depositará de 0,04 a 4 g/m<sup>2</sup> de agente antimicrobiano. Para ello, se depositará en particular una solución en agua ultrapura a una concentración de 0,1 a 10 mg/ml de agente antimicrobiano. A título de ejemplo, para la ampicilina, se podrá depositar una solución acuosa que comprende de 1,7 a 10 mg/ml de ampicilina y para el faropenemo, se podrá depositar una solución acuosa que comprende de 0,1 a 1 mg/ml de faropenemo.

Una zona de caracterización será, preferentemente, portadora de un solo agente antimicrobiano, aunque no se excluye la utilización de varios agentes antimicrobianos sobre una misma zona de análisis. Una zona de caracterización portadora de varios agentes antimicrobianos permitiría ensayar la presencia de varias enzimas al mismo tiempo y por lo tanto diferentes fenómenos de resistencia. En el caso de una zona de caracterización portadora de varios agentes antimicrobianos, se seleccionarán estos últimos de manera que la masa de su forma nativa y/o sus productos de degradación bajo la acción de la enzima diana no se solapen, para poder detectarlos separadamente mediante MALDI-TOF. Es posible, por ejemplo, depositar además de un agente antimicrobiano, otro agente antimicrobiano de la misma familia o de una familia diferente. Por ejemplo, algunos carbapenemos están más adaptados para revelar una carbapenemasa particular. Por lo tanto, es posible considerar tener varios tipos de carbapenemos u otras beta-lactaminas sobre una misma zona de caracterización. Por el contrario, si se depositan dos agentes antimicrobianos sobre una misma zona, éstos serán seleccionados de manera que su espectro de actividad no interfiera el uno con el otro y que sea detectable distintamente mediante MALDI-TOF.

Es posible también depositar además del agente antimicrobiano, otro compuesto. En el caso de las beta-lactaminas, también es posible depositar un inhibidor de las beta-lactamasas, con el fin de caracterizar un fenómeno BLSE (beta-lactamasa de espectro amplio), como se realiza en particular en la solicitud WO 2012/023845. En particular, se podrá depositar una combinación de una beta-lactamina con un inhibidor de beta-lactamasa tal como el ácido clavulánico, el sulbactam o el tazobactam. Cuando la placa MALDI comprende varias zonas de análisis, de manera ventajosa, por lo menos dos zonas, incluso más, serán portadoras de un agente antimicrobiano diferente. Es posible caracterizar así varias poblaciones de microorganismo(s) con una misma placa. Cada una de las zonas podrá ser portadora de un agente antimicrobiano diferente. Lo más frecuentemente, sin embargo, las caracterizaciones se efectúan por duplicado, de manera que un mismo agente

antimicrobiano estará presente sobre por lo menos dos zonas de análisis, incluso más.

Estas placas MALDI funcionalizadas podrán ser directamente proporcionadas al usuario, que sólo tendrá que depositar la población de microorganismo(s) a estudiar, y después, tras una etapa de incubación, la matriz MALDI. Podrán ser comercializadas en un embalaje individual o que comprende varias placas.

#### Preparación y depósito de la población de microorganismo(s)

En el marco de la invención, se deposita una población de microorganismo(s) sobre una zona de análisis de una placa MALDI funcionalizada con un agente antimicrobiano, para proceder a continuación a su caracterización.

La población de microorganismo(s) podrá proceder de diferentes fuentes. A título de ejemplo de fuente de microorganismo(s), se pueden citar las muestras de origen biológico, en particular animal o humana. Una muestra de este tipo puede corresponder a una extracción de fluido biológico, del tipo sangre total, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, secreción orgánica, a una extracción de tejido o a unas células aisladas. Esta extracción podrá ser depositada tal cual, o será, preferentemente, sometida previamente al depósito sobre la zona de análisis en cuestión, a una preparación de tipo enriquecimiento o cultivo, a una concentración y/o a una etapa de extracción o de purificación según unos métodos conocidos por el experto en la materia. No obstante, esta preparación no puede corresponder a una etapa de lisis que provoca la desintegración de los microorganismos y una pérdida de su contenido antes del depósito sobre la zona de análisis. La población de microorganismo(s) podrá ser depositada en forma de un inóculo. En el marco de la invención, la población de microorganismo(s) depositada sobre la zona de análisis será, preferentemente, una población de microorganismo(s) vivo(s), aunque no se excluye realizar una extracción de la población de microorganismo(s) a partir de una muestra biológica, utilizando un detergente, lo cual podrá afectar a la viabilidad. Pero, en tal caso, para un ensayo inmediato de la población de microorganismo(s) en MALDI, el almacenamiento de enzimas activas ya presente podrá permitir realizar la caracterización de la población de microorganismo(s), detectando el eventual fenómeno de resistencia.

La fuente de la población de microorganismo(s) también puede ser un producto de la industria agroalimentaria tal como la carne, la leche, el yogur y cualquier otro producto consumible susceptible de estar contaminado, o también un producto cosmético o farmacéutico. También en este caso, este tipo de producto podrá ser sometido a una preparación de tipo enriquecimiento o cultivo, a una concentración y/o a una etapa de extracción o de purificación, con el fin de obtener la población de microorganismo(s) a depositar.

Lo más frecuentemente, la fuente de microorganismo(s) podrá haber sido puesto en cultivo previamente en un caldo o en una gelosa de manera que lo enriquezca en microorganismos. Unos medios de este tipo, gelosados o en caldo, son bien conocidos por el experto en la materia. El enriquecimiento sobre gelosa es particularmente favorable ya que permite obtener unas colonias de microorganismos que podrán ser depositados directamente sobre la zona de análisis.

En el marco de la invención, se podrá depositar sobre la zona de análisis, preferentemente, un medio celular que comprende una población bacteriana, y no una o varias proteínas obtenidas después de una etapa de extracción o de purificación, como en el caso de las técnicas MS/MS o MRM. Preferentemente, la población de microorganismos depositada contiene por lo menos  $10^5$  UFC de microorganismos. A título de ejemplo, se podrán depositar de  $10^5$  a  $10^9$  UFC de un microorganismo. Es posible, por ejemplo, proceder directamente al depósito de una biomasa, de una gota de una suspensión de microorganismos, en el agua ultra pura o un tampón. Se podrá depositar una colonia o una fracción de colonia de un microorganismo.

La población depositada comprenderá, preferentemente, una sola especie de microorganismo. Sin embargo, no está excluido depositar sobre la zona de análisis una población que comprende diferentes microorganismos. En este caso, será preferible que los microorganismos sean conocidos porque son susceptibles de desarrollar unos mecanismos de resistencia diferentes, de manera que se sepa cuál presentaría la resistencia que estuviera identificada.

En el marco de la invención, no es útil proceder a una preparación particular de una muestra que fuera depositada. En particular, se deposita la población de microorganismo(s), sin haber sido previamente puesta en contacto con un agente antimicrobiano. En efecto, en el marco de la invención, no es necesario proceder a una preparación larga y fastidiosa de una muestra a depositar, pudiendo la población de microorganismo(s) depositada ser preparada sin etapa de centrifugación.

El depósito se realiza de manera que la población de microorganismo(s) se deposite de manera homogénea sobre la zona de análisis. Para ello, se podrán utilizar los procedimientos descritos para la realización de la identificación estándar de microorganismos, en los manuales de utilización de los aparellajes MALDI-TOF comerciales, tales como el aparellaje VITEK<sup>®</sup> MS comercializado por la compañía bioMérieux.

No obstante, es posible añadir, además de la población de microorganismo(s), un compuesto conocido porque



5 acelera la reacción enzimática utilizada en el mecanismo de resistencia considerado. Este compuesto puede ser por ejemplo zinc, en forma  $ZnCl_2$  o sulfato de zinc en particular, que es un cofactor importante para la actividad de las metalo-beta-lactamasas. Este compuesto puede ser depositado previamente sobre la zona de análisis en combinación con el agente antimicrobiano o en cualquier otro momento en la preparación de la zona de caracterización.

10 El hecho de que lo que se deposita sobre la zona de análisis contenga una población de por lo menos un microorganismo, puede ser determinado previamente por un ensayo adaptado, en particular por el hecho de que se trata de una colonia aislada sobre gelosa. De manera preferida, se depositará sobre la zona de análisis una sola población de un solo microorganismo.

#### Incubación

15 Después del depósito de la población de microorganismo(s), la zona de análisis portadora al mismo tiempo del agente antimicrobiano y de la población de un microorganismo a caracterizar, es sometida a una etapa de incubación para permitir la interacción entre el microorganismo y el agente antimicrobiano y por lo tanto, en el caso de la presencia de una población de microorganismos, que resisten al agente antimicrobiano, permitir que se produzca la reacción/el fenómeno origen de la resistencia. En particular, cuando el fenómeno de resistencia a detectar se debe a la presencia de una enzima producida por el microorganismo depositado, la incubación se realizará de manera que permita que se produzca la reacción enzimática.

20 En el marco de la invención, el fenómeno responsable de la resistencia a un agente antimicrobiano tiene por lo tanto lugar directamente sobre la placa MALDI y de ninguna manera previamente al depósito sobre la placa MALDI de la población de microorganismo(s) puesta ya en presencia del agente antimicrobiano, como en las técnicas anteriores. El fenómeno responsable de la resistencia a un agente antimicrobiano se produce en un volumen mínimo que corresponde a la zona de caracterización. Se limitan así los problemas de dilución encontrados en las técnicas anteriores.

25 Las condiciones y el tiempo de incubación estarán adaptados por el experto en la materia en función del fenómeno de resistencia a caracterizar.

30 Se puede dejar la placa de análisis a una temperatura que pertenece, por ejemplo, al intervalo comprendido entre 17 y 40°C, y en particular a temperatura ambiente (22°C). Es posible también transferirla a un recinto termostático, por ejemplo, a 37°C, para favorecer la reacción enzimática que podría ser origen del fenómeno de resistencia.

35 Las condiciones de humedad estarán adaptadas para evitar el desecado de los microorganismos presentes, en particular cuando el fenómeno de resistencia a detectar utiliza una reacción de hidrólisis. La placa podrá ser colocada durante la incubación en una atmósfera húmeda, salvo que el porcentaje de humedad aportado directamente por el depósito que contiene la población de microorganismo(s) sea suficiente.

40 En las condiciones seleccionadas, el tiempo de incubación deberá ser suficiente para permitir la detección ulterior por MS MALDI-TOF del fenómeno de resistencia a detectar, en particular de la reacción enzimática en el caso de fenómenos de resistencia mediados por una enzima. La incubación se realiza, lo más frecuentemente, durante por lo menos 5 minutos, más preferentemente durante por lo menos 20 minutos, y aún más preferentemente durante un tiempo de 45 a 90 minutos.

45 Se ha constatado, en el marco de la invención, que la realización de una etapa de incubación de este tipo no molestaba en absoluto una identificación ulterior del microorganismo, si se deseaba realizar dicha caracterización, además de la detección del fenómeno de resistencia.

#### Depósito de la matriz MALDI

50 Generalmente, las matrices utilizadas en la técnica MALDI son fotosensibles y cristalizan en presencia de la población de microorganismo(s), preservando al mismo tiempo la integridad de las moléculas y microorganismos presentes. Unas matrices de este tipo, en particular adaptadas a la técnica SM MALDI-TOF, son bien conocidas y, por ejemplo, están constituidas a partir de un compuesto seleccionado de entre: el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico; el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, el ácido ferúlico y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico. Numerosos compuestos diferentes son conocidos por el experto en la materia. Existen también unas matrices líquidas que no cristalizan ni a presión atmosférica, ni incluso bajo presión. Se podrá utilizar cualquier otro compuesto que permita ionizar las moléculas presentes en la zona de caracterización bajo el efecto de un rayo láser.

