

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 581**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2016** **PCT/DE2016/100561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2018** **WO18099500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2016** **E 16822599 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3548895**

54 Título: **Preparación de muestras microbianas vivas y microorganismos para mediciones y evaluaciones posteriores por espectrometría de masas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2024

73 Titular/es:

BRUKER DALTONICS GMBH & CO. KG (100.0%)
Fahrenheitstraße 4
28359 Bremen, DE

72 Inventor/es:

IDLEVICH, EVGENY y
BECKER, KARSTEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 985 581 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

Preparación de muestras microbianas vivas y microorganismos para mediciones y evaluaciones posteriores por espectrometría de masas

Campo de invención

- 5 La invención se refiere a procedimientos para preparar muestras microbianas vivas y microorganismos para una medición y una evaluación posteriores por espectrometría de masas. Los conocimientos que pueden derivarse de una medición de este tipo pueden servir en particular para acelerar la identificación de microorganismos en la muestra microbiana según especies/subespecies y/o determinar rápidamente la resistencia/sensibilidad de los microorganismos a sustancias antimicrobianas y/o caracterizar adicionalmente microorganismos; por ejemplo, en
- 10 cuanto a patogenicidad, virulencia y metabolismo. Según un modo de realización preferido de la invención, la preparación tiene lugar en particular directamente sobre un soporte de muestra para espectrometría de masas.

Antecedentes de la invención

- 15 Las enfermedades infecciosas siguen representando un problema importante en la medicina. Las infecciones pueden aparecer de forma independiente, pero se desarrollan especialmente como complicaciones de otras enfermedades o como consecuencia de terapias inmunosupresoras y/o del uso de materiales de cuerpos extraños en el paciente. En los últimos años, el progreso de la medicina moderna y el consiguiente aumento de intervenciones complicadas y tratamientos inmunosupresores, así como el uso de cuerpos extraños, entre otras cosas, han sido responsables de un aumento de las tasas de infección. En este contexto se pueden mencionar, por ejemplo, los trasplantes de órganos sólidos y los trasplantes de médula ósea.

- 20 Es especialmente preocupante el aumento de patógenos multirresistentes; por ejemplo, en el caso de las bacterias (entre otros, MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; VRE - enterococos resistentes a vancomicina; *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ciprofloxacina, meropenem o tobramicina) o los hongos (entre otros, *Candida albicans* resistente a fluconazol o a voriconazol). Las infecciones causadas por estos patógenos son especialmente difíciles de tratar con antibióticos. Dado que los agentes antimicrobianos administrados inicialmente en el marco de una, así llamada, terapia "empírica" o "calculada" generalmente no detectan patógenos multirresistentes en su
- 25 espectro de actividad, es decisivo para el éxito del tratamiento detectar las resistencias en una etapa temprana. Una detección rápida de microorganismos resistentes posibilita un cambio oportuno a sustancias antimicrobianas que sean eficaces contra estos patógenos. En lo que sigue, éstas se denominan de manera simplificada antibióticos; sin embargo, con esto quiere decirse no sólo sustancias eficaces contra bacterias, sino también agentes contra hongos y otros microorganismos. Un cambio temprano de este tipo a una terapia antimicrobiana correcta puede ser decisivo para el éxito del tratamiento.

- Actualmente faltan en particular pruebas individuales o sistemas de prueba fenotípicos (es decir, basados en cultivos) que puedan proporcionar un resultado de la prueba de sensibilidad en unas pocas horas. La resistencia fenotípica significa que el microorganismo crece a pesar de la presencia de un antibiótico. En el caso de sensibilidad fenotípica a los antibióticos, el crecimiento se inhibe en presencia del antibiótico ensayado, siempre que éste se haya aplicado en una concentración suficiente. Las pruebas de sensibilidad fenotípicas representan el estándar de oro; entre otras cosas, porque los resultados de las pruebas se generan independientemente de los mecanismos de resistencia subyacentes. Es cierto que, mediante biología molecular, ciertos genes de resistencia pueden detectarse en un corto espacio de tiempo; por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* -PCR). Sin embargo, esta prueba sólo es posible para determinados mecanismos de resistencia; los demás mecanismos de
- 40 resistencia no se detectan. Además, tales pruebas moleculares sólo detectan mecanismos de resistencia codificados genéticamente ya conocidos. Por tanto, no es posible hacer una afirmación fiable sobre la sensibilidad de un patógeno a un antibiótico si no se detecta un gen de resistencia determinado. Además, con estos métodos tampoco es posible ni con mucho predecir siempre de forma fiable la resistencia fenotípica, si se detecta un gen de resistencia. Y es que
- 45 el nivel de expresión genética puede ser diferente; y el microorganismo puede reaccionar de manera fenotípicamente sensible al antibiótico a pesar de la presencia del gen.

- Además, la detección de genes no es posible para una gran cantidad de mecanismos de resistencia. Los métodos que son capaces de detectar fenotípicamente con rapidez ciertos mecanismos de resistencia incluyen, por ejemplo, la detección de las β -lactamasas producidas por algunas bacterias. Las β -lactamasas son enzimas bacterianas que
- 50 pueden disociar los antibióticos β -lactámicos y, de este modo, hacerlos ineficaces. La prueba se puede llevar a cabo detectando la escisión de β -lactama, por ejemplo, mediante un cambio de color de un indicador de pH o usando MALDI-TOF MS (desorción/ionización láser asistida por matriz – MALDI (por sus siglas en inglés); TOF – *time-of-flight*, tiempo de vuelo; espectrometría de masas – MS (por sus siglas en inglés)). Con la MALDI-TOF MS, se determinan mediante espectrometría de masas la β -lactama no escindida y/o sus productos de escisión. Aunque es cierto que
- 55 estos métodos pueden resultar ventajosos en determinadas situaciones, también tienen la desventaja general de que sólo se detecta un mecanismo de resistencia determinado y no es posible realizar una afirmación general y definitiva sobre la sensibilidad o resistencia de un patógeno.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de métodos que, por un lado, posibiliten pruebas de sensibilidad fenotípicas basadas en el crecimiento y, por tanto, una declaración general como en los métodos de prueba convencionales, pero que, por otro lado, sean significativamente más rápidos que los procedimientos habituales. El objetivo general de tales pruebas rápidas sería proporcionar el resultado en unas pocas horas, es decir, en un plazo de 1-4 horas, por ejemplo.

5 La capacidad de alcanzar estos objetivos de tiempo depende, por un lado, del método de prueba y, por otro, de las propiedades de los microorganismos que se han de probar; por ejemplo, de la velocidad de crecimiento.

El método "MBT ASTRA" basado en MALDI-TOF MS recientemente desarrollado para pruebas de sensibilidad mediante la cuantificación del crecimiento microbiano utilizando un estándar interno demostró la viabilidad de una prueba general de sensibilidad basada en el crecimiento mediante MALDI-TOF MS (Lange et al., Journal of Clinical Microbiology, diciembre de 2014, volumen 52, número 12, p. 4155-4162; y K. Sparbier et al. / Methods 104 (2016) 48-54). Sin embargo, el procedimiento en la forma descrita hasta ahora requiere varias etapas de trabajo, que suponen invertir una cantidad considerable de trabajo en el laboratorio. Esta inversión de trabajo puede reducir la aceptación del método y con ello obstaculizar o, en caso dado, incluso impedir la introducción de este método, que es fundamentalmente ventajoso para los pacientes, en el diagnóstico rutinario.

10 El estudio "Direct blood culturing on solid medium outperforms an automated continuously monitored broth-based blood culture system in terms of time to identification and susceptibility testing" de E. A. Idelevich et al. (New Microbe and New Infect 2016; 10: 19-24) explica una investigación sobre si un método de hemocultivo por lisis-centrifugación, combinado con identificación por espectrometría de masas de tiempo de vuelo, ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) y Vitek 2 AST, ofrece una ventaja de tiempo en comparación con sistema de hemocultivo automatizado, basado en caldo de cultivo nutritivo.

En el trabajo "Mass spectral molecular networking of living microbial colonies" de Jeramie Watrous et al. (PNAS | Publicado en línea www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1203689109, 14 de mayo de 2012 | E1743-E1752), se presenta una integración de dos métodos: espectrometría de masas de ionización por electropulverización por desorción por nanopulverización (nano-DESI, por sus siglas en inglés) para la vigilancia química directa de poblaciones microbianas vivas en combinación con la generación de redes moleculares.

25 El capítulo 2 de libro "Rapid Sample Preparation for Microorganism Analysis by Mass Spectrometry" de Franco Basile (en: ACS Symposium Series, 2011, American Chemical Society/Oxford University Press, EE. UU., vol. 1065, páginas 5-34) proporciona una visión general de distintas etapas de preparación de muestras, que se utilizan en conexión con el análisis rápido de microorganismos con distintas técnicas de espectrometría de masas.

30 El folleto informativo de producto "MALDI Biotyper Consumables - Added Convenience Enhances Assay Productivity", agosto de 2015 ([www.bruker.com/fileadmin/userupload/8-PDF-Docs/Separations MassSpectrometry/Literature/Brochures/1838970 MBT Consumables RUO brochure 08-2015 eBook.pdf](http://www.bruker.com/fileadmin/userupload/8-PDF-Docs/Separations%20MassSpectrometry/Literature/Brochures/1838970%20MBT%20Consumables%20RUO%20brochure%2008-2015%20eBook.pdf)) describe distintas ofertas de productos del fabricante.

35 El manual de instrucciones "Instructions for Use - MSP 96 polished steel BC targets - Reusable MALDI targets for MALDI-TOF-MS analysis", revisión C, diciembre de 2015 ([www.bruker.com/fileadmin/userupload/8-PDF-Docs/Separations MassSpectrometry/Literature/Brochures/1838970 MBT Consumables RUO brochure 08-2015 eBook.pdf](http://www.bruker.com/fileadmin/userupload/8-PDF-Docs/Separations%20MassSpectrometry/Literature/Brochures/1838970%20MBT%20Consumables%20RUO%20brochure%2008-2015%20eBook.pdf)) se dedica al manejo de soportes de muestra para MALDI.

La publicación de patente US 2015/0086971 A1 divulga procedimientos y dispositivos para localizar y seleccionar una colonia de microorganismos en una placa de cultivo e identificar microorganismos en la colonia seleccionada usando MALDI. Comprende las etapas automatizadas de localizar y seleccionar una colonia de microorganismos en una placa de cultivo; obtener una muestra de la colonia de microorganismos seleccionada; aplicar al menos una parte de la muestra de la colonia de microorganismos seleccionada a una placa objetivo; y transferir la placa objetivo con la muestra a un dispositivo para realizar una MALDI para identificar la muestra de la colonia de microorganismos seleccionada. Una muestra de una colonia de microorganismos se deposita automáticamente en un punto de depósito de modo que la muestra cubra como máximo aproximadamente la mitad de un punto de depósito de la placa objetivo. Se prepara automáticamente una suspensión de una muestra de microorganismos recogiendo automáticamente la muestra con una herramienta de muestreo y sumergiendo la herramienta de muestreo con la muestra en una suspensión, después de lo cual la herramienta de muestreo se hace vibrar sólo en la dirección vertical para liberar la muestra de la herramienta de muestreo.

50 La publicación de patente WO 2016/016580 A1 se refiere a un procedimiento para preparar una superficie en una placa de análisis para realizar al menos una caracterización de una población de al menos un microorganismo en presencia de al menos un agente antimicrobiano usando espectrometría de masas según la técnica de espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz conocida como MALDI. Comprende las siguientes etapas sucesivas: - una etapa que consiste en utilizar una placa de análisis que está destinada a la caracterización mediante la técnica MALDI y que comprende al menos una zona de análisis que contiene un agente antimicrobiano; - una etapa que consiste en depositar la población de al menos un microorganismo sobre la zona de análisis en contacto con el agente antimicrobiano; - una etapa de incubación que consiste en conservar la placa de análisis durante un período de tiempo suficiente y en condiciones suficientes para posibilitar la interacción del agente antimicrobiano con el

microorganismo presente; y - una etapa que consiste en depositar sobre la zona de análisis una matriz adecuada para la técnica MALDI.

La publicación de patente WO 2012/023845 A1 se refiere a un procedimiento para caracterizar la resistencia a antibióticos de un microorganismo, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas: (a) proporcionar un espectro de masas de referencia de un compuesto antimicrobiano, su producto de modificación enzimática, su diana molecular o un compuesto sustrato de su enzima modificadora; (b) exponer un microorganismo, un lisado celular del mismo o un sobrenadante del medio de crecimiento del mismo al compuesto antimicrobiano o al compuesto sustrato en líquido acuoso, para así proporcionar una muestra expuesta; (c) adquirir un espectro de masas de la muestra expuesta; (d) comparar el espectro de masas adquirido en la etapa (c) con el espectro de masas de referencia de la etapa (a), y (e) determinar a partir de la comparación si ha tenido lugar una modificación del compuesto antimicrobiano, su producto de modificación o su diana molecular o del sustrato después de la exposición y determinar que el microorganismo es potencialmente resistente al compuesto antimicrobiano si se observa la modificación.

En vista de lo anterior, existe la necesidad de proporcionar procedimientos con los que se pueda simplificar y acelerar la preparación de muestras microbianas vivas para la posterior medición por espectrometría de masas. Otros objetivos que ha de lograr la invención resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la siguiente divulgación.

Compendio de la invención

Los procedimientos aquí descritos representan un método alternativo para una medición microbiana basada en MS muy rápida y sencilla; por ejemplo, con respecto a la identificación de especies/subespecies y/o pruebas de resistencia/sensibilidad y/o caracterización adicional de patógenos. La divulgación se refiere en particular al procedimiento de procesamiento/preparación de muestras, así como a algoritmos para la evaluación de datos.

Según un primer aspecto preferido, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para preparar muestras microbianas vivas para una posterior medición por espectrometría de masas, que comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar un soporte de muestra plano que comprende varios puntos de muestra (así llamados "Spots"); (b) aplicar al menos una muestra microbiana viva en una gota de medio nutritivo a al menos uno de los puntos de muestra; (c) pasar el soporte de muestra a un espacio de incubación con una atmósfera definida durante un período de tiempo predeterminado para estimular el crecimiento de microorganismos; (d) eliminar el líquido residual de la gota de medio nutritivo después del período de tiempo predeterminado para exponer un depósito de microorganismos en el punto de muestra; (e) preparar el punto de muestra para una ionización de desorción; (f) transferir el soporte de muestra a una fuente de iones de desorción de un espectrómetro de masas, generar iones a partir del punto de muestra preparado y registrar al menos un espectro de masas correspondiente; y (g) comparar el espectro de masas registrado con un juego de datos de referencia para determinar al menos una propiedad de la muestra microbiana.

El primer aspecto preferido de la divulgación se basa en particular en el nuevo y sorprendente conocimiento de que un soporte de muestra plano para espectrometría de masas, que, en una fuente de iones adecuada, sirve de sustrato para la ionización de las muestras preparadas, ya puede en una etapa anterior hacer las veces de sustrato para una incubación promotora del crecimiento de microorganismos. Esta doble función facilita enormemente el flujo de trabajo en el laboratorio y acorta el tiempo necesario para el proceso de trabajo de diagnóstico, ya que se pueden evitar etapas manuales, engorrosas y propensas a errores, de transferencia de muestras y se puede prescindir de recipientes de procesamiento separados tales como las placas de microtitulación. Esta simplificación relacionada con el proceso puede contribuir a establecer una medición por espectrometría de masas de microorganismos rápida, fiable y ampliamente validada en el diagnóstico clínico.

En distintos modos de realización, el juego de datos de referencia puede presentar espectros de referencia sacados de una biblioteca de espectros de masas previamente registrados, pudiendo comprender la al menos una propiedad de la etapa (g) en el marco de una identificación la especie o subespecie de microorganismos presentes en la muestra microbiana. En esta variante sencilla, la gota de medio nutritivo hace las veces de un reactor de crecimiento puro sobre el soporte de muestra para espectrometría de masas. Los expertos en la técnica reconocerán que, debido, entre otras cosas, a que fundamentalmente están rodeados por todas partes de un medio nutritivo, los microorganismos pueden multiplicarse más rápidamente en un líquido que en un medio nutritivo plano, como una capa de agar en una placa de Petri, de modo que el procedimiento propuesto ofrece una ventaja de tiempo que puede resultar importante para la supervivencia del paciente en el entorno clínico.

En ciertos casos, el juego de datos de referencia procedente del espectro de masas registrado en la etapa (f) puede derivarse de señales de masa contenidas en el mismo que no provengan originalmente de microorganismos. Como ejemplo pueden mencionarse señales de masa de una (o varias) sustancia(s) de referencia agregada(s) durante la preparación de la muestra microbiana (estándar interno), que pueden servir, por ejemplo, para la cuantificación.

En modos de realización preferidos, la misma muestra microbiana se aplica en paralelo a varios puntos de muestra en la etapa (b), conteniendo las gotas de medio nutritivo a veces una sustancia antimicrobiana y otras veces no. Un soporte de muestra para espectrometría de masas es particularmente adecuado para pruebas extensas de resistencia/sensibilidad porque ofrece suficiente espacio para vigilar simultáneamente el crecimiento de

microorganismos en presencia de diferentes sustancias antimicrobianas (o ante la misma sustancia antimicrobiana en diferentes concentraciones). Por lo tanto, se puede aclarar de forma muy rápida y fiable la cuestión de si un microorganismo reacciona con sensibilidad a una determinada sustancia antimicrobiana (o a qué concentración lo hace), lo que indicaría, por ejemplo, su eficacia como medicamento.

- 5 En realizaciones especiales del procedimiento, varias gotas de medio nutritivo con sustancia antimicrobiana pueden contener a veces un inhibidor enzimático y otras veces no. Puede ser de gran interés clínico y terapéutico utilizar un inhibidor de β -lactamasa como inhibidor enzimático. Esta ampliación de las pruebas de resistencia/sensibilidad permite hacer una afirmación sobre una resistencia basada en β -lactamasa, si el crecimiento del microorganismo examinado no se inhibe en presencia del antibiótico β -lactámico, pero sí en presencia de una combinación de antibiótico β -lactámico e inhibidor de β -lactamasa.