55 Para la constitución de la matriz, este tipo de compuesto es puesto en solución, lo más frecuentemente en agua, preferentemente de calidad "ultra pura", o en una mezcla agua/disolvente(s) orgánico(s). A título de ejemplo de disolventes orgánicos utilizados clásicamente, se puede citar la acetona, el acetonitrilo, el metanol o el etanol. El ácido trifluoroacético (TFA) puede ser añadido a veces. Una matriz de este tipo está constituida, por ejemplo, por

20 mg/ml de ácido sinápico en una mezcla acetonitrilo/agua/TFA de 50/50/0,1 (v/v). El disolvente orgánico permite que las moléculas hidrófobas presentes se disuelvan en la solución, mientras que el agua permite la disolución de las moléculas hidrófilas. La presencia de ácido, tal como el TFA, favorece la ionización de las moléculas por captación de un protón ( $H^+$ ).

5 Se deposita la solución constitutiva de la matriz directamente sobre la zona de análisis y recubre entonces la población de microorganismo(s) y el agente antimicrobiano presentes en esta última.

10 De manera opcional, el procedimiento según la invención contiene, además, antes de la etapa de ionización de la zona de caracterización, una etapa de cristalización de la matriz presente. Lo más frecuentemente, se obtiene la cristalización de la matriz dejando secar la matriz al aire ambiente. El disolvente presente en la matriz se evapora así, por ejemplo, dejando la placa de análisis a una temperatura que pertenece, por ejemplo, al intervalo comprendido entre 17 y 30°C, y en particular a temperatura ambiente (22°C) durante algunos minutos, por ejemplo, de 5 minutos a 2 horas. Esta evaporación del disolvente permite la cristalización de la matriz en la que están repartidos la población de microorganismo(s) y el agente antimicrobiano.

#### Ionización y obtención del espectro de masas

20 La población de microorganismo(s) y el agente antimicrobiano, colocados en el seno de la matriz MALDI, que forma la zona de caracterización, están sometidos a una ionización suave.

25 El rayo láser utilizado para la ionización podrá tener cualquier tipo de longitud de onda favorable a la sublimación o a la vaporización de la matriz. Preferentemente, se utilizará una longitud de onda ultravioleta o incluso infrarroja. Esta ionización podrá, por ejemplo, ser realizada con un láser de nitrógeno que emite un rayo UV a 337.1 nm.

30 Cuando tiene lugar la ionización, la población de microorganismo(s) y el agente antimicrobiano son sometidos a una excitación por láser. La matriz absorbe entonces la energía fotónica y la restitución de esta energía provoca la sublimación de la matriz, la desorción de las moléculas presentes en la población de microorganismo(s) y del agente antimicrobiano y la aparición de materia en un estado calificado de plasma. Dentro de este plasma, se producen unos intercambios de cargas entre moléculas de matriz, microorganismos y agente antimicrobiano. Por ejemplo, unos protones pueden ser arrancados en la matriz y transferidos a las proteínas, péptidos y compuestos orgánicos presentes a nivel de la zona de caracterización. Esta etapa permite una ionización suave de las moléculas presentes sin inducir su destrucción. La población de microorganismo(s) y el agente antimicrobiano liberan así unos iones de diferentes tamaños. Estos últimos son entonces acelerados por un campo eléctrico y vuelan libremente en un tubo bajo presión reducida, denominado tubo de vuelo. La presión aplicada en la ionización y en la aceleración de los iones generados pertenece lo más frecuentemente al intervalo comprendido entre  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$  milibares [mbar]. Los iones más pequeños "viajarán" entonces más rápidamente que los iones más grandes permitiendo así su separación. En el extremo terminal del tubo de vuelo está situado un detector. El tiempo de vuelo (o TOF por "*Time Of Flight*" en inglés) que tardan los iones se utiliza para calcular su masa. Se obtiene así un espectro de masas, que representa la intensidad de la señal que corresponde al número de moléculas ionizadas de una misma relación entre masa y carga [m/z], en función de la relación m/z de las moléculas que golpean el detector. La relación entre masa y carga [m/z] se expresa en Thomson [Th]. Una vez introducida en el espectrómetro de masas, se obtiene el espectro de una zona de caracterización muy rápidamente, lo más frecuentemente en menos de un minuto.

Un procedimiento de espectrometría de masas MALDI-TOF susceptible de ser utilizado según la invención puede comprender en particular las etapas sucesivas siguientes para la obtención del espectro de masas:

- 50 - disponer de una zona de caracterización que comprende la población de microorganismo(s) a estudiar y por lo menos un agente antimicrobiano en una matriz adaptada a la espectrometría MALDI,
- eventualmente obtener la cristalización de la matriz en la que están dispuestos la población de microorganismo(s) y el agente antimicrobiano,
- 55 - ionizar la mezcla población de microorganismo(s)/agente antimicrobiano/matriz, gracias a un rayo láser,
- acelerar las moléculas ionizadas obtenidas gracias a una diferencia de potencial,
- 60 - dejar que las moléculas ionizadas y aceleradas se desplacen libremente en un tubo bajo presión reducida,
- detectar por lo menos una parte de las moléculas ionizadas a la salida del tubo, de manera que se mida el tiempo que han tardado en recorrer el tubo bajo presión reducida y se obtenga una señal que corresponde al número de moléculas ionizadas que alcanzan el detector en un instante dado,
- 65 - calcular la relación entre masa y carga [m/z] de las moléculas detectadas, de manera que se obtenga una

señal que corresponde al número de moléculas ionizadas de una misma relación entre masa y carga [m/z], en función de la relación m/z de las moléculas detectadas.

5 En general, el cálculo de la relación m/z se obtiene, teniendo en cuenta una calibración previa del espectrómetro de masa utilizado, en forma de una ecuación que une la relación entre masa y carga [m/z] y el tiempo de recorrido en el tubo bajo presión reducida de las moléculas ionizadas.

10 La calibración consiste en utilizar una molécula o un microorganismo (según la caracterización) que proporcionará unas moléculas ionizadas que cubren el intervalo de masa que corresponde a la caracterización considerada. Las relaciones m/z de estas moléculas ionizadas servirán de estándares, con el fin de permitir que el aparellaje mida las masas de manera adecuada.

15 Para la identificación del microorganismo, la calibración podrá ser realizada a partir de una cepa de bacterias que poseen unas moléculas ionizadas que tienen unas relaciones m/z que cubren el intervalo de masas utilizadas para la identificación (típicamente en intervalo comprendido entre 2000 y 20000 Da en el caso de las levaduras, mohos, bacterias o parásitos). Para detectar las señales que corresponden al agente antimicrobiano, la calibración podrá ser realizada a partir de una muestra de péptidos de pequeñas masas. En el marco de la invención, se podrá utilizar, por ejemplo, el calibrador pepMIX 6 (LaserBio Labs) que cubre un intervalo de masa de 350 a 1000 Daltons.

20 Cualquier tipo de espectrómetro de masa MALDI-TOF puede ser utilizado para la elaboración del espectro de masas. Unos espectrómetros de este tipo comprenden:

- 25 i) una fuente de ionización (en general un láser UV), destinada a ionizar la mezcla población de microorganismo(s)/agente antimicrobiano/matriz;
- ii) un acelerador de las moléculas ionizadas mediante la aplicación de una diferencia de potencial;
- 30 iii) un tubo bajo presión reducida en el que se desplazan las moléculas ionizadas y aceleradas;
- iv) un analizado de masa destinado a separar los iones moleculares formados, en función de su proporción entre masa y carga (m/z);
- 35 v) un detector destinado a medir la señal producida directamente por los iones moleculares.

En el marco de la invención, el análisis mediante MALDI-TOF es, preferentemente, un análisis mediante MALDI-TOF simple, aunque un análisis mediante MALDI-TOF no esté excluido. Un análisis mediante MALDI-TOF, aunque mucho más complejo, se podrá considerar en particular para mejorar la sensibilidad de detección, en algunos casos y utilizará un aparellaje adaptado para dicho análisis.

#### 40 Detección de una resistencia a un agente antimicrobiano

45 Por "resistencia" se entiende un fenómeno según el cual un microorganismo no presenta una disminución de su viabilidad, o una disminución de su crecimiento o de su reproducción, cuando está expuesto a una concentración de un agente antimicrobiano que se reconoce que es eficaz frente a dicho microorganismo en ausencia de resistencia.

50 La identificación de un mecanismo de resistencia, a partir del espectro de masas obtenido para una zona de caracterización considerada, se puede llevar a cabo mediante la detección, sobre el espectro de masas obtenido, de un pico de masa dado, o de un cambio de pico de masa con respecto a un espectro de masas de referencia, en particular, con respecto al espectro de masas del agente antimicrobiano presente a nivel de dicha zona de caracterización.

55 En el marco de la invención, se ha demostrado que la realización de una espectrometría de masas mediante MALDI-TOF directamente sobre un microorganismo en presencia de un agente antimicrobiano permitía detectar las moléculas de interés pertinentes para la determinación de una resistencia a dicho agente antimicrobiano. La determinación de la resistencia eventual de una población de un microorganismo podrá comprender por lo tanto las etapas siguientes:

- 60 a1) disponer de un espectro de masas de referencia, por ejemplo, para el agente antimicrobiano y/o para sus productos de degradación;
- estos productos de degradación procederán del fenómeno de resistencia y se deberán en particular a la presencia de una enzima de degradación,
- 65 b1) someter a la población de microorganismo(s) y al agente antimicrobiano depositados sobre la zona de

análisis y puestos en presencia de la matriz (que corresponde a una zona de caracterización según la invención), a una ionización,

5 c1) adquirir un espectro de masas obtenido tras esta ionización, en el intervalo de masa de interés para la determinación de la resistencia,

d1) comparar el espectro de masas obtenido en la etapa c1) con el espectro de referencia y deducir la presencia o no de una resistencia.

10 En la etapa d1) por ejemplo, si sobre el espectro de masas obtenido en la etapa c1), ha(n) desaparecido el o los pico(s) de masa característico(s) del agente antimicrobiano y/o si está(n) presente(s) uno o unos pico(s) de masa característico(s) de uno o varios productos de degradación del agente antimicrobiano, se deduce de ello la presencia de un microorganismo resistente al agente antimicrobiano. La interpretación podrá ser realizada, por ejemplo, a partir de la relación de intensidad entre un pico de masa característico del agente antimicrobiano o de uno de sus productos de degradación y un pico de masa característico de un calibrador externo o a partir de la relación de intensidad entre un pico de masa característico del agente antimicrobiano y un pico de masa característico de un producto de degradación del agente antimicrobiano.

15 Será posible asimismo comparar el nivel de intensidad entre el o los picos de masa característico(s) del agente antimicrobiano o el o los pico(s) de masa característico(s) de uno o varios productos de degradación del agente antimicrobiano y uno o varios picos de referencia de un compuesto presente que no está sometido a las variaciones inducidas por la actividad biológica/enzimática a ensayar. Se podrán considerar, por ejemplo, como picos de referencia, uno o varios picos de la matriz MALDI, uno o varios picos de un péptido o de una molécula de referencia añadido(a) a la matriz o previamente secado(a) sobre la zona de análisis, uno o varios picos que correspondieran a una molécula del microorganismo presente (por ejemplo, un metabolito) que estaría todavía presente y sería invariable en varias especies.