- 10 En distintos modos de realización, el juego de datos de referencia puede ser un espectro de masas registrado de manera próxima en el tiempo de un punto de muestra al que se haya aplicado en la etapa (b) una gota de medio nutritivo sin sustancia antimicrobiana o inhibidor enzimático; y la al menos una propiedad de la etapa (g) puede, en el marco de una caracterización, comprender una resistencia/sensibilidad de microorganismos presentes en la muestra microbiana a la sustancia antimicrobiana o una combinación de sustancia antimicrobiana e inhibidor enzimático. De esta manera, se puede determinar en particular la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico en relación con los microorganismos aplicando en la etapa (b) varias gotas de medio nutritivo, con concentraciones respectivamente diferentes de la sustancia antimicrobiana (y/o, en caso dado, del inhibidor), y evaluando el grado de eficacia a lo largo de una serie de concentraciones crecientes o decrecientes.

- 20 En un modo de realización adicional, el juego de datos de referencia puede ser un espectro de masas de un punto de muestra sobre un segundo soporte de muestra, incubándose los microorganismos durante un tiempo más corto para el espectro de masas utilizado como juego de datos de referencia, en caso dado también completamente sin incubación. En este contexto, la muestra microbiana se aplica preferiblemente sobre el punto de muestra en una gota de medio nutritivo sin sustancia antimicrobiana o sin una combinación de sustancia antimicrobiana e inhibidor enzimático. Las cantidades de células microbianas aplicadas inicialmente a los puntos de muestra para los espectros de masas de la muestra microbiana y del juego de datos de referencia son preferiblemente iguales.

- 25 Preferiblemente, la al menos una propiedad en la etapa (g) se deriva de una diferencia en el crecimiento de microorganismos, que se encuentra en la manifestación o intensidad de la firma de señal de masa específica de microorganismo en el espectro de masas registrado; dependiendo de si se ha podido hallar o no una inhibición del crecimiento mediante una sustancia antimicrobiana sola o en combinación con un inhibidor enzimático. En una variante sencilla, el crecimiento de microorganismos puede evaluarse en virtud de una identificación exitosa de la especie, siempre que la cantidad de microorganismos presentes en la muestra microbiana medida antes de la incubación no sea suficiente para una identificación fiable. Como ejemplo de un procedimiento de identificación bien conocido puede mencionarse el algoritmo MALDI Biotyper®, que confirma una identificación razonablemente fiable de una especie de microorganismo, siempre que el índice de semejanza calculado (así llamado, "log(Score)") sea superior o igual a 1,7. Se logra un alto grado de fiabilidad con índices de semejanza superiores o iguales a 2,0.

- 30 En distintos modos de realización, la muestra microbiana de la etapa (b) presente en la gota de medio nutritivo puede dimensionarse de modo que una cantidad esté ligeramente por debajo del límite de detección de la medición por espectrometría de masas. De esta manera, se puede en particular reducir al mínimo el tiempo que el soporte de muestra debe permanecer en el espacio de incubación para estimular el crecimiento de microorganismos. Y es que un crecimiento que alcance o supere ligeramente el límite de detección puede interpretarse ya como una indicación de la presencia o una manifestación de propiedad del microorganismo en comparación con una medición que no contenga datos significativos aparte de las señales de fondo.

- 35 En distintos modos de realización, la temperatura y la humedad en el espacio de incubación de la etapa (c) se pueden ajustar a aproximadamente 36 °C (en caso dado necesarios o incluso prescritos para una incubación o las pruebas de sensibilidad) y cerca de una saturación, respectivamente, para lograr las mejores condiciones de crecimiento posibles o las condiciones de crecimiento requeridas para los microorganismos que se han de investigar. El objetivo debería ser en general crear en el espacio de incubación las condiciones que hagan manifestarse más claramente las diferencias en el crecimiento. La temperatura de 36 °C corresponde aproximadamente a la temperatura del cuerpo humano y es adecuada para aquellos microorganismos que se han especializado en el ser humano como huésped. En el diagnóstico veterinario, alimentario o medioambiental, por ejemplo, también se pueden considerar sin problema alguno como más adecuadas otras temperaturas; dependiendo de qué huésped o entorno ambiental prefiera el microorganismo. La alta humedad del aire cercana al 100 % sirve en particular para evitar una evaporación prematura de la gota de medio nutritivo, para que el volumen de líquido disponible para el crecimiento de microorganismos prácticamente se conserve durante el período de tiempo predeterminado, habitualmente de unas pocas horas, en el que el soporte de muestra se encuentra en el espacio de incubación (generalmente de 1-18 horas).

- 40 En distintos modos de realización, la eliminación del líquido residual (después de la etapa de incubación) puede comprender secar un sobrenadante de gota, por ejemplo, mediante un material absorbente o pipeteando. Estas variantes tienen la ventaja de que los restos de las sustancias que se hallan en la gota de medio nutritivo se eliminan en gran medida del punto de muestra junto con el líquido, lo que puede reducir el fondo químico en la posterior medición

por espectrometría de masas. Sin embargo, también es posible dejar que el líquido se evapore en poco tiempo, por ejemplo, con ayuda de un soplador de aire caliente. En tal caso, las sustancias del medio nutritivo líquido se precipitan sobre el depósito de microorganismos y a continuación se preparan al menos parcialmente junto con éste para la medición por espectrometría de masas siguiente.

5 En distintos modos de realización, la preparación en la etapa (e) puede comprender una extracción preparatoria de proteínas/péptidos microbianos del depósito de microorganismos y/o lavar el depósito de microorganismos y/o embutir el depósito de microorganismos en una sustancia de matriz absorbente de luz láser para el propósito de una ionización posterior mediante desorción láser asistida por matriz (MALDI). En el caso de la extracción se puede aumentar el número de señales de masa específicas de microorganismo en el espectro de masas registrado y, por tanto, mejorar el valor informativo de la medición; particularmente si se busca una identificación por especie/subespecie del microorganismo investigado. Una o varias etapas de lavado son adecuadas particularmente para eliminar del depósito de microorganismos sales casi omnipresentes, que de otro modo pueden empeorar la eficacia de ionización. De esta manera se puede optimizar aun más el procedimiento de preparación. Ejemplos de sustancias de matriz son el ácido 2,5-dihidroxibenzoico, el ácido sinápico o el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. El procedimiento MALDI ha demostrado ser una herramienta muy importante y fiable en la investigación de microorganismos basada en iones. Al mismo tiempo, permite una generación pulsada de iones, que es muy adecuada para el registro dispersivo en tiempo de vuelo de espectros de masas.

Sin embargo, también son concebibles otros tipos de ionización por desorción para el uso con el procedimiento descrito, que no requieren la aplicación de una sustancia de matriz; por ejemplo, ionización por electropulverización por desorción (DESI) o ionización mediante espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS, por sus siglas en inglés). En casos muy especiales, la preparación en la etapa (e) también puede implicar sólo un corto tiempo de espera de, por ejemplo, unos pocos minutos sin tratamiento adicional del depósito de microorganismos.

Ventajosamente, los espectros de masas de la etapa (f) se registran de manera dispersiva en tiempo de vuelo. Los espectrómetros de masas de tiempo de vuelo pueden considerarse actualmente el "estándar de oro" en la investigación de microorganismos tanto clínica como no clínica debido a su alta capacidad de resolución, el tiempo de medición rápido y su amplia aceptación de masas. Como ejemplos de espectrómetros de masas que funcionan según el principio de tiempo de vuelo pueden mencionarse los de la serie microflex® de Bruker Daltonik GmbH disponible comercialmente.

En distintos modos de realización, en la etapa (b), la muestra microbiana (i) puede distribuirse como una suspensión en la gota de medio nutritivo sobre el al menos un punto de muestra o (ii) depositarse primero en forma de células sobre el al menos un punto de muestra y a continuación sumergirse en una gota de medio nutritivo distribuida. En variantes adicionales, las sustancias antimicrobianas (en caso dado también los inhibidores enzimáticos) se pueden aplicar sobre el punto de muestra, bien junto con la muestra microbiana y/o el medio nutritivo, bien por separado de éstos. En principio también es concebible invertir el orden de depósito y distribución, de modo que primero se distribuya una gota en la que luego se introduzca la muestra microbiana.

También se divulga, sin estar dentro del alcance de protección de las reivindicaciones adjuntas y teniendo fines ilustrativos, un procedimiento para preparar microorganismos para una medición por espectrometría de masas posterior, que presenta las siguientes etapas: (a) proporcionar un soporte de muestra plano que comprende varios puntos de muestra; por ejemplo, un *MSP 48/96 target polished steel BC* de Bruker Daltonik GmbH; (b) aplicar microorganismos intactos, cultivados y/o separados lejos del soporte de muestra, en una gota de medio nutritivo sobre al menos uno de los puntos de muestra del soporte de muestra plano; preferiblemente con una nanopipeta o micropipeta; la cantidad de las gotas transferidas puede estar entre 1 y 10 microlitros; (c) conservar el soporte de muestra plano durante un tiempo de espera predeterminado para permitir que se forme un depósito de microorganismos sobre el punto de muestra; preferiblemente aproximadamente de 10 a 60 minutos; (d) eliminar el líquido residual de la gota de medio nutritivo después del tiempo de espera predeterminado para exponer el depósito de microorganismos; (e) preparar el punto de muestra para una ionización de desorción; preferiblemente con sustancia de matriz MALDI; (f) transferir el soporte de muestra a una fuente de iones de desorción de un espectrómetro de masas, generar iones a partir del punto de muestra preparado y registrar al menos un espectro de masas correspondiente; y (g) comparar el espectro de masas registrado con un juego de datos de referencia para determinar al menos una propiedad de los microorganismos.