20 En el caso de la determinación de la resistencia, se realiza una calibración en un intervalo de masa que corresponde a unas masas bajas, típicamente en el intervalo comprendido entre 200 y 1200 Da, y preferentemente en el intervalo comprendido entre 200 y 600 Da. El espectro de masas obtenido en la etapa c1) también está comprendido en este intervalo de masas. Para realizar esta calibración, se podrán depositar por ejemplo 2 microlitros de una solución calibradora compuesta por una mezcla de péptidos (pepMIX6), LaserBio Labs) y por matriz HCCA, el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, sobre una zona de análisis de referencia. Previamente a la ionización de las zonas de caracterización, se realizará una ionización del calibrador sobre esta zona de análisis de referencia. Las relaciones m/z de las moléculas ionizadas del calibrador servirán entonces de estándares con el fin de permitir que el aparellaje mida las masas de manera adecuada.

30 El procedimiento según la invención podrá en particular ser llevado a cabo para detectar una resistencia debida a la capacidad de un microorganismo para segregar una enzima conocida porque degrada los antibióticos del tipo beta-lactaminas, y en particular seleccionadas de entre las penicilinasas, las cefalosporinasas, las cefamicinasas, las carbapenemasas. La invención está adaptada asimismo a la detección de otros fenómenos de resistencia basados en una degradación o una modificación enzimática que provoca un cambio de masa del agente antimicrobiano. A título de ejemplo, se pueden citar unos mecanismos de resistencia tales como la degradación de los macrólidos por unas esterasas o la degradación de la fosfomicina por las epoxidasas, la acetilación de los aminósidos, del cloranfenicol o también de las estreptograminas, la fosforilación de los aminoósidos, de los macrólidos, de la rifampicina y de los antibióticos peptídicos, la hidroxilación de la tetraciclina, la adenilación de los aminósidos y de las lincosamidas, la ADP-ribosilación de la rifampicina, y la glicosilación de los macrólidos y de la rifampicina.

40 El término "producto de degradación" incluye cualquier producto que corresponde a una modificación de la estructura química del agente antimicrobiano, debido a la acción del microorganismo presente. Puede tratarse, asimismo, además de los mecanismos de degradación y de modificación enzimática mencionados anteriormente, de la adición de un grupo detectable en MALDI-TOF que inactive el agente antimicrobiano o que le impida fijarse sobre su diana.

50 Un procedimiento de detección de la resistencia de este tipo podrá ser llevado a cabo con unas placas MALDI previamente funcionalizadas, recurriendo a los dispositivos MALDI-TOF disponibles en el comercio. Sólo deberán ser adaptadas la calibración y la etapa de interpretación para permitir la detección de la resistencia. La detección de la resistencia a los agentes antimicrobianos, y en particular a un antibiótico dado, cuya determinación rápida en rutina puede ser vital en numerosos casos clínicos, es posible ahora en el marco de la invención.

60 El procedimiento de caracterización según la invención, que permite la identificación de la presencia de un microorganismo resistente a los antibióticos, en un tiempo muy corto, presenta un interés muy particular para realizar un diagnóstico rápido. Es en particular el caso para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasa (CPE). El procedimiento según la invención permitirá realizar unos ensayos rápidos en medio hospitalario, con el fin de adaptar rápidamente el tratamiento antibiótico administrado.

Identificación de un microorganismo

5 Los microorganismos que pueden ser identificados mediante el procedimiento de la invención son cualquier tipo de microorganismos, patógenos o no, encontrados tanto en la industria como en la clínica, que pueden conocer unos fenómenos de resistencia a los agentes antimicrobianos. Pueden ser, preferentemente, unas bacterias, unos mohos, unas levaduras o unos parásitos. La invención está particularmente adaptada para el estudio de las bacterias. A título de ejemplo de dichos microorganismos, se pueden citar las bacterias gram positivas, gram negativas y las *Mycobacteria*. A título de ejemplo de bacterias gram negativas, se pueden citar los géneros:

10 *Pseudomonas*, *Escherkhia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Gimbacter*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas*, *Morganella*, *Enterococcus* y *Providencia*, et notamment *Escherichia coll*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Comamonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Morganella morgani*, *Enterococcus sp.*, *Proteus mirabilis*, *Saimonella senftenberg*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* etc. A título de ejemplo de bacterias gram positivas, se pueden citar las de los géneros: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* y *Clostridium*.

20 Unos espectros de referencia obtenidos mediante MALDI-TOF para dichos microorganismos que corresponden a sus proteínas mayoritarias, están disponibles y registrados en unas bases de datos disponibles con los aparatos MALDI-TOF comerciales, y permiten, por comparación, la identificación de la presencia de estos microorganismos.

25 La identificación de una población de un microorganismo presente podrá por lo tanto comprender las etapas siguientes:

- A2) disponer de un espectro de masas de referencia, para por lo menos un microorganismo y lo más frecuentemente para una serie de microorganismos,
- 30 B2) someter a la población de microorganismo(s) y al agente antimicrobiano depositados sobre la zona de análisis y puestos en presencia de la matriz (que corresponde a una zona de caracterización según la invención), a una ionización,
- c2) adquirir un espectro de masas obtenido tras esta ionización, en el intervalo de masa de interés para la identificación del microorganismo,
- 35 d2) comparar el espectro de masas obtenido en la etapa c2) con el espectro de referencia y deducir de ello la familia, el género o, preferentemente, la especie de por lo menos un microorganismo.

40 En el caso de la identificación de microorganismos, se realiza una calibración en un intervalo de masa que corresponde a unas masas elevadas, típicamente en el intervalo comprendido entre 2000 y 2000 Da, y preferentemente en el intervalo comprendido entre 3000 y 17000 Da. El espectro de masas obtenido en la etapa c2) está comprendido también en este intervalo de masas.

45 La calibración podrá ser efectuada colocando una población de un microorganismo de referencia en una zona de análisis de referencia presente en la placa y procediendo a su análisis mediante MALDI-TOF. Dicho microorganismo de referencia podrá ser, por ejemplo, una bacteria *E. Coli*. Para esta calibración, se podrán utilizar los procedimientos descritos para la realización de la identificación estándar de microorganismos, en los manuales de utilización de los aparellajes MALDI-TOF comerciales, tales como el aparellaje VITEK® MS comercializado por la compañía bioMérieux.

50

Es posible utilizar dos zonas de análisis de referencia para la calibración: una para la identificación del microorganismo y otra para la caracterización de la resistencia. Es posible utilizar asimismo la misma zona de referencia para realizar las dos calibraciones. En tal caso, la zona de referencia estará funcionalizada con el agente antimicrobiano para el cual se debe estudiar la resistencia.

55

En el marco de la invención, de manera preferida, pero no obligatoria, cuando se realicen dos caracterizaciones: detección de la resistencia e identificación de un microorganismo, la detección de la resistencia se realizará después, es decir que las etapas de ionización y de análisis necesarias para esta detección de la resistencia serán llevadas a cabo sobre la zona de caracterizaciones después de las necesarias para la identificación del microorganismo.

60

Cuando se efectúan dos caracterizaciones de una misma zona de caracterización, se pueden llevar a cabo sin retirar la placa de análisis del espectrómetro de masas utilizado para el análisis MALDI-TOF. Esta doble caracterización podrá por lo tanto comprender las etapas siguientes:

65

- a3) disponer de un espectro de masas de referencia 1 para por lo menos un microorganismo y lo más frecuentemente para una serie de microorganismos, así como un espectro de masas de referencia 2 para el agente antimicrobiano y/o para estos productos de degradación,
- 5 b3) efectuar una calibración del espectrómetro de masas utilizado gracias al calibrador utilizado para la identificación y que ha sido depositado previamente sobre la zona de análisis de referencia,
- c3) someter a la población de microorganismo(s) y al agente antimicrobiano depositados sobre la zona de análisis y puestos en presencia de la matriz (que corresponde a una zona de caracterización según la invención) a una ionización,
- 10 d3) adquirir un espectro de masas obtenido tras esta ionización, en el intervalo de masas de interés para la identificación del microorganismo,
- 15 e3) efectuar una segunda calibración del espectrómetro de masas utilizado gracias al calibrador utilizado para la detección de la resistencia y que ha sido depositado previamente sobre una zona de análisis de referencia,
- 20 f3) someter de nuevo a la población de microorganismo(s) y al agente antimicrobiano depositados sobre la zona de análisis y puestos en presencia de la matriz (que corresponde a una zona de caracterización según la invención) a una ionización,
- g3) adquirir un espectro de masas obtenido tras esta ionización, en el intervalo de masas de interés para la determinación de la resistencia,
- 25 h3) comparar el espectro de masas obtenido en la etapa d3) con el o los espectros de referencia 1 y deducir de ello la familia, el género o, preferentemente, la especie de por lo menos un microorganismo presente,
- 30 i3) comparar el espectro de masas obtenido en la etapa g3) con el espectro de referencia 2 y deducir de ello la presencia o no de una resistencia.

Las etapas c3) y f3) se realizan por lo tanto sobre la misma zona de caracterización y por lo tanto sobre la misma población de microorganismo(s), lo cual permite por lo tanto reducir las etapas de preparación y de manipulación.

35 En el marco de la invención, se utiliza la misma población de microorganismo(s) y un único depósito de esta última sobre una sola zona de análisis para conducir a una zona de caracterización sometida sucesivamente a dos ionizaciones que permiten obtener las dos caracterizaciones (caracterización de un fenómeno de resistencia de un microorganismo a un agente antimicrobiano e identificación de un microorganismo).

40 En efecto, se ha puesto en evidencia, de manera inesperada, que la presencia del agente antimicrobiano y la realización de una etapa de incubación previa, necesarias para la detección del fenómeno de resistencia, no molestaban en absoluto la posibilidad de identificación del microorganismo.

45 Las etapas de comparación h3) e i3) podrán ser llevadas a cabo al final del procedimiento o después de cada adquisición en cuestión.

De manera preferida, la población depositada corresponderá a una población de un solo microorganismo y las dos caracterizaciones: detección de la resistencia e identificación de un microorganismo, se referirán al mismo microorganismo.

50 En conclusión, la invención permite:

- la obtención rápida de informaciones a partir de una misma zona de caracterización, y en particular al mismo tiempo la caracterización de un fenómeno de resistencia a un agente antimicrobiano y la identificación de un microorganismo,
- 55 - una simplificación de los métodos de análisis mediante MALDI-TOF, sin preparación previa larga y fastidiosa de una muestra antes del depósito sobre placa MALDI para la caracterización de un fenómeno de resistencia a un agente antimicrobiano,
- 60 - un contacto óptimo directamente sobre la placa MALDI del microorganismo y del agente antimicrobiano, que tiene un impacto positivo en algunos casos sobre la sensibilidad de detección del fenómeno de resistencia,
- 65 - una reducción del tiempo y del coste en consumibles y en operaciones manuales para realizar la caracterización de un fenómeno de resistencia a un agente antimicrobiano, mediante MALDI-TOF,

- una mejor trazabilidad y una mejor gestión de las muestras a analizar, dado que no es necesaria ninguna incubación previa en presencia de un agente antimicrobiano antes de su depósito sobre placa MALDI.

5 Los ejemplos siguientes permiten ilustrar la invención, pero no tienen ningún carácter limitativo. Los análisis se efectuaron con el aparellaje VITEK<sup>®</sup> MS comercializado por la compañía bioMérieux. Los análisis se realizaron, en cada uno de los ejemplos siguientes, al final de la adquisición, Los espectros se adquirieron sobre todas las zonas de caracterización y después se analizaron:

- 10 - para la identificación, el análisis del espectro se ha realizado con la ayuda del motor de cálculo VITEK MS y de la base de datos V2.0.0 contenida en el programa Spectra Identifier Versión: 2.1.0,
- para la hidrólisis, los picos de los espectros se han visualizado con la ayuda del programa de adquisición Launchpad V2.8.

### 15 Ejemplo 1

Se llevaron a cabo unos experimentos previos para mostrar que era posible la detección mediante MALDI-TOF de picos de antibiótico de tipo beta-lactaminas después del depósito sobre una zona de análisis de una placa MALDI, con una gota de una solución que contiene el antibiótico mezclado con una matriz apropiada para la técnica MALDI. En el presente experimento, se ha tratado una zona de análisis de una placa MALDI (VITEK<sup>®</sup> MS disponible slides TO-430) con un antibiótico beta-lactamina y se ha ensayado para evaluar la capacidad del antibiótico para ser escindido por una beta-lactamasa. La ampicilina se utilizó como modelo de antibiótico beta-lactamina. El experimento se ha realizado realizando las etapas siguientes:

- 25 - se depositaron en forma de una gota 2 µl de una solución de ampicilina a 10 mg/ml en agua, sobre una zona de análisis de la placa MALDI. La placa ha sido incubada a 37°C, hasta que la gota esté completamente seca.
- 30 - se utilizaron 2 µl de una beta-lactamasa recombinante ( $\beta$ -lactamasa de *Pseudomonas aeruginosa*, Sigma-Aldrich Lote L6170-550UN. CAS: 9073-60-3) a 1 mg/ml en agua diluida en agua suplementada con zinc en forma de sulfato de zinc (0,76 mM) que favorece la actividad enzimática, se han depositado sobre la zona de análisis seca portadora de la ampicilina. Se ha realizado también en paralelo un control negativo, depositando sobre otra zona de análisis tratada de la misma manera que con la ampicilina, una gota de 2 µl de agua con 0,76 mM de zinc, pero sin enzima.
- 35 - para que la reacción enzimática tenga lugar, la placa se ha incubado a temperatura ambiente durante una hora.
- 40 - se ha depositado sobre las zonas de análisis que contienen ya la ampicilina con o sin beta-lactamasa recombinante 1 µl de una matriz HCCA, ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (VITEK MS matrice CHCA, bioMérieux Ref: 411071).
- 45 - se ha realizado un análisis con espectrómetro de masa MALDI-TOF con un aparellaje VITEK<sup>®</sup> MS, utilizando 2 µl de una mezcla de HCCA y de pepMIX 6 (comprado en LaserBio Labs) utilizada como calibrador, que se han depositado sobre una zona de análisis de referencia, para la calibración del aparellaje para las masas bajas. Esta mezcla se ha preparado añadiendo un volumen de pepMIX6 (10X) a 9 volúmenes de HCCA. La solución de pepMix6 (10X) se ha preparado en diluyente (ácido trifluoroacético al 0,01% en agua ultrapura), según las recomendaciones del proveedor. Los picos se adquirieron para un intervalo de masa baja comprendido entre 200 y 1200 Da y se ha estudiado la presencia de moléculas que corresponden a la molécula nativa de ampicilina o a sus subproductos de degradación tras la hidrólisis.

55 Todas las muestras se analizaron por duplicado sobre la placa.

La **figura 2** presenta los espectros de masas obtenidos y muestra que la ampicilina no es estable sobre la placa y que es degradada eficazmente por la beta-lactamasa después de la incubación. En efecto, en la **figura 2**, se observa un pico mayoritario a 368,09 m/z que corresponde a la forma hidrolizada de la ampicilina (masa calculada de la forma monosódica de la ampicilina que corresponde a 368,4 m/z) y una pérdida completa de la forma nativa a 372,09 m/z (masa calculada de la forma monosódica de la ampicilina que corresponde a 372,4 m/z) sobre el espectro de arriba que corresponde a la zona analizada con la beta-lactamasa. Por el contrario, para el control negativo (espectro de abajo), el pico mayoritario está a 372,09 m/z, lo cual corresponde a la forma nativa monosódica de la ampicilina. Se constata asimismo una ligera hidrólisis espontánea de la ampicilina en el control negativo. Esto demuestra que la reacción enzimática de hidrólisis de las beta-lactaminas puede ser detectada mediante la técnica MALDI-TOF, utilizando el procedimiento de preparación de la zona de

caracterización según la invención.

**Ejemplo 2**

5 Este ensayo se ha realizado para estudiar la degradación de la ampicilina por diferentes cepas de bacterias, después del depósito directo de colonias sobre unas zonas de análisis portadoras de ampicilina, después del depósito de una solución de esta última y del secado, como se ha descrito en el ejemplo 1.

10 Las cepas de bacterias y sus características se presentan en la **tabla 1** siguiente.

Tabla 1

Cepa de bacterias /n° de referencia	Especies	CMI* de ampicilina	Fenotipo	Factor de virulencia **
1	<i>K. pneumoniae</i>	32	resistente	-----
2	<i>E. coli</i>	>128	Resistente	Penicilinasas
3	<i>E. coli</i>	> 128	Resistente	TEM β-lactamasa
4	<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	Sensible	Sin β-lactamasa

\*CMI: concentración mínima inhibidora de la cepa  
 \*\*Factor de virulencia: corresponde a la enzima segregada conocida

15 Los ensayos se realizaron utilizando las etapas siguientes:

- se depositaron 2 µl de solución acuosa de ampicilina a 10 mg/ml, suplementada con zinc (0,76 mM), sobre las zonas de análisis de la placa MALDI (de acuerdo con la del ejemplo 1).
- La placa se incubó a 37°C, hasta que las gotas de la solución depositada se secaron completamente.
- Para cada cepa de bacterias, una proporción de colonia obtenida tras un crecimiento durante 24h sobre un medio gelosado se ha depositado por duplicado sobre unas zonas de análisis portadoras de la ampicilina. Se ha obtenido cada punto como se describe en el procedimiento VITEK® MS para la realización de identificación de microorganismos.
- La placa ha sido incubada a temperatura ambiente (20-25°C) durante una hora en una atmósfera húmeda. Para ello, se ha utilizado un recinto cerrado que contiene agua como cámara de incubación para la placa.
- Se añadió 1 µl de matriz de HCCA sobre las zonas de análisis portadoras, al mismo tiempo, del antibiótico y de las bacterias,
- Se ha realizado un análisis por espectro de masas MALDI-TOF con un aparellaje VITEK®, MS con puesta al vacío de la placa, una vez colocada en la cámara del aparellaje, llevando a cabo las dos etapas siguientes:
  - \* una primera adquisición del espectro de las zonas de caracterización, después de la calibración del aparellaje a partir de una zona de referencia portadora de una cepa *E. coli* (E-cal) depositada,
  - \* una segunda adquisición de las mismas zonas de caracterización, después de una calibración del aparellaje sobre las masas bajas con pepMIX 6, como calibrador; esta segunda adquisición ha sido realizada inmediatamente después de la primera, sin romper el vacío de la cámara, ni retirando la placa del aparellaje,
- Los datos se acumularon y se compararon con los contenidos en la base de datos para la identificación de la especie,
- Los picos se visualizaron para un intervalo de masas bajas para la detección de la forma nativa o hidrolizada del antibiótico.

50 Todas las muestras se analizaron por duplicado sobre la placa.

55 La **figura 3** presenta los espectros de masas obtenidos durante la segunda serie de adquisiciones y muestra que las cepas que resisten a la ampicilina han sido todas capaces de hidrolizar la ampicilina en las condiciones experimentales utilizadas, mientras que no se ha observado ninguna degradación de la ampicilina en el caso de la cepa *E. coli* ATCC 25922, conocida porque es sensible a la ampicilina. En efecto, después de la segunda adquisición en las masas bajas, se ha observado un pico mayoritario a 372,15 m/z que corresponde a la forma nativa de la ampicilina para la cepa sensible y el control negativo mientras que, para todas las cepas resistentes



a la ampicilina, el pico mayoritario estaba situado a 368,15 m/z que corresponde a la forma hidrolizada de la ampicilina y a la desaparición de la forma nativa.

Después de la primera adquisición y la obtención de los espectros correspondientes, todas las cepas de bacterias han podido ser identificadas con un nivel de confianza elevado.

Como se presenta en la **tabla 2** siguiente, se ha podido observar una identificación correcta de las bacterias mediante MALDI-TOF a partir de la primera serie de adquisiciones para todas las zonas de caracterización, con un nivel de confianza que varía de 99,9 a 100%, que muestra que las condiciones experimentales permiten discriminar también las diferentes especies.

Tabla 2

Cepa de bacterias /n° de referencia	Número de picos utilizados por la identificación	Especies	Probabilidad después de la comparación de los espectros de referencia
1	109	<i>K. pneumoniae</i>	99,9
1	93	<i>K. pneumonniae</i>	100
2	95	<i>E. coli</i>	100
2	103	<i>E. coli</i>	100
3	91	<i>E. coli</i>	99,9
3	101	<i>E. coli</i>	99,9
4	94	<i>E. coli</i>	99,9
4	112	<i>E. coli</i>	99,9

### 15 Ejemplo 3

Se llevaron a cabo otros ensayos para demostrar que eran posibles la identificación de especie y la detección de producción de carbapenemasa, a partir de una misma zona de caracterización. Para ello, se ha utilizado el faropenemo como modelo de antibiótico carbapenemo, y se ha utilizado un protocolo idéntico al utilizado en el ejemplo 2. Se ha preparado una solución de faropenemo con una concentración en faropenemo de 0,5 mg/ml.

Las cepas de bacterias utilizadas están detalladas en la **tabla 3** siguiente

Tabla 3

Cepa de bacterias/n° de referencia	Especies	Fenotipo	Factor de virulencia
5	<i>S. marcescens</i>	resistente	IMP-1 carbapenemasa
6	<i>E. coli</i> ATCC 25922	sensible	sin B-lactamasa

La **figura 4** presenta los espectros de masas obtenidos en la segunda serie de adquisiciones y muestra que la actividad carbapenemasa ha podido ser detectada mediante MALDI-TOF en estas condiciones gracias a la segunda serie de adquisiciones. Aunque las formas hidrolizadas del faropenemo no sean detectadas en este experimento, ha sido posible poner en evidencia la pérdida de las dos formas nativas del faropenemo, debido a la producción por las bacterias de carbapenemasa.

Después de la adquisición en las masas bajas, con la cepa sensible, se han observado un pico mayoritario a 308,13 m/z y un pico mayoritario a 330,13 m/z, que corresponden respectivamente a las dos formas nativas del faropenemo (que corresponden a unas masas calculadas de 308,3 y 330,3 m/z). Estos dos picos se perdieron en el caso en el que el faropenemo se había sido incubado con la cepa *S. marcescens* que produce la carbapenemasa IMP-1,

Después de la primera adquisición y la obtención de los espectros, las dos cepas han podido ser correctamente identificadas con un elevado nivel confianza. De manera similar al ejemplo 2, la presencia de faropenemo en las zonas de caracterización no ha afectado a la capacidad de identificación de la especie mediante MALDI-TOF y la posibilidad de discriminar las bacterias de tipo *E. coli* de las bacterias de tipo *marcescens*, como lo muestran los resultados obtenidos con la primera serie de adquisiciones, presentados en la **tabla 4**.