Los inventores han averiguado que se puede formar un depósito de microorganismos sobre una superficie plana ya después de un tiempo de espera (o "tiempo de reposo") relativamente corto de hasta una hora, de tal manera que los microorganismos sedimentados en la misma en una especie de "biopelícula" se liberen cuidadosamente del líquido residual y puedan detectarse de forma fiable mediante una medición por espectrometría de masas posterior. Aprovechando este sorprendente conocimiento, el cultivo (o la incubación) de microorganismos, para promover el crecimiento, y la preparación para la medición por espectrometría de masas, que según el primer aspecto de la divulgación se realizan en el mismo soporte de muestra para espectrometría de masas, pueden tener lugar en diferentes sustratos. Esta separación espacial abre posibles aplicaciones, particularmente en la automatización de flujos de trabajo, ya que un protocolo de cultivo automatizado en un entorno clínico podría eventualmente ser más fácil de realizar en recipientes como, por ejemplo, pocillos de una placa de microtitulación estandarizada que en una superficie plana como un soporte para MALDI TOF MS. En principio, lo explicado en relación con el procedimiento

según el primer aspecto también se aplica al procedimiento que no entra dentro del alcance de protección de las reivindicaciones adjuntas y tiene fines ilustrativos, siempre que pueda armonizarse con éste.

En distintos modos de realización, el juego de datos de referencia puede presentar espectros de referencia sacados de una biblioteca de espectros de masas previamente registrados, comprendiendo la al menos una propiedad de la etapa (g) en el marco de una identificación la especie o subespecie de los microorganismos.

En distintos modos de realización, los microorganismos pueden cultivarse en un medio nutritivo líquido en al menos un recipiente alejado del soporte de muestra plano antes de la aplicación en la etapa (b) y transferirse desde el mismo al punto de muestra; preferiblemente, el cultivo en una incubadora acondicionada/de temperatura regulada dura aproximadamente de 4 a 24 horas. El cultivo es útil particularmente para una prueba de sensibilidad de los microorganismos, preferiblemente en cada caso en presencia y ausencia de un antibiótico, como se describió anteriormente. Un cultivo no es absolutamente necesario para identificar o determinar ciertas proteínas en el espectro de masas que pueden indicar ciertos factores de virulencia u otras propiedades microbianas y, por lo tanto, no necesita ser parte del procedimiento protegido. Se puede utilizar una suspensión de microorganismos ya existente; por ejemplo, una creada como resultado de otras etapas de trabajo en el laboratorio. Como ejemplo puede mencionarse: se produce una suspensión de, por ejemplo, bacterias disolviendo en líquido las colonias bacterianas presentes en placas de agar; a esto le podría haber precedido un cultivo de las bacterias en un medio sólido como el agar, que permita que las colonias broten (podrían haber estado presentes en esta forma ya hace días). Otro ejemplo: el MALDI Sepsityper® Kit utiliza el líquido de frascos de hemocultivo positivos, que contienen sangre de pacientes sépticos y medio líquido y, en casos positivos, patógenos cultivados. El equipo de reactivos enriquece aun más el patógeno a partir de este líquido positivo mediante un procedimiento de lisis/centrifugación, con posterior extracción de proteínas y medición por MALDI de las proteínas. Como alternativa, se pueden aplicar en un punto unos pocos microlitros del líquido del hemocultivo positivo. Incluso sin incubación bajo alimentación de calor, sino a temperatura ambiente, las células de los microorganismos (i) se sedimentarán y (ii) se adherirán a la superficie del soporte; (iii) además, la mayoría de las especies se multiplicarán ligeramente incluso a temperatura ambiente.

En distintos modos de realización adicionales, los mismos microorganismos se pueden cultivar en varios recipientes (externos), y se puede añadir a veces una sustancia antimicrobiana al medio nutritivo líquido y otras veces no. Adicionalmente, se puede añadir a veces un inhibidor enzimático al medio nutritivo líquido en distintos recipientes con sustancia antimicrobiana añadida y otras veces no. Un ejemplo es un inhibidor de β -lactamasa.

En distintos modos de realización, el juego de datos de referencia puede ser un espectro de masas registrado de manera próxima en el tiempo de un punto de muestra sobre el que se halle un depósito de microorganismos procedente de un medio nutritivo líquido sin sustancia antimicrobiana o inhibidor enzimático, y la al menos una propiedad de la etapa (g) puede comprender en el marco de una caracterización una sensibilidad de los microorganismos a la sustancia antimicrobiana o a una combinación de sustancia antimicrobiana e inhibidor enzimático. En una variante especial, los mismos microorganismos pueden cultivarse en diferentes recipientes (externos) con medio nutritivo líquido en concentraciones en cada caso diferentes, y la al menos una propiedad de la etapa (g) puede comprender en el marco de una caracterización una concentración mínima inhibitoria de la sustancia antimicrobiana en relación con los microorganismos.

Preferiblemente, la al menos una propiedad de la etapa (g) se deriva de una diferencia en el crecimiento de microorganismos, que, por ejemplo, puede manifestarse en una diferencia entre identificación fiable y fallida con el algoritmo MALDI Biotyper®.

Al comienzo de un cultivo, los microorganismos pueden dimensionarse de tal manera que una cantidad esté ligeramente por debajo del límite de detección de la medición por espectrometría de masas; por ejemplo, alrededor de las 10^5 ufc por mililitro de medio nutritivo, en particular dando como resultado una concentración de al menos aproximadamente 100 microorganismos por punto.

En distintos modos de realización, eliminar líquido residual del soporte de muestra plano en la etapa (d) puede comprender secar un sobrenadante de gota mediante un material absorbente o pipeteando.

La preparación en la etapa (e) puede comprender una extracción preparatoria de proteínas/péptidos microbianos del depósito de microorganismos en el soporte de muestra plano y/o lavar el depósito de microorganismos y/o embutir el depósito de microorganismos en una sustancia de matriz absorbente de luz láser, para a continuación ionizarlo en la etapa (f) mediante desorción láser asistida por matriz (MALDI).

Los espectros de masas de la etapa (f) se registran preferiblemente de manera dispersiva en tiempo de vuelo (en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo).

En distintos modos de realización, los microorganismos pueden (i) distribuirse como una suspensión en el medio nutritivo líquido en el recipiente (externo) o (ii) introducirse primero en forma de células en el recipiente (externo), después de lo cual se alimenta medio nutritivo líquido; la cantidad de medio nutritivo puede oscilar, por ejemplo, entre 10 y 100 microlitros.

- En distintos modos de realización, se puede utilizar un pocillo (o varios pocillos) en una placa de microtitulación como recipiente (externo) (o recipientes externos) para el cultivo. Como alternativa, la placa de soporte de muestra de la etapa (a) se puede subdividir en una primera sección plana con puntos de muestra planos y una segunda sección con depresiones en la superficie, utilizándose las depresiones como recipientes (externos) (lejos de la primera sección plana), y los microorganismos intactos cultivados en la misma se pueden transferir en la etapa (b) desde la misma a puntos de muestra planos en la primera sección plana.

Breve descripción de las figuras

- Para una mejor comprensión de la invención se hace referencia a las siguientes figuras. Los elementos de las figuras no están necesariamente representados a escala, sino que están destinados principalmente a ilustrar (en su mayor parte esquemáticamente) los principios de la invención. En las figuras, los elementos correspondientes entre sí en las distintas vistas están identificados con números de referencia iguales.

- La Figura 1 muestra esquemáticamente un ejemplo de realización de un espectrómetro 10 de masas con una trayectoria lineal-axial 2 de vuelo, que termina en un detector 4, y una fuente 6 de iones situada aguas arriba para la desorción láser asistida por matriz (MALDI), como se utilizan a menudo en una investigación por espectrometría de masas de células microbianas.

Las Figuras 2A a 2G muestran esquemáticamente y a modo de ejemplo un procedimiento de preparación de microorganismos en una muestra microbiana con fines de identificación.

Las Figuras 3A a 3H ilustran esquemáticamente un posible desarrollo de procedimiento para pruebas de resistencia/sensibilidad de una muestra microbiana.

- La Figura 4A y la Figura 4B presentan resultados de una prueba de resistencia/sensibilidad según los principios de los procedimientos aquí presentados.

Las Figuras 5A a 5I muestran esquemáticamente y a modo de ejemplo un procedimiento de preparación de microorganismos, que no entra dentro del alcance de protección de las reivindicaciones adjuntas y tiene fines ilustrativos.

- La Figura 6 ilustra un ejemplo de realización de un soporte de muestra combinado, con secciones que, por un lado, son planas y, por lo tanto, pueden usarse como soporte de muestra para espectrometría de masas (y, en caso dado, la preparación sobre el mismo) y, por otro lado, presentan recipientes incorporados para el cultivo/la incubación de microorganismos en medios nutritivos líquidos.

Descripción detallada

- Si bien la invención se ha presentado y explicado por medio de una serie de modos de realización, los expertos en la técnica reconocerán que se pueden llevar a cabo en la misma distintas modificaciones en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de las enseñanzas técnicas definidas en las reivindicaciones adjuntas.