Tabla 4

Cepa de bacterias /n° de referencia	Número de picos utilizados por la identificación	Especies	Probabilidad después de la comparación de los espectros de referencia
5	100	<i>S. marcescens</i>	99,9
5	113	<i>S. marcescens</i>	99,9

6	1 09	<i>E. coli</i>	99,9
6	101	<i>E. coli</i>	99,9

#### Ejemplo 4

Este ensayo se ha realizado para aumentar la adherencia del antibiótico sobre la zona de análisis de la placa MALDI. En efecto, el secado de una solución de antibiótico depositada sobre la placa conduce a la formación de una película que se adhiere débilmente a la superficie. Se ha utilizado la heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina (Heptakis, Sigma-Aldrich Ref H0513) para pegar el faropenemo a la superficie de la placa MALDI. Además de sus propiedades de adherencia, la elección del heptakis ha estado motivada por su peso molecular de 1331,36 g.mol<sup>-1</sup> que no interfiere con los picos de masa del faropenemo o de sus productos hidrolizados. Durante este experimento, se han ensayado dos proporciones másicas [Heptakis]/[faropenemo] para evaluar la adherencia del faropenemo seco y el impacto del heptakis sobre la detección de los picos nativos e hidrolizados del faropenemo.

Las cepas de bacterias utilizadas son detalladas en la **tabla 5** siguiente.

Tabla 5

Cepa de bacterias/N° de referencia	Especies	Fenotipo	Factor de virulencia
7	<i>K. pneumoniae</i>	resistente	KPC carbapenemasa
8	<i>E. coli</i> ATCC 25922	sensible	sin $\beta$ -lactamasa (salvaje)

Se realizaron los ensayos llevando a cabo las etapas siguientes:

- se prepararon 2 soluciones que contienen una mezcla de Heptakis y de faropenemo y 1 solución de faropenemo sin Heptakis en un tampón NaCl (0,45%) suplementado con zinc (sulfato de zinc 0,76 mM). Las concentraciones finales en Heptakis y faropenemo de estas soluciones son las siguientes:
  - o 0 mg/ml de heptakis y 1 mg/ml de faropenemo,
  - o 0,1 mg/ml de heptakis y 1 mg/ml de faropenemo (proporción másica 1:10),
  - o 0,2 mg/ml de heptakis y 1 mg/ml de faropenemo (proporción másica 1:5),
- se depositaron 2  $\mu$ l de cada solución sobre las zonas de análisis de la placa MALDI (de acuerdo con la del ejemplo 1),
- se incubó la placa a temperatura ambiente hasta que las gotas de la solución depositada se secaron completamente,
- para evaluar la adherencia, se raspó cada zona de análisis funcionalizada con el faropenemo o la mezcla Heptakis/faropenemo con la ayuda de una oese para imitar el depósito de una colonia y se tomó una fotografía de la lámina,
- para evaluar el efecto de la concentración en Heptakis sobre la detección de los picos del faropenemo, se depositó una porción de la colonia obtenida tras un crecimiento durante 24 h sobre un medio gelosado, por cuadruplicado sobre unas zonas de análisis portadoras de faropenemo solo o de mezclas de faropenemo y de Heptakis,
- la placa se incubó a 37°C durante 2 h en una atmósfera húmeda,
- se añadió 1  $\mu$ l de una matriz de HCCA sobre las zonas de análisis portadoras, al mismo tiempo, del antibiótico o de las mezclas Heptakis/antibiótico y de las bacterias,
- se realizó un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF con un aparellaje VITEK® MS, para una adquisición de espectros en las masas bajas,
- se visualizaron los picos de la forma nativa a 308,3 m/z (faropenemo + Na) e hidrolizada a 304,3 m/z (faropenemo hidrolizado + H) del faropenemo, así como el pico de HCCA a 212,03 m/z,
- para todas las condiciones ensayadas, se registraron las intensidades de los 3 picos y se calcularon las proporciones 308/212 y 304/212. Se utilizó el pico de HCCA a 212 m/z en este caso como un pico control de intensidad invariable.

Se analizaron todas las muestras por cuadruplicado sobre la placa.

La **Figura 5** muestra el aspecto de las zonas de análisis (puntos) antes y después del raspado con una oese. La foto pone en evidencia un buen esparcimiento, después del raspado, de la mezcla Heptakis/faropenemo sobre toda la superficie del punto para unas proporciones [Heptakis]/[faropenemo] de 1/10 y 1/5, con una buena estabilidad después del raspado. El antibiótico secado sin Heptakis no es muy estable sobre la superficie de la lámina y la película se desengancha total o parcialmente cuando tiene lugar el raspado por la oese.

La **Figura 6** muestra la variación de las proporciones de intensidades de los picos del faropenemo nativo y del faropenemo hidrolizado, con respecto al pico control de HCCA en función de las proporciones [Heptakis]/[faropenemo] utilizadas cuando tiene lugar el secado del antibiótico sobre la lámina. Los valores representan la media de cuatro puntos. Para unas proporciones de 1/10 y 1/5, la detección es comparable con la condición sin Heptakis con una ventaja suplementaria de reproductibilidad en presencia de Heptakis. En efecto, la fuerte variabilidad observada en ausencia de Heptakis (barra de error importante) se debe a la pérdida total o parcial del antibiótico sobre algunos puntos cuando tiene lugar el depósito de la colonia. En lo que se refiere a la aparición del pico hidrolizado después de una incubación con la cepa productora de carbapenemasa de tipo KPC, se observa el mismo fenómeno, es decir una buena detección con unas proporciones [Heptakis]/[faropenemo] de 1/10 y 1/5.

Los resultados de este experimento muestran que la utilización de Heptakis a unas concentraciones adaptadas (0,1 o 0,2 mg/ml para 1 mg/ml de faropenemo) permite estabilizar el antibiótico sobre la lámina para el almacenamiento asegurando al mismo tiempo una mezcla óptima con la bacteria cuando tiene lugar el depósito de la colonia. A estas mismas concentraciones, el Heptakis permite mejorar la reproductibilidad de los resultados entre los puntos y no interfiere con la detección de los picos o también con la reacción de hidrólisis del faropenemo,

#### Ejemplo 5

Este ensayo se llevó a cabo para evaluar la posibilidad de realizar la reacción de hidrólisis sobre la zona de análisis funcionalizada de la placa MALDI a partir de un depósito líquido, es decir un inóculo bacteriano. En efecto, la dificultad encontrada cuando tiene lugar el depósito en colonia es la falta de normalización con respecto a la cantidad de microorganismos depositados y de la variabilidad del depósito según el manipulador. Así, el depósito de una colonia sobre lámina para una aplicación de identificación clásica en MALDI-TOF necesita una formación técnica que no elimina completamente el riesgo de variabilidad de los resultados debido a unos depósitos heterogéneos. Por eso, se aplicó un inóculo bacteriano de concentración conocida sobre las zonas de análisis funcionalizadas de la placa MALDI.

Las cepas de bacterias utilizadas están detalladas en la **Tabla 5** anterior.

Se realizaron los ensayos llevando a cabo las etapas siguientes:

- se depositaron 2 µl de una solución de faropenemo a 1 mg/ml preparado en un tampón NaCl (0,45%) suplementado con zinc (sulfato de zinc 0,76 mM) sobre las zonas de análisis de la placa MALDI y se secaron a temperatura ambiente,
- se aplicaron 2 µl de inóculos bacterianos a unas concentraciones de 3 o 6 McFarland por cuadruplicado sobre las zonas de análisis funcionalizadas,
- se incubó la placa a 37°C durante 2 h en una atmósfera húmeda,
- se añadió 1 µl de una matriz de HCCA sobre las zonas de análisis portadoras, al mismo tiempo, del antibiótico y de las bacterias,
- se realizó un análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF con un aparellaje VITEK® MS, para una doble adquisición de espectros en las masas bajas para observar los picos del faropenemo y en las masas altas para la identificación (de acuerdo con el ejemplo 2),
- se visualizaron los picos de las formas nativas a 308.3 m/z (faropenemo + Na) y a 330.3 m/z (faropenemo + 2Na) así como el pico de la forma hidrolizada a 304.3 m/z (faropenemo hidrolizado + H),
- para todas las condiciones ensayadas, se registraron las intensidades de los 3 picos y se calcularon las proporciones 304/308 y 304/330 para cuantificar la hidrólisis del faropenemo.

Todas las muestras se analizaron por cuadruplicado sobre la placa.

La **Figura 7** presenta los espectros de masas obtenidos en la segunda serie de adquisiciones y muestra que la actividad carbapenemasa ha podido ser detectada mediante MALDI-TOF después de un depósito de inóculos bacterianos a 6 McFarland. En efecto, ha sido posible poner en evidencia la pérdida de las dos formas nativas y

la aparición de la forma hidrolizada del faropenemo, debida a la producción por las bacterias de carbapenemasa.

Después de la adquisición en las masas bajas, con la cepa sensible, se observó un pico mayoritario a 308,03 m/z y un pico minoritario a 330,02 m/z, que corresponden respectivamente a las dos formas nativas del faropenemo (que corresponden a unas masas calculadas de 308,3 y 330,3 m/z). Se han perdido estos dos picos en el caso en el que el faropenemo había sido incubado con la cepa *K. pneumoniae* que produce la carbapenemasa KPC y se observa la aparición de un pico a 304,06 m/z que corresponde a la forma hidrolizada del faropenemo (masa calculada de 304,03).

Después de la primera adquisición y la obtención de los espectros, se pudieron identificar correctamente las dos cepas con un alto nivel de confianza. La presencia de faropenemo en las zonas de caracterización y el depósito en inóculo no han afectado a la capacidad de identificación de la especie mediante MALDI-TOF y la posibilidad de discriminar las bacterias de tipo *E. coli* de las bacterias de tipo *K. pneumoniae*, como lo muestran los resultados obtenidos con la primera serie de adquisiciones, presentados en la **Tabla 6**.

**Tabla 6**

Cepa de bacterias/ N° de referencia	Número de picos utilizados por la identificación	Especies	Probabilidad después de la comparación de los espectros de referencia
7	177	<i>K. pneumoniae</i>	91,2
8	149	<i>E. coli</i>	93

La **Figura 8** muestra la variación de las proporciones de intensidades 304/308 y 304/330 en función de la concentración de inóculo utilizada para las 2 cepas ensayadas. Para la cepa salvaje que no hidroliza el antibiótico, no se ha observado ninguna variación significativa de las 2 proporciones, sea cual sea la concentración del inóculo bacteriano. Para la cepa productora de carbapenemasa de tipo KPC, se ha observado un aumento significativo de las 2 proporciones, que es proporcional a la concentración del inóculo. Este aumento de las proporciones se traduce por una disminución de intensidad de los picos nativos y un aumento de intensidad del pico hidrolizado tal como se representa en la **Figura 7**.

Los resultados de este experimento muestran que el depósito de inóculo también está adaptado a la reacción de hidrólisis sobre placa MALDI y a la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF. Además, las barras bajas de errores observados en una media de 4 depósitos sugieren una muy buena reproducibilidad de los resultados.

La **Figura 9** representa un modelo de caja que integra una placa MALDI que podría estar adaptado al depósito de una población de microorganismo en forma líquida. Una lámina placa MALDI cuyas zonas de análisis están ya recubiertas de antibiótico secado se coloca en una galería en el interior de la cual se han moldeado varias cúpulas (en número de 12 en el modelo presentado). Las 6 cúpulas alineadas sobre un mismo eje contienen un control de opacidad en forma deshidratada y las 6 otras cúpulas están vacías. La galería que contiene la lámina está colocada a su vez en un casete que tiene una tapa. Para las necesidades de almacenamiento, este casete puede ser embalado en particular de manera hermética, fuera de la luz y de la humedad.

El protocolo de utilización de este producto puede ser descrito por las etapas siguientes:

- retirar la tapa del casete,
- rellenar las 12 cúpulas con un volumen de 50 a 100 µl de agua o de tampón fisiológico. El rellenado de las 6 cúpulas que contienen el control de opacidad provoca la formación de soluciones turbias,
- preparar unos inóculos en las otras 6 cúpulas añadiendo una colonia o una porción de colonia de manera que se obtenga una turbidez comparable con el control de opacidad de la cúpula de enfrente,
- depositar 2 µl de cada inóculo sobre las zonas de análisis portadoras del antibiótico,
- añadir agua con la ayuda de una pipeta en el casete para crear una atmósfera húmeda,
- colocar de nuevo la tapa e incubar a 37°C durante 1 a 2 h (o menos),
- añadir 1 µl de una matriz de HCCA sobre las zonas de análisis portadoras, al mismo tiempo, del antibiótico y de las bacterias,
- recuperar la lámina para un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

La adición del control de opacidad permite evitar la preparación de inóculo utilizando un aparato de medición de

densidad o de turbidez y permite por lo tanto ganar tiempo. Por otro lado, los aparatos de medición utilizados habitualmente en rutina, tales como los densitómetros, están adaptados a unos volúmenes más importantes (de 1 a 3 ml) que necesitan por lo tanto la utilización de una cantidad más importante de bacterias.

5 La preparación del inóculo podría llevarse a cabo asimismo utilizando un extracto sólido o líquido de bacterias obtenidas directamente a partir de una muestra biológica (por ejemplo: bacterias extraídas de un hemocultivo).

El modelo presentado en la **Figura 9**, permite ensayar 6 cepas diferentes. Este modelo puede ser adaptado en función de la cantidad de cepas ensayadas en rutina, en particular aumentando el número de cúpulas.

10

**Referencias:**

15 Hooff, G. P., J. J. van Kampen, R. J. Meesters, A. van Belkum, W. H. Goessens y T. M. Luider (2012). "Characterization of beta-lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry." *J Proteome Res* 11(1): 79-84.

15

20 Hrabak, J., V. Studentova, R. Walkova, H. Zemlickova, V. Jakubu, E. Chudackova, M. Gniadkowski, Y. Pfeifer, J. D. Perry, K. Wilkinson y T. Bergerova (2012). "Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry." *J Clin Microbiol* 50(7): 2441-2443.

20

25 Hrabak, J., R. Walkova, V. Studentova, E. Chudackova y T. Bergerova (2011). "Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry." *J Clin Microbiol* 49(9): 3222-3227.

25

30 Sparbier, K., S. Schubert, U. Weller, C. Boogen y M. Kostrzewa (2012). "Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics." *J Clin Microbiol* 50(3): 927-937.

30

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de caracterización de una población de por lo menos un microorganismo, que comprende, aguas arriba de la caracterización, la preparación de una zona de caracterización de una placa de análisis para la realización de la por lo menos una caracterización según las etapas sucesivas siguientes:
- una etapa que consiste en disponer de una placa de análisis para una caracterización mediante la técnica MALDI, que comprende por lo menos una zona de análisis portadora de un agente antimicrobiano,
  - una etapa de depósito de la población de por lo menos un microorganismo sobre dicha zona de análisis en contacto con el agente antimicrobiano,
  - una etapa de incubación, que consiste en conservar la placa de análisis, en unas condiciones y durante un tiempo suficiente, para permitir la interacción del agente antimicrobiano y del microorganismo presente,
  - una etapa de depósito sobre la zona de análisis, de una matriz adaptada a la técnica MALDI,
- en el que, para la caracterización, la población de por lo menos un microorganismo depositada sobre la zona de caracterización es sometida, a continuación, a por lo menos una etapa de ionización por bombardeo de la zona de caracterización por un haz láser según la técnica de espectrometría de masas por desorción-ionización asistida por matriz denominada MALDI, comprendiendo dicha caracterización:
- la identificación de la familia, del género o, preferentemente, de la especie de una población de un microorganismo depositada sobre la zona de caracterización, que utiliza un primer análisis por espectrometría de masas de tipo MALDI que corresponde a una primera etapa de ionización de la zona de caracterización, y utilizando para el análisis una primera calibración, y
  - la determinación de la presencia eventual sobre la zona de caracterización de una población de un microorganismo resistente al agente antimicrobiano que utiliza un segundo análisis por espectrometría de masas según la técnica MALDI-TOF que corresponde a una segunda etapa de ionización de la misma zona de caracterización, y que utiliza para el análisis una segunda calibración.
2. Procedimiento de caracterización según la reivindicación 1, caracterizado por que se deposita una población de un solo microorganismo a caracterizar.
3. Procedimiento de caracterización según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que se prepara la población de microorganismo(s) depositada sin etapa de puesta en contacto previo con un agente antimicrobiano.
4. Procedimiento de caracterización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se obtiene la población de microorganismo(s) después de una etapa de concentración, enriquecimiento y/o purificación y/o corresponde a una colonia o a una fracción de colonia obtenida después del crecimiento sobre un medio adaptado, en particular un medio gelosado.
5. Procedimiento de caracterización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el agente antimicrobiano se selecciona de manera que permita la identificación de la resistencia debida a la producción de beta-lactamasa, y en particular de carbapenemasa.
6. Procedimiento de caracterización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el agente antimicrobiano es un antibiótico, seleccionado preferentemente de entre las penicilinas, las cefalosporinas, las cefamicinas, los carbapenemos, los monobactamos, y en particular de entre la ampicilina, la amoxicilina, la ticarcilina, la piperacilina, la cefalotina, la cefuroxima, la cefoxitina, la cefixima, la cefotaxima, la ceftazidima, la ceftriaxona, la cefpodoxima, la cefepima, el aztreonam, el ertapenemo, el imipenemo, el meropenemo y el faropenemo.
7. Procedimiento de caracterización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende una etapa de funcionalización que conduce a la obtención de la placa de análisis para una caracterización mediante la técnica MALDI, que comprende por lo menos una zona de análisis portadora de un agente antimicrobiano, siendo dicha etapa de funcionalización, preferentemente, realizada por depósito de una solución acuosa del agente antimicrobiano, seguido de un secado.
8. Procedimiento de caracterización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la o las zona(s) de análisis funcionalizada(s) es (son) portadora(s) de un solo agente antimicrobiano.
9. Procedimiento de caracterización según la reivindicación 1, caracterizado por que el análisis por espectrometría de masas según la técnica MALDI-TOF, que permite concluir si una población de un microorganismo resistente al agente antimicrobiano está presente en la zona de caracterización, consiste en

verificar la presencia del agente antimicrobiano y/o de un producto de degradación del agente antimicrobiano.

- 5 10. Procedimiento de caracterización según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que la identificación de la familia, del género o, preferentemente, de la especie de una población de un microorganismo, y la determinación de la resistencia eventual al agente antimicrobiano se refiere al mismo microorganismo.
- 10 11. Placa de análisis adaptada para ejecutar la caracterización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y adaptada para recibir una población de por lo menos un microorganismo a caracterizar sobre una zona de análisis por espectrometría de masa según la técnica MALDI, caracterizada por que comprende un agente antimicrobiano depositado, en forma de un depósito sólido, sobre dicha zona de análisis de la placa de análisis, formando una zona de análisis denominada funcionalizada.
- 15 12. Placa de análisis según la reivindicación 11, caracterizada por que la zona de análisis funcionalizada es obtenida por depósito de una solución acuosa del agente antimicrobiano, seguido de un secado, y/o por que el agente antimicrobiano es inmovilizado sobre la zona de análisis por unión electroestática, iónica, covalente, de afinidad o, preferentemente, gracias a un agente adhesivo, por ejemplo seleccionado de entre los polímeros solubles en agua.
- 20 13. Placa de análisis según la reivindicación 11 o 12, caracterizada por que la placa está formada por un polímero tal como el polipropileno, que puede contener un material conductor tal como el negro de carbón, estando dicho polímero recubierto por una capa de acero inoxidable.
- 25 14. Placa de análisis según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizada por que la placa comprende varias zonas de análisis funcionalizadas, siendo cada una portadora de un agente antimicrobiano, y en particular la placa comprende por lo menos una primera zona de análisis funcionalizada portadora de un primer agente antimicrobiano, y una segunda zona de análisis funcionalizada, distinta de la primera zona, portadora de un segundo agente antimicrobiano distinto del primer agente antimicrobiano.
- 30 15. Placa de análisis según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizada por que la o las zonas de análisis funcionalizada(s) es (son) portadora(s) de un solo agente antimicrobiano.
- 35 16. Placa de análisis según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizada por que comprende por lo menos una zona de análisis de referencia, destinada a recibir ulteriormente una población de un microorganismo de referencia, y por que la superficie de la zona de análisis de referencia está desprovista de agente antimicrobiano.
17. Placa de análisis según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, caracterizada por que está acondicionada en un embalaje hermético.