- Según un primer aspecto preferido de la divulgación, se averiguó sorprendentemente que la sola preparación de una muestra microbiana viva directamente sobre un soporte de muestra para espectrometría de masas puede usarse para el cultivo de microorganismos con el fin de producir en los puntos de muestra un número de microorganismos suficiente para la detección por espectrometría de masas. En este modo de realización sencillo, pero no obstante sorprendentemente eficaz, la gota de medio nutritivo en la que están suspendidas o sumergidas las células microbianas vivas hace las veces de, por así decirlo, un reactor de incubación.

Las Figuras 2A a 2G ilustran esquemáticamente un procedimiento de cultivo de este tipo en una gota directamente sobre el soporte de muestra con posterior medición por espectrometría de masas.

- Un soporte 12 de muestra plano se cubre en diferentes lugares ("puntos") con gotas 14 de una suspensión de microorganismos, conteniendo el líquido un medio nutritivo como, por ejemplo, un caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes o un caldo Iso-Sensitest. Según las necesidades, las gotas 14 pueden presentar un volumen de 1-10 microlitros, por ejemplo, 2, 4, 6 o incluso 8 microlitros. Los puntos de muestra pueden estar marcados en la superficie del soporte, o se pueden aplicar en lugares a una distancia suficiente sobre una superficie del soporte 12 por lo demás libre de distintivos. Como soporte 12 se puede utilizar, por ejemplo, una placa AnchorChip con 96 puntos marcados (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Como alternativa, los puntos de muestra también pueden estar definidos mediante la gota 14 de medio nutritivo aplicada, que no puede correrse si la superficie del soporte 12 de muestra es suficientemente hidrófoba. **Figura 2A.**

- El soporte 12, que en este ejemplo está cubierto con cinco gotas 14, cada una de ellas con diferente contenido de microorganismos, se pasa a un espacio 16 de incubación, donde se puede mantener bajo una atmósfera definida y controlada de, por ejemplo, 36 °C y casi el 100 % de humedad relativa del aire durante hasta aproximadamente 18 horas. Cabe mencionar aquí que, naturalmente, las muestras microbianas también se pueden aplicar ya en el espacio 16 de incubación; por lo tanto, las etapas de procedimiento correspondientes de aplicar al soporte 12 de muestra y

pasar el soporte 12 de muestra al espacio 16 de incubación pueden cambiar el orden en cada modo de realización concebible de los desarrollos de procedimiento descritos en esta divulgación.

La humedad en el espacio 16 de incubación se puede ajustar, por ejemplo, con solución de cloruro de sodio. Durante el tiempo que pasan en el espacio 16 de incubación, los microorganismos pueden multiplicarse en las gotas 14 metabolizando el medio nutritivo. La multiplicación puede hacerse visible por que el medio nutritivo inicialmente transparente que se halla en la gota 14 se vuelve turbio al cabo de unas horas (no representado). Sin embargo, el enturbiamiento no es un requisito obligatorio para un crecimiento de microorganismos detectable mediante espectrometría de masas. Sin embargo, puede servir de marca visual de control del proceso si los tiempos de incubación son lo suficientemente largos. **Figura 2B.** Los inventores han observado sorprendentemente que, al mismo tiempo, los microorganismos multiplicados se depositan en cantidades suficientes en la interfase entre la gota 14 y la superficie del soporte, lo que facilita en gran medida el posterior empobrecimiento del líquido (deshumectación) o secado. **Figura 2C.**

En una variante, el líquido residual en el sobrenadante de gota se puede aspirar cuidadosamente mediante una micropipeta o nanopipeta 18 hasta que los agregados sedimentados de células microbianas 20 estén casi liberados de líquido sobre la superficie del soporte. **Figura 2D-2E.** Debido al comportamiento de sedimentación descrito anteriormente, este tipo de eliminación de líquido residual del medio nutritivo deja sorprendentemente suficientes microorganismos en los puntos de muestra, de modo que se mantiene la base para la generación de señales de masa detectables en el detector del espectrómetro de masas.

A continuación, el depósito 20 de microorganismos expuesto en los puntos de muestra se puede cubrir con una sustancia de matriz para la ionización mediante desorción láser asistida por matriz directamente sobre el soporte 12 de muestra (punta 22 de pipeta con sombreado en forma de mosaico). **Figura 2F.** Además, se pueden intercalar previamente etapas de procesamiento adicionales, como la adición de sustancias para la extracción de proteínas/péptidos y/o una etapa de lavado (no representada), que son bien conocidas por los expertos en la técnica. En la fuente de iones del espectrómetro de masas se bombardean los puntos de muestra así preparados con un láser 24, con lo que sobre el punto de muestra se generan iones a partir de la película 20 de microorganismos sedimentada y preparada, que se alimentan al analizador de masas conectado para su medición. **Figura 2G.**

La especie o la subespecie del microorganismo cultivado se pueden deducir con una alta fiabilidad a partir de las señales de masa específicas en los espectros de masas registrados, mediante algoritmos de evaluación conocidos, tales como el MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania), comparándolos con espectros de referencia de una base de datos de espectros. El modo de proceder para tal evaluación es conocido por los expertos en la técnica y no es necesario describirlo aquí con más detalle.

Además de la medición de identificación pura, explicada anteriormente, después del cultivo de microorganismos directamente en el soporte de muestra para espectrometría de masas, la presente divulgación también proporciona procedimientos y equipos de reactivos de prueba para procesar las muestras microbianas para una prueba de resistencia/sensibilidad, como se explica a continuación.

Los aparatos habituales para pruebas de sensibilidad prueban por regla general una gran cantidad de antibióticos al mismo tiempo (por ejemplo, de 12 a 18), que están contenidos en, así llamados, "paneles" estandarizados. Los resultados no suelen estar disponibles el mismo día laborable porque requieren tiempos de incubación y reacción más largos; tiempo de incubación habitual: 10-24 horas (así llamada, "incubación nocturna"). En situaciones clínicas concretas, puede ser suficiente probar sólo uno o unos pocos antibióticos que entren específicamente en consideración para un determinado paciente y para su enfermedad, o que ya hayan sido administrados a un determinado paciente. Sin embargo, puede ser urgente comprobar la eficacia si, por ejemplo, no se observa ninguna mejoría clínica con la administración de antibióticos. Para ello, es muy importante, especialmente en el caso de infecciones potencialmente mortales como, por ejemplo, la sepsis, que el resultado de tal prueba esté disponible para el médico tratante no al día siguiente, sino ya en un período de tiempo mucho más corto de, por ejemplo, unas pocas horas, como ayuda terapéutica para la toma de decisiones.

Por esta razón, esta descripción se centra en particular en procedimientos y dispositivos (equipos de reactivos de prueba, consumibles y otros utensilios) para llevar a cabo pruebas rápidas individuales, es decir, probar un determinado antibiótico en relación con un determinado microorganismo o en relación con grupos de microorganismos. Esto no excluye la posibilidad de que puedan aplicarse principios iguales o similares o derivados, en caso dado adaptados a la prueba simultánea de varios antibióticos, para una prueba simultánea o próxima en el tiempo de un gran número de antibióticos.

Una de las características del método descrito según el primer aspecto preferido es que la prueba de resistencia/sensibilidad, al menos la mayoría de las etapas de trabajo necesarias, se lleva a cabo directamente en un soporte de muestra para espectrometría de masas tal como un soporte para MALDI-TOF MS, es decir, una placa plana y conductora adecuada hecha, por ejemplo, de acero pulido o de cerámica, que sirve de sustrato para la ionización durante la medición en la fuente de iones de un espectrómetro de masas. En el método descrito, la prueba de sensibilidad se basa en el crecimiento (basada en cultivo), es decir, el método representa una prueba de sensibilidad fenotípica y, por lo tanto, es independiente de los mecanismos de resistencia subyacentes (si los hay).

En este contexto, el crecimiento de los microorganismos con y sin antibiótico (este último indica el control del crecimiento) también puede tener lugar directamente en un soporte para MALDI-TOF MS, en el que luego se realiza la medición. Esto diferencia fundamentalmente el método descrito según el primer aspecto preferido de los métodos anteriores basados en MALDI-TOF MS, en los que los microorganismos se cultivan fuera del soporte para MALDI-TOF MS. En tales métodos, el cultivo con o sin antibiótico (para el control del crecimiento) se realiza primero en recipientes de cultivo o pocillos de placas de microtitulación, después de lo cual tiene lugar un aislamiento de los microorganismos o las proteínas microbianas en estos recipientes o pocillos, que a continuación se transfieren a un soporte para MALDI-TOF MS y después se miden. Sin embargo, esto requiere una serie de etapas manuales que requieren mucho trabajo, lo que tiene como resultado una mala capacidad de integración de tales procedimientos utilizados hasta ahora en los diagnósticos de rutina. El método propuesto según el primer aspecto, por el contrario, posibilita un procesamiento de las muestras mucho más sencillo y rápido.

De manera similar a lo explicado anteriormente en relación con las **Figuras 2A a 2G**, las **Figuras 3A a 3H** acompañan las etapas de trabajo aquí descritas a modo de ejemplo y sirven para ilustrar esquemáticamente su posible significado. Sin embargo, los profesionales en el campo reconocerán que ciertas etapas de trabajo se pueden realizar de forma modificada. El experto en la técnica entenderá el flujo de trabajo aquí propuesto como guía y, en caso dado, se desviará del mismo en el marco de sus habilidades y conocimientos rutinarios, siempre que le parezca necesario o útil.