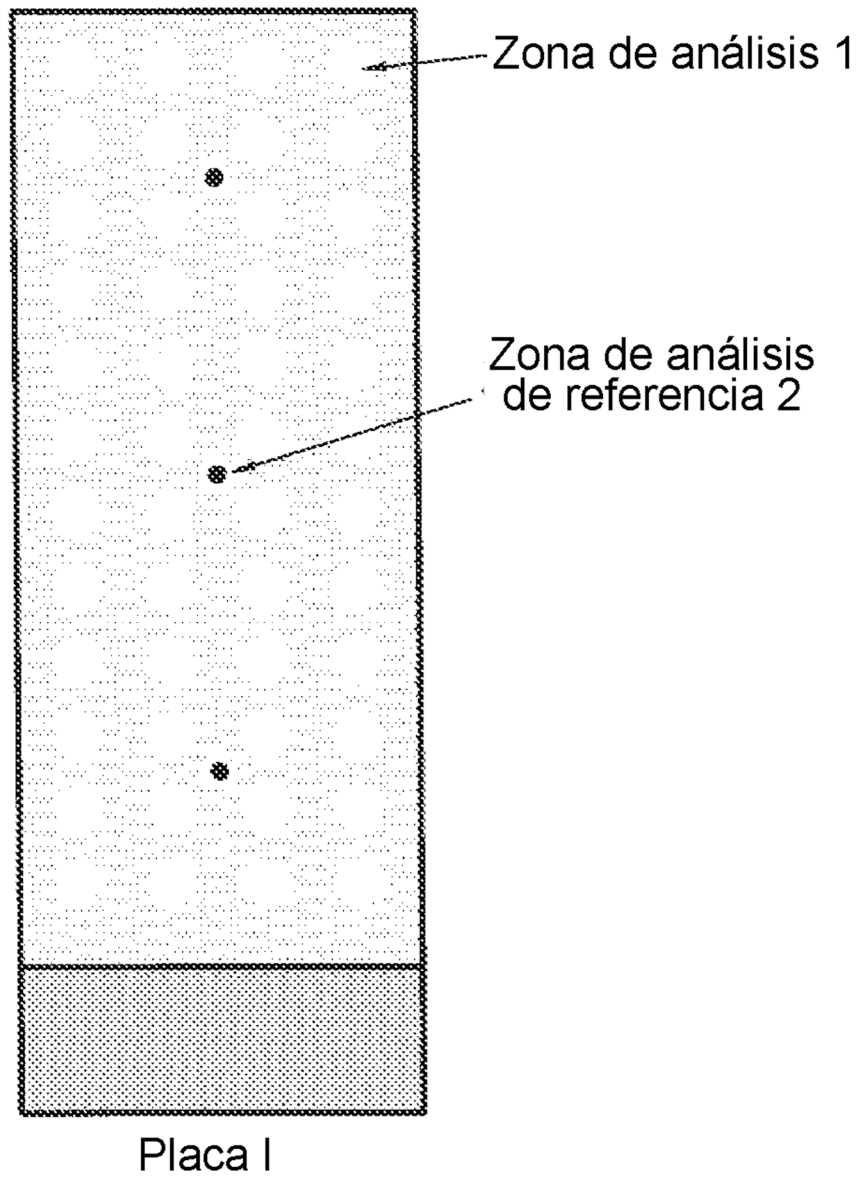


FIG.1



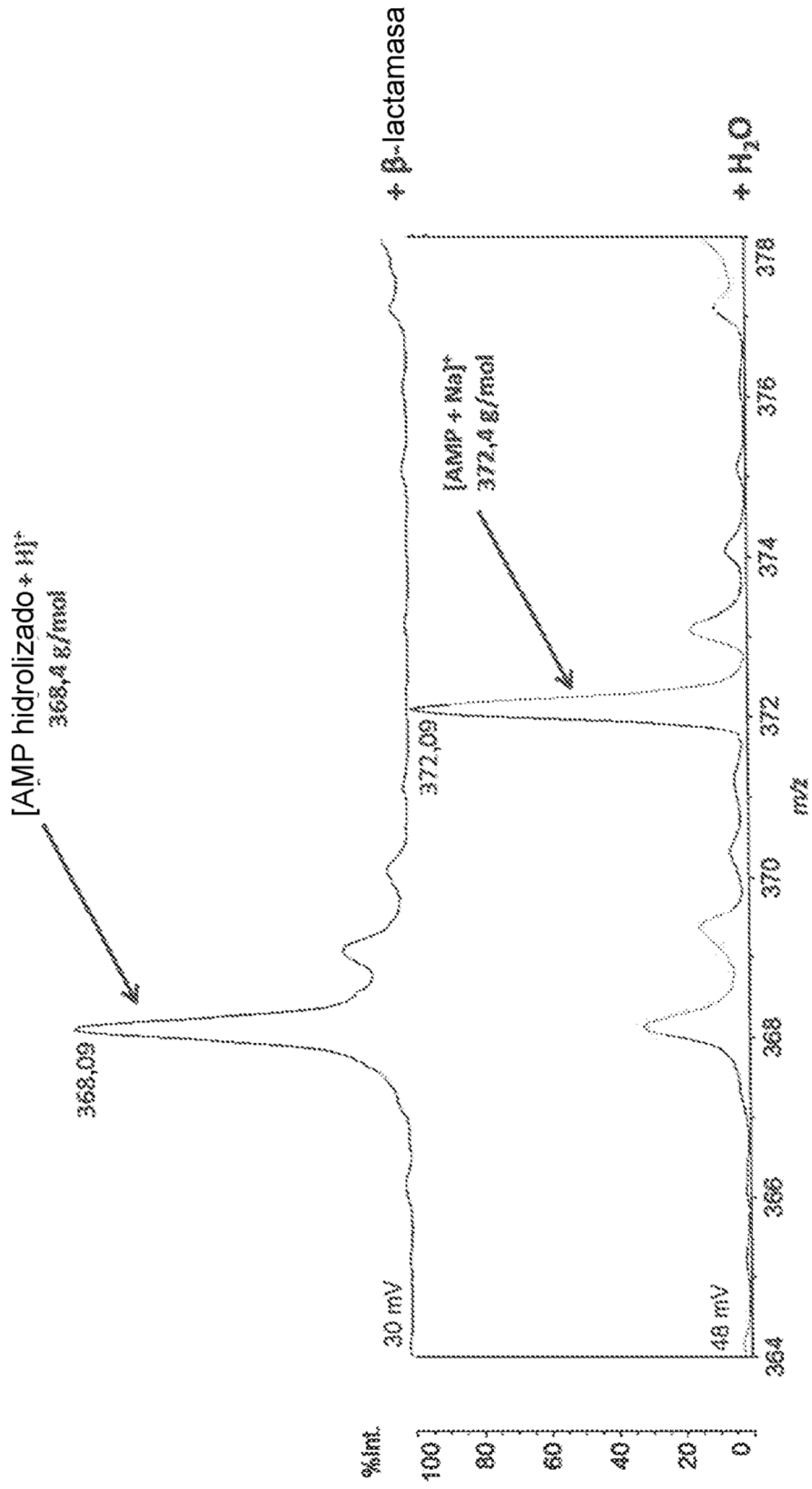


FIG.2

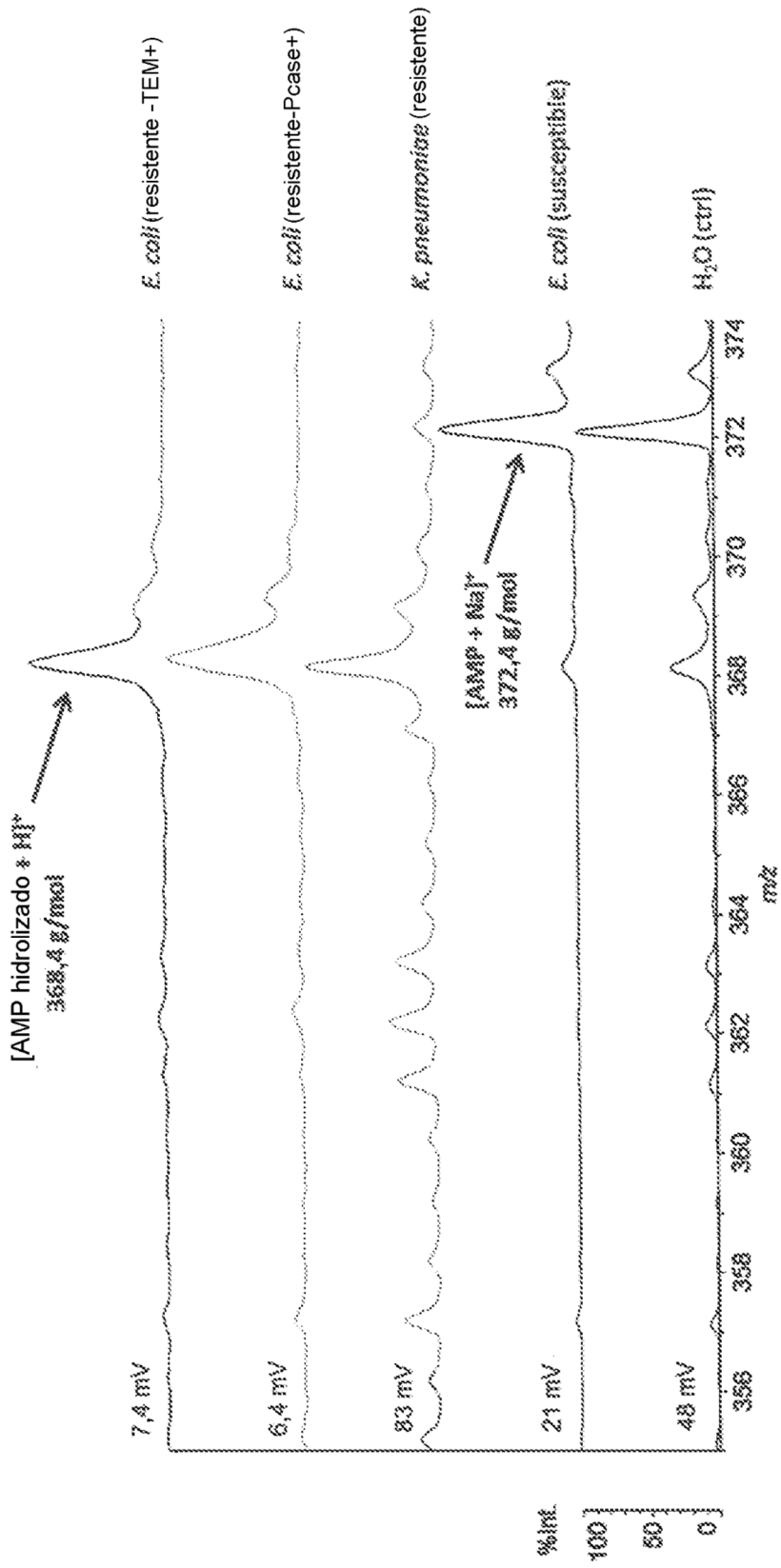


FIG.3

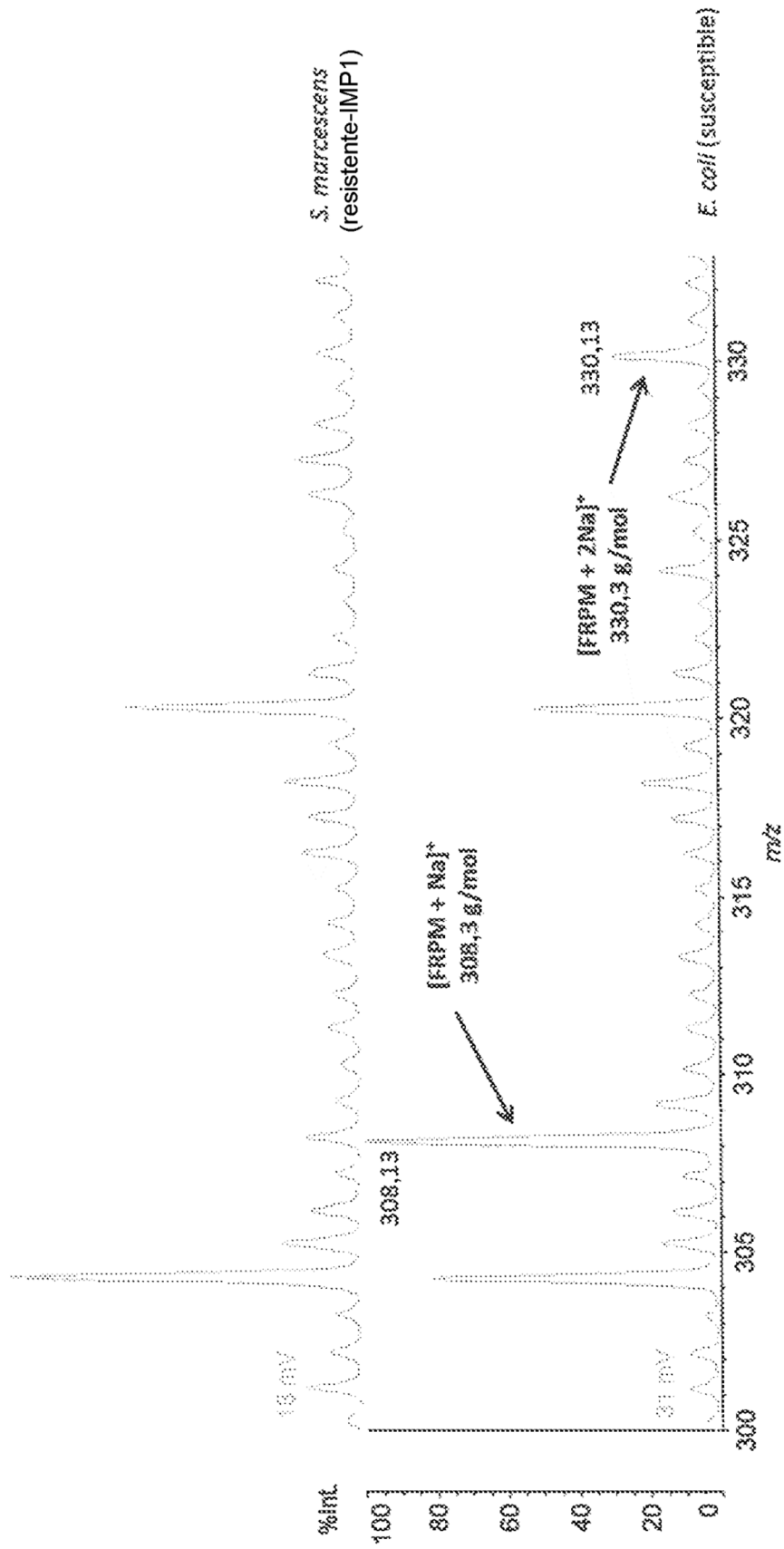


FIG.4

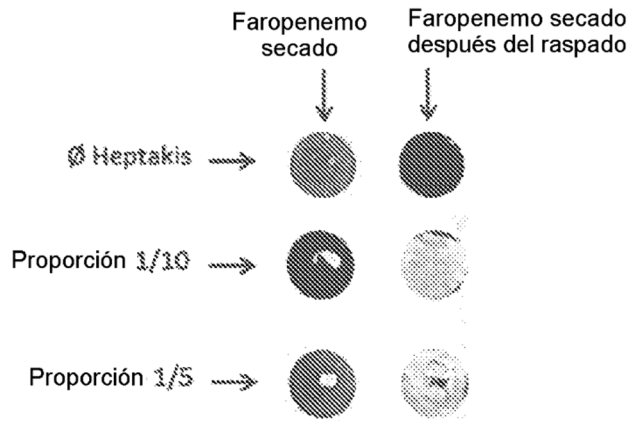