El antibiótico (por ejemplo, una solución de antibiótico en un medio nutritivo líquido) se puede mezclar con una suspensión de microorganismos, bien en un recipiente de cultivo, bien directamente en un punto de un soporte para MALDI-TOF MS (gota sombreada 14*). Además, por regla general se realiza conjuntamente un control de crecimiento en otra zona del soporte para MALDI-TOF MS, es decir, un cultivo de la suspensión de microorganismos en un medio nutritivo sin adición de antibiótico (gota no sombreada 14). Preferiblemente se aplica una cantidad muy pequeña de la suspensión sobre los puntos; por ejemplo, 1-10 microlitros. Así pues, la prueba de sensibilidad tiene lugar en microgotitas 14, 14*, preferiblemente con un volumen de aproximadamente 4-8 microlitros. En principio, también es posible utilizar volúmenes aun más pequeños, por ejemplo, en forma de nanogotitas. La concentración inicial de microorganismos en las gotas 14, 14* puede estar ligeramente por debajo del límite de detección de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo MALDI convencional con una trayectoria de vuelo lineal y, por tanto, por ejemplo, ser de aproximadamente 5×10^5 ufc por mililitro (ufc - unidad formadora de colonias). **Figura 3A.**

En el ejemplo mostrado, el soporte 12 para MALDI-TOF MS con la mezcla básica de prueba se incuba luego en una, así llamada, "cámara húmeda" 16 en una incubadora con una humedad del aire alta. La cámara húmeda 16 sirve para que las gotitas 14, 14* no se evaporen prematuramente durante la incubación y puede estar realizada como una caja con una tapa, por ejemplo, de plástico, en la que el soporte para MALDI-TOF MS se pueda introducir sin esfuerzo. Esta cámara húmeda 16 puede realizarse de manera similar a los recipientes de transporte o almacenamiento disponibles comercialmente para soportes comerciales para MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y se construye preferiblemente de tal manera que el soporte 12 para MALDI-TOF MS pueda colocarse a suficiente profundidad en la misma para que la tapa no entre en contacto con las gotitas 14, 14* en la superficie del soporte 12 para MALDI-TOF MS. Se puede introducir en la cámara húmeda 16 una pequeña cantidad de líquido, por ejemplo, de 0,1 a 5 mililitros de agua o solución de NaCl, para enriquecer la atmósfera en la cámara 16 con humedad y así establecer una humedad del aire alta (cerca del 100 %), de modo que se impida la evaporación de las gotitas 14, 14* de medio nutritivo mismas. **Figura 3B.**

En las gotitas 14, 14* se alcanza rápidamente durante la incubación una alta concentración de microorganismos en un pequeño volumen de líquido (siempre que el crecimiento no sea inhibido por sustancias antimicrobianas). Después de un tiempo suficiente, la cámara húmeda 16 con el soporte 12 para MALDI-TOF MS se puede retirar de la incubadora (no mostrada). A continuación, se retira el soporte 12 para MALDI-TOF MS de la cámara húmeda 16 y se secan las gotitas 14, 14* que se hallan sobre el mismo. El secado puede realizarse de forma pasiva, por ejemplo, al aire, o acelerarse, por ejemplo, mediante una corriente de aire generada activamente, la acción de calor, una combinación de éstas u otros procedimientos. Debido al volumen de líquido muy pequeño de una gotita 14, 14* (de nanolitros a microlitros), el secado se realiza muy rápidamente. Sin embargo, este secado fácil de las gotitas (por ejemplo, con aire caliente) puede tener la desventaja de que, además de las células microbianas, se concentran también proteínas y otros componentes del medio nutritivo líquido en los puntos del soporte 12 para MALDI-TOF MS y perturben la medición por MALDI-TOF MS. Este problema potencial se puede remediar separando las células microbianas del medio nutritivo directamente en el soporte 12 para MALDI-TOF MS.

En ambos casos del secado y de la separación, el objetivo es eliminar en gran medida el líquido residual de la gota 14, 14* de medio nutritivo para preparar el punto de muestra para la posterior preparación. Como se indicó anteriormente, los inventores han averiguado durante sus investigaciones que las células microbianas parecen presentar una tendencia a sedimentarse durante la incubación, que puede durar algunas horas, y luego acumularse de manera predominante directamente junto a la superficie del soporte 12 para MALDI-TOF MS. Las células incluso se adhieren ("se pegan") hasta cierto punto a la superficie del soporte 12 y forman una especie de "biopelícula de microorganismos", mientras que los componentes líquidos forman un "sobrenadante" dispuesto encima. Sin querer dar una explicación científica sofisticada de este comportamiento durante el crecimiento de microorganismos en una gota sobre una placa plana, se supone que las interacciones físicas entre la superficie de la placa y las células de los microorganismos, así como los procesos de adhesión causados por las propiedades bioquímicas y biofísicas de la superficie celular de los microorganismos, son responsables de la acumulación preferida. **Figura 3C.**

Aprovechando este nuevo hallazgo, el medio nutritivo líquido sobrenadante (líquido residual) se puede extraer por pipeteado de las gotitas 14, 14* que se hallan en el soporte 12 para MALDI-TOF MS, como ya se ha descrito en otro contexto en relación con la **Figura 2D**. Como alternativa, simplemente se puede secar mediante ligeros toques con un elemento absorbente para liberar del líquido el depósito de microorganismos. Por ejemplo, para este fin se pueden utilizar toallitas absorbentes 26 que suelten poca pelusa, como las habituales en los laboratorios biológicos/químicos; por ejemplo, KimWipes™. La separación se realiza en este contexto inmediatamente y puede explicarse, entre otras cosas, por el efecto capilar. La separación se puede realizar secando mediante ligeros toques manuales por medio de, por ejemplo, un paño doblado (como papel absorbente, papel secante, paños suaves para limpiar superficies sensibles) o por medio de un dispositivo especial. Un dispositivo de este tipo puede presentar, por ejemplo, una placa o una "almohadilla" hecha de un material absorbente que, para un secado uniforme, rápido y normalizado, se dispone en particular simplemente encima del soporte 12 para MALDI-TOF MS a una distancia que permita establecer un contacto de transferencia de fluido con las gotas 14, 14* y se retira de nuevo tras un tiempo de absorción relativamente corto, de unos pocos segundos. **Figuras 3D-3F**.

En un modo de realización alternativo del secado mediante toques ligeros con un elemento absorbente, el contacto entre la gota y el tejido absorbente no se puede establecer en dirección vertical (perpendicularmente a la superficie del soporte de muestra como se muestra en las **Figuras 3D-3F**), sino en el borde lateral de la o las gotas cerca de la superficie del soporte de muestra. De esta manera se puede garantizar que (i) el líquido residual del medio nutritivo se absorba más rápida y completamente y (ii) las células, que se acumulan preferiblemente en el centro del punto en la superficie, no sean tocadas en ningún caso por el tejido absorbente, para que se reduzca el riesgo de una eliminación accidental de células. Esta modificación de la absorción de líquido puede reducir aun más el fondo en los espectros de masas y mejorar así aun más la calidad de las mediciones.

Incluso en estas variantes de la eliminación de líquido residual explicadas anteriormente, en el punto de muestra correspondiente resulta un depósito 20 de microorganismos en gran medida deshumectado (o expuesto, con un empobrecimiento del líquido residual) con pocos restos del medio nutritivo potencialmente perturbador, que sirve de base para la posterior medición por espectrometría de masas.

La separación de las células del medio nutritivo líquido mediante secado por toques ligeros con un elemento absorbente o pipeteado aquí descrita da como resultado mediciones muy eficaces con espectros MS de alta calidad. Otra ventaja de esta separación en comparación con el secado pasivo de las gotas es que la separación se produce de manera extremadamente rápida (inmediata o instantáneamente), lo que proporciona una ventaja de tiempo significativa y posibilita un procesamiento posterior directo de las muestras. Sin embargo, en ciertos modos de realización, el secado por toques ligeros con un elemento absorbente puede ir acompañado de una corriente de aire calentado de secado para empobrecer aun más el líquido residual.

El procedimiento descrito tiene una eficacia para separar células de un medio líquido similar a la de la centrifugación con posterior eliminación del sobrenadante, pero es posible directamente sobre un soporte para MALDI-TOF MS y sin pérdida de tiempo. El efecto de separación se puede reforzar aun más, por ejemplo, mediante el uso de soportes especiales para MALDI-TOF MS, como, por ejemplo, soportes de anclaje (*AnchorChip*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen) o también soportes para MALDI-TOF MS con puntos de muestra individuales en forma de un cono aplanado. Esto podría reforzar el efecto de sedimentación celular a través de depresiones poco profundas pero ligeramente cónicas. También se pueden aplicar otros procedimientos de lavado de muestras líquidas directamente sobre un soporte.

Para mejorar la formación de un depósito de microorganismos (adhesión) sobre la superficie del soporte de muestra durante la fase de crecimiento, las superficies de los puntos pueden revestirse con diferentes sustancias que mejoren la adhesión; por ejemplo, proteínas o azúcares. Estas sustancias se eligen preferiblemente de modo que no interfieran en la medición y/o la comparación de los espectros de masas microbianos con juegos de datos de referencia. Esto se puede conseguir, por ejemplo, haciendo que las señales de masa de estas sustancias se encuentren fuera del intervalo de masa que se ha de evaluar, que habitualmente se halla entre m/z 2000 y m/z 20 000, por ejemplo, entre m/z 3000 y m/z 15 000. Como alternativa pueden elegirse como sustancias que aumentan la adhesión también sustancias (por ejemplo, proteínas) que se utilicen al mismo tiempo como sustancias estándar; es decir, como marcadores de la buena calidad de las mediciones y/o como marcadores de intensidad. En este caso, las señales de masa de estas sustancias estándar pueden hallarse en el intervalo de masas que se ha de evaluar. Además, se pueden utilizar desde un principio materiales con propiedades adhesivas mejoradas y/o calidad superficial mejorada como materiales para la fabricación de los soportes para MALDI-TOF MS.