FIG.5

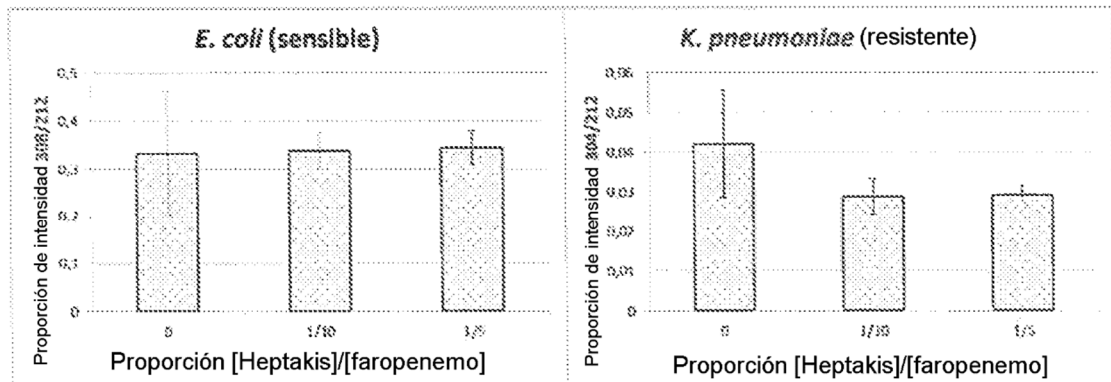


FIG.6

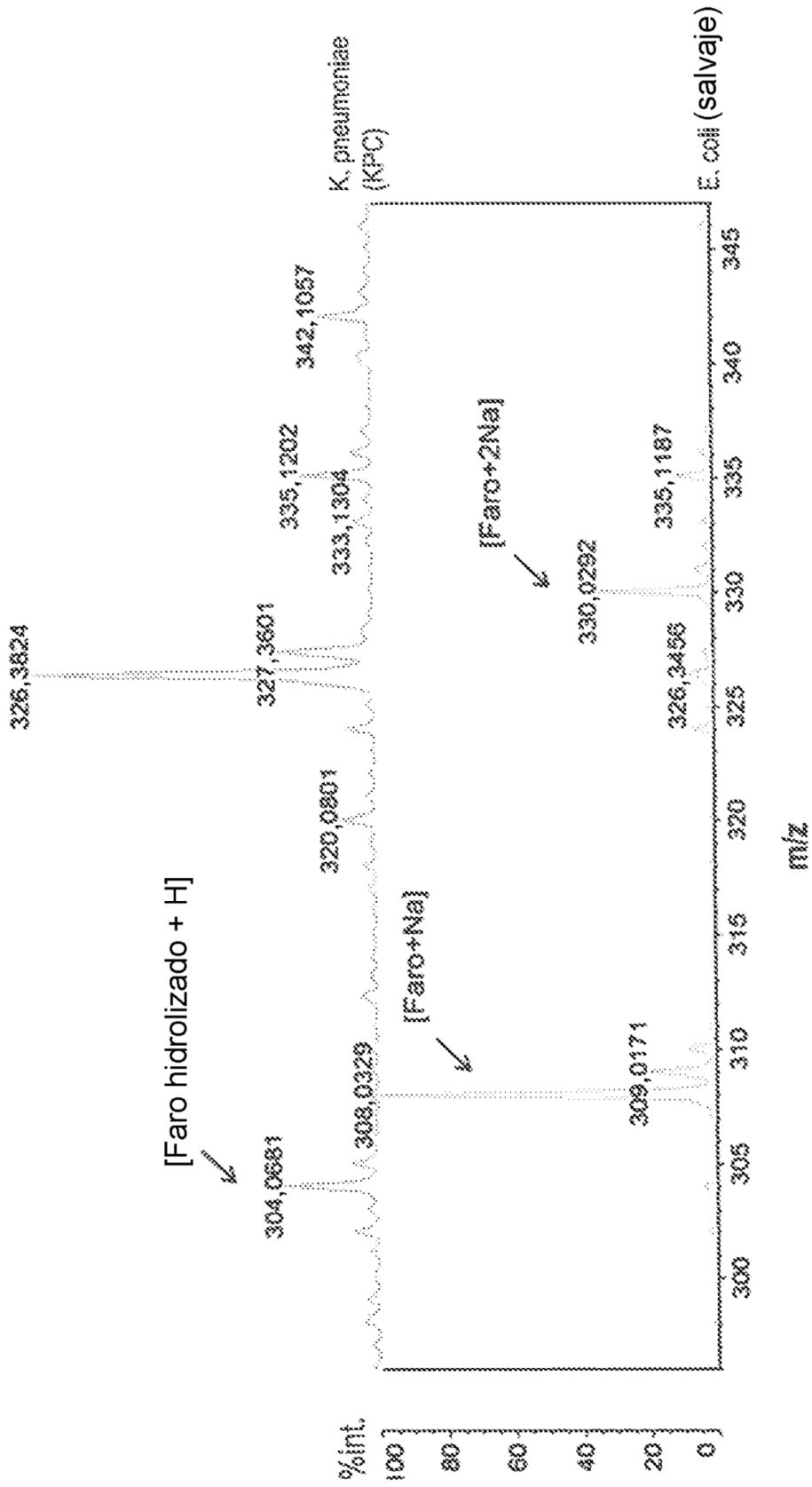


FIG.7

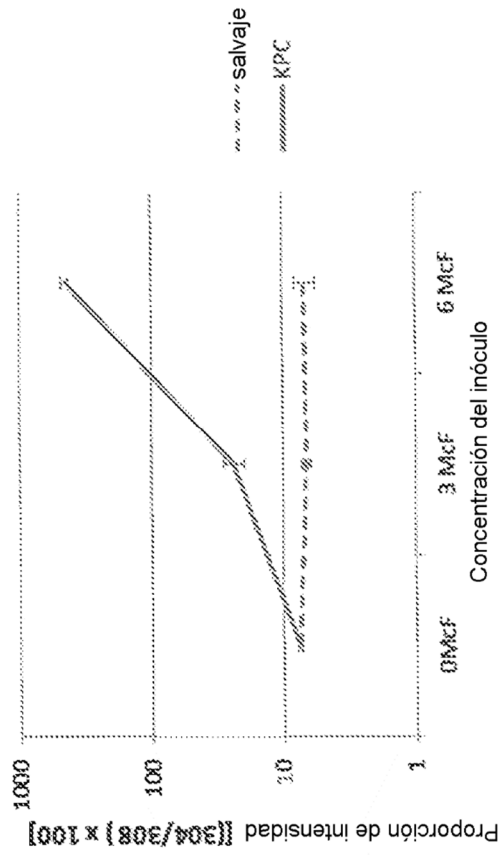
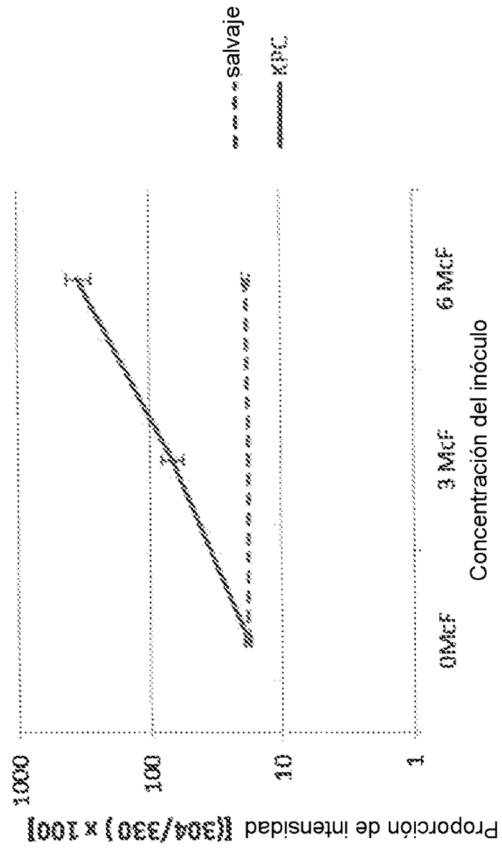


FIG.8

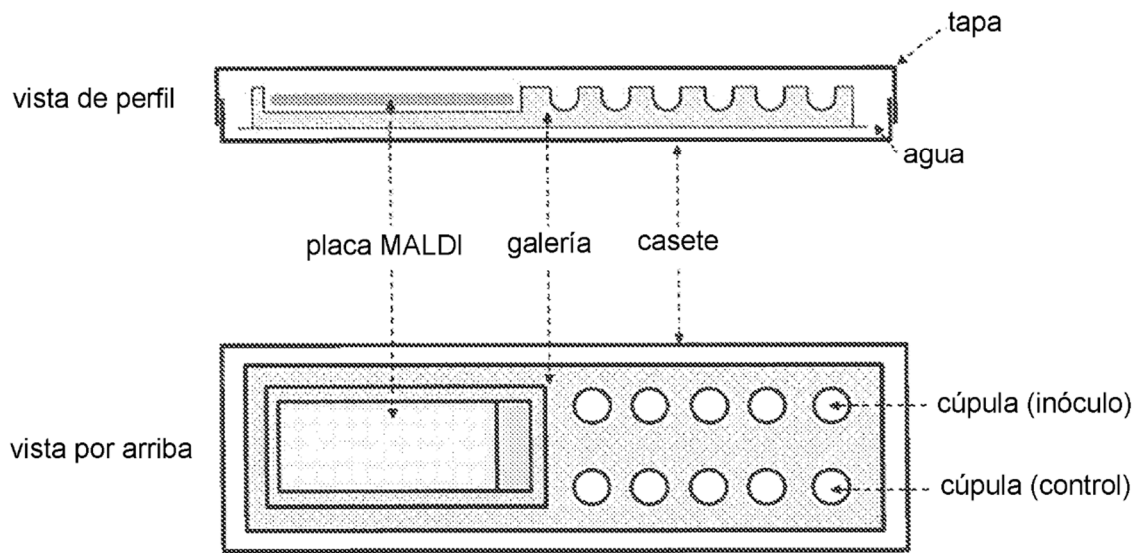


FIG.9