Después de secar o separar las gotitas de medio nutritivo líquido en los puntos correspondientes, los puntos se cubren, por ejemplo, con una matriz para investigaciones por MALDI-TOF MS (punta 22 de pipeta con sombreado en forma de mosaico) y a continuación se introduce el soporte en el aparato de MALDI-TOF MS y se miden las biomoléculas microbianas, por ejemplo, proteínas o péptidos, como ya se explicó anteriormente. **Figuras 3G-3H**.

Antes de o al mismo tiempo que la aplicación de la sustancia de matriz, se pueden añadir diferentes sustancias que favorezcan la medición (no mostradas), por ejemplo, ácido fórmico o acetonitrilo, para una mejor extracción de las proteínas microbianas. También es posible aplicar gotas de agua desionizada como gotas de lavado sobre el depósito de microorganismos y retirarlas nuevamente para eliminar sales. Después de la medición, los resultados se pueden

evaluar de acuerdo con los algoritmos que se explican posteriormente con más detalle. En este contexto, se juzga y se evalúa el crecimiento de los microorganismos en presencia de los antibióticos. El principio básico es que el crecimiento de los microorganismos sensibles se inhibe en presencia de los antibióticos, mientras que los microorganismos resistentes están en condiciones de crecer a pesar del antibiótico. Realizar conjuntamente el control del crecimiento, es decir, probar la suspensión de microorganismos sin antibiótico en el mismo soporte de muestra de MS, puede ser útil para la evaluación y para los algoritmos de evaluación correspondientes. La **Figura 3B** y la **Figura 3C** muestran esquemáticamente una comparación del comportamiento de crecimiento y sedimentación en caso de sensibilidad (contorno continuo) y en caso de resistencia (contorno discontinuo).

En una variante del procedimiento, el cultivo de los microorganismos con o sin antibiótico también se puede realizar en una placa de microtitulación compuesta, donde un soporte de muestra plano y liso para espectrometría de masas, tal como un soporte para MALDI-TOF MS, forma el fondo y, junto con una pieza sobrepuesta removible que contiene agujeros pasantes, proporciona una cuadrícula de pocillos, como se describe en la solicitud de patente CA 2 467 131 A1 (en ésta, Figura 10). Los pocillos o recipientes de reacción proporcionados pueden (por ejemplo, como equipo de reactivos de prueba), ya antes de la adición de una suspensión de microorganismos, contener antibióticos, por ejemplo, en forma de solución, polvo o en forma liofilizada. Después de un tiempo de incubación suficiente con crecimiento de microorganismos concomitante o en caso dado ausente, se elimina el líquido residual de las gotitas, por ejemplo, mediante secado, y se retira la pieza sobrepuesta de la placa para MALDI-TOF MS. A esto le pueden seguir una preparación de matriz MALDI como se ha descrito anteriormente y una medición por MALDI-TOF MS.

En un modo de realización adicional, el soporte para MALDI-TOF MS no se puede incubar en una incubadora separada, sino que la función de incubación se puede integrar directamente en el espectrómetro de masas MALDI-TOF o en el sistema total, por ejemplo, en forma de una unidad de incubación o un módulo de incubación. Esto posibilita una automatización y una mayor reducción de las etapas de procesamiento manual necesarias. Un modo de realización adicional prevé la integración de un dispositivo térmico directamente en la cámara húmeda, de modo que la cámara húmeda pueda asumir la función de una incubadora y resulte innecesario poner a disposición una incubadora separada.

El uso de soportes de muestra para espectrometría de masas que ya hayan sido preparados previamente con antibióticos sobre los puntos en forma de polvo seco u otra forma puede facilitar adicionalmente las pruebas de sensibilidad para el usuario.

La **Figura 4A** muestra resultados de una prueba de resistencia/sensibilidad utilizando el ejemplo del bacilo gramnegativo anaerobio facultativo *Klebsiella pneumoniae* en relación con el antibiótico β -lactámico meropenem del grupo de los carbapenémicos. La preparación de la muestra se realizó directamente en el soporte de muestra, como describen esquemáticamente las **Figuras 3A-3H**. El volumen de las gotas distribuidas fue de seis microlitros; la concentración del antibiótico 2 microgramos por mililitro; y el tiempo de permanencia en el espacio de incubación correspondientemente acondicionado cuatro horas. Los espectros de masas de tiempo de vuelo MALDI se evaluaron con el módulo de *software* del producto comercial MALDI Biotyper®. Se probaron en cada caso una cepa de la bacteria resistente a meropenem (espectros de masas de arriba) y una cepa de la bacteria sensible a meropenem (espectros de masas de abajo). El control de crecimiento sin la adición del antibiótico, que se preparó en la misma placa de soporte de muestra para MALDI, se muestra en cada caso en el espectro derecho.

Se ve claramente que, en el caso de la cepa resistente, las firmas de señales de masa específicas en los dos espectros superiores apenas difieren. De esto se puede concluir que existe resistencia, ya que el crecimiento bacteriano claramente no se ve inhibido por la presencia de meropenem y es posible una identificación fiable de la especie. En cambio, en el caso de la cepa sensible, las firmas de señales de masa específicas sólo son visibles en el espectro del control del crecimiento (abajo a la derecha). Sin embargo, en presencia de meropenem (espectro inferior izquierdo), las células de *Klebsiella* claramente no pueden (o casi no pueden) multiplicarse. Las señales de masa que se destacan de forma aislada en el espectro inferior izquierdo pertenecen a una sustancia de referencia que se añadió a la gota de medio nutritivo para cuantificar los microorganismos, pero no se tienen en cuenta en la investigación aquí descrita concretamente. En estas condiciones de falta de crecimiento, el *software* de evaluación no logra determinar la especie de microorganismo por falta de datos; especialmente si la cantidad inicial de biomasa microbiana está por debajo del límite de detección de la espectrometría de masas. Esto permite concluir que las *Klebsiellas* de esta cepa reaccionan de manera sensible a esta sustancia antimicrobiana específica.

La **Figura 4B** ilustra en un diagrama de barras una estadística del comportamiento de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en relación con meropenem del experimento de la **Figura 4A** para cinco tamaños de gota diferentes: 2, 4, 6, 8 y 10 microlitros. Como puede verse, el crecimiento relativo de la cepa sensible está de manera fiable por debajo del valor umbral de crecimiento significativo de 0,4, mientras que para la cepa resistente se ubica muy por encima del valor umbral; con una excepción para las gotas de cuatro microlitros, donde la mediana es significativamente mayor de 0,4, pero también se producen mediciones por debajo de esta en casos aislados.

Las pruebas de resistencia/sensibilidad se pueden realizar en muestras microbianas obtenidas directamente de cultivos o directamente de material biológico. En la técnica anterior, para las pruebas de sensibilidad se suelen utilizar cultivos maduros, que se han incubado en un medio sólido, tal como agar, durante, por ejemplo, 16-24 horas y están

presentes en forma de colonias formadas después de tales tiempos de incubación. También es posible realizar las pruebas a partir de cultivos maduros incubados en medio nutritivo líquido.

Sin embargo, en muchas situaciones es ventajoso llevar a cabo una prueba de sensibilidad directamente a partir del material de investigación para reducir significativamente el tiempo hasta el resultado. Como ejemplos de un material de este tipo de gran importancia para un diagnóstico rápido de patógenos se pueden mencionar los hemocultivos positivos. Hoy en día, el proceso de diagnóstico por hemocultivo suele consistir en que las muestras de sangre extraídas del paciente se colocan primero en frascos especiales de hemocultivo con medio nutritivo líquido. Luego, estos frascos se introducen en incubadoras automatizadas, que vigilan continuamente los frascos en cuanto a un eventual crecimiento microbiano; por ejemplo, midiendo el dióxido de carbono. Si un frasco de hemocultivo da positivo, su líquido se extiende sobre medios sólidos y a continuación estos últimos se incuban por regla general durante 16-24 horas. Las colonias resultantes se utilizan para la identificación y pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Entre otras cosas, las colonias también son adecuadas para el método de prueba de sensibilidad aquí descrito.

Sin embargo, lo que ahorra tiempo es la identificación y las pruebas de sensibilidad directamente a partir de hemocultivos positivos para ahorrar el tiempo destinado al cultivo en medios sólidos y así obtener el resultado aproximadamente un día antes. Para lograrlo, es necesario un procesamiento previo de la muestra para enriquecer los microorganismos. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante un procedimiento de lisis/centrifugación o un procedimiento de lisis/filtración. En el procedimiento de lisis/centrifugación, por ejemplo, las células sanguíneas se lisan primero mediante la adición de un agente de lisis tal como un agente tensioactivo y luego los microorganismos se concentran mediante centrifugación. En una etapa de lavado opcional, se añade un tampón de lavado y los microorganismos se concentran nuevamente mediante centrifugación. A continuación, la identificación se realiza, bien inmediatamente, bien después de una extracción de proteínas. Uno de tales procedimientos de identificación se desarrolló como un equipo de reactivos de identificación MALDI Sepsityper® (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y está disponible comercialmente (N. G. Morgenthaler et al., International Journal of Microbiology Volume 2015, ID de artículo 827416, 10 páginas).

Estos procedimientos u otros similares también se pueden utilizar como procesamiento previo de las muestras (enriquecimiento de los microorganismos) para las pruebas de resistencia/sensibilidad mediante MALDI-TOF MS aquí descritas. Esto posibilita una reducción significativa en el tiempo de obtención de resultados.

Como alternativa, se pueden utilizar subcultivos incubados muy brevemente en medio sólido y procedentes de hemocultivos positivos u otros materiales para las pruebas de sensibilidad basadas en MALDI-TOF MS aquí descritas. Recientemente se ha demostrado la utilización de subcultivos incubados muy brevemente en medio sólido y procedentes de hemocultivos positivos para la identificación (Idelevich et al., Clin Microbiol Infect. 2014; 20:1001-1006) y para pruebas de sensibilidad (Idelevich et al., J Clin Microbiol. 2014; 52:4058-4062). En este contexto, después de la realización del subcultivo (extensión), los medios sólidos sólo se incuban brevemente, por regla general de 1,5 a 6 horas, y la biomasa microbiana "joven" resultante se utiliza para la identificación y las pruebas de sensibilidad. Aunque este procedimiento no hace posible realizar pruebas directas inmediatamente después de un resultado positivo de un hemocultivo, es muy rápido en comparación con las pruebas clásicas de colonias maduras que han sido incubadas durante 16-24 horas. La ventaja de este método es que no se requieren consumibles ni una inversión de trabajo adicionales; sólo se realizan una observación más temprana de los medios sólidos y las pruebas a partir de la biomasa "joven".

Son especialmente ventajosas las pruebas de sensibilidad directamente a partir de sangre sin incubación previa de las muestras de sangre en un equipo automático de hemocultivo. En este contexto, el procesamiento previo de las muestras para el enriquecimiento de los microorganismos se puede realizar como se describió anteriormente para las pruebas a partir de hemocultivos positivos.

Mientras que actualmente es difícil llevar a cabo una identificación directa basada en MALDI-TOF MS directamente a partir de la sangre sin un cultivo previo, incluso después de una concentración de los microorganismos, debido a las bajas concentraciones de células de microorganismos en la sangre, el procedimiento aquí descrito posibilita realizar una prueba de sensibilidad directa basada en MALDI-TOF MS directamente a partir de la sangre. Una vez aislados los microorganismos de la sangre, se prepara una suspensión de microorganismos en un medio nutritivo líquido y, como es habitual en las pruebas de sensibilidad, se mezcla la misma con un antibiótico. Esta suspensión y, en caso dado, un control de crecimiento se aplican a continuación en forma de gotitas a un soporte para MALDI-TOF MS y se incuban directamente en éste. Incluso con un número inicial de células microbianas en la sangre muy bajo, los microorganismos se multiplicarán después de un determinado tiempo de incubación, al menos en el control de crecimiento o, si existe una resistencia fenotípica, también en la mezcla de muestra y antibiótico, lo que puede detectarse mediante el espectrómetro de masas MALDI-TOF. Por lo tanto, la prueba de sensibilidad en sí se realiza según el mismo principio que por lo demás se describe en relación con el primer aspecto preferido de esta divulgación.

Una identificación de microorganismos es posible sin más utilizando MALDI-TOF a partir de colonias maduras incubadas en medios sólidos. Sin embargo, para una identificación directa a partir de material de investigación (por ejemplo, de hemocultivos positivos), es necesario un procesamiento previo de las muestras. Esto es posible, por ejemplo, con el procedimiento de lisis/centrifugación descrito anteriormente. Sin embargo, este procedimiento requiere etapas de procesamiento adicionales, lo que lleva tiempo y dificulta la integración en los diagnósticos de laboratorio de rutina.

Los métodos descritos en esta solicitud de detección e identificación a partir de gotitas o de prueba de sensibilidad en gotitas directamente sobre un soporte para MALDI-TOF MS según el primer aspecto preferido no sólo se pueden realizar de forma aislada, sino también en combinación, siendo conveniente tal combinación particularmente en caso de realizarse las pruebas directamente a partir del material de investigación; por ejemplo, de hemocultivos positivos.

Con tal combinación de prueba de sensibilidad con identificación, la medición por MALDI-TOF MS no sólo compara el crecimiento de la medición de control con el crecimiento de la muestra mezclada con un antibiótico de acuerdo con los algoritmos descritos para la prueba de sensibilidad, sino que adicionalmente se puede utilizar también el crecimiento microbiano no inhibido en la medición de control para la identificación habitual por MALDI-TOF MS. Con tiempos de incubación suficientemente largos, que no obstante aún son muy cortos en comparación con los tiempos de incubación habituales de 16-24 horas, la cantidad de biomasa microbiana es suficiente para la identificación. Las ventajas de este método combinado son que (i) se puede prescindir de etapas de procesamiento adicionales para, por ejemplo, el método de lisis/centrifugación, (ii) los resultados de las pruebas de sensibilidad y la identificación están disponibles rápida y simultáneamente y (iii) el tiempo hasta la finalización de las pruebas de sensibilidad y la identificación es más corto en comparación con las pruebas clásicas a partir de colonias maduras.

La aplicación de este método combinado puede concernir a pruebas de colonias maduras o jóvenes, así como a pruebas directamente a partir de material; por ejemplo, de hemocultivo o sangre positivos.

Con un modo de realización adicional de los métodos aquí descritos se hace posible una detección rápida y sencilla de mecanismos de resistencia de microorganismos. Esto se consigue, por ejemplo, mediante pruebas combinadas. Es decir, adicionalmente a la suspensión compuesta de microorganismo y antibiótico y a una suspensión compuesta sólo del microorganismo (control del crecimiento sin antibiótico), también se prueba una suspensión compuesta de microorganismo, antibiótico y una sustancia que anule específicamente (es decir, sobre la base de un determinado mecanismo de resistencia) un eventual mecanismo de resistencia del organismo microbiano contra el antibiótico.

Un ejemplo de esto es la detección de la formación de β -lactamasas por parte de bacterias. Las β -lactamasas son enzimas bacterianas que pueden disociar los antibióticos β -lactámicos y, de este modo, hacerlos ineficaces. Ejemplos de β -lactamasas son las β -lactamasas ampC, las β -lactamasas de Espectro Ampliado (ESBL, por sus siglas en inglés), las carbapenemasas, etc. Cada tipo de β -lactamasa escinde un espectro específico de antibióticos y tiene además propiedades diferentes (por ejemplo, ubicación del gen en un plásmido o en el cromosoma), que restringen en diversos grados la gama de antibióticos disponibles para una terapia y posibilitan diferentes velocidades de propagación de las cepas bacterianas correspondientes. Por lo tanto, una rápida determinación del mecanismo de resistencia subyacente puede ser de gran importancia, especialmente también en relación con los estudios de higiene hospitalaria y las medidas de higiene que en caso dado se hayan de tomar.

Mediante la adición de un inhibidor de β -lactamasa específico (por ejemplo, ácido clavulánico para ESBL o vaborbactam para meropenem), el efecto de una β -lactamasa se puede anular específicamente. Este principio se utiliza no sólo con fines terapéuticos, sino también con fines de diagnóstico para la detección de la β -lactamasa que subyace a la resistencia. Por ejemplo, están disponibles comercialmente hojas de prueba empapadas con antibiótico y hojas de prueba empapadas con antibiótico más inhibidor de β -lactamasa. Después de extender el cultivo bacteriano sobre un medio sólido, tal como una placa de agar, se colocan encima tales hojas de prueba; y al cabo de 16-24 horas se miden las zonas de inhibición (prueba de difusión en agar). Alcanzar cierta diferencia en el diámetro de la zona de inhibición entre la hoja de prueba con antibiótico y la hoja de prueba con antibiótico más el inhibidor de β -lactamasa indica la producción de una β -lactamasa específica.

La ventaja de los métodos aquí descritos para las pruebas combinadas es que, además de ser más fáciles de llevar a cabo, el resultado está disponible ya después de unas pocas horas en comparación con el resultado de, por ejemplo, el método de difusión en agar, que requiere mucho más de 12 horas de tiempo, por lo que no estará disponible hasta mucho más tarde al día siguiente. La ventaja de velocidad en los procedimientos aquí descritos se debe a que, por un lado, el crecimiento de los microorganismos en un medio nutritivo líquido es significativamente más rápido que en un medio sólido y, por otro lado, en una gotita se alcanza rápidamente una alta concentración de microorganismos debido al pequeño volumen de líquido. En tercer lugar, la medición por espectrometría de masas, por ejemplo, utilizando MALDI-TOF MS, garantiza una detección del crecimiento más sensible y más rápida que la que se puede lograr observando visualmente el crecimiento en un medio sólido como en el caso del método de difusión en agar.

En comparación con la detección mencionada al principio de β -lactamasas mediante la detección de la escisión de β -lactama usando MALDI-TOF MS (señales de masa de β -lactama no escindida o de productos de escisión), el método basado en MALDI-TOF MS aquí descrito utilizando las pruebas combinadas tiene una ventaja importante: la detección de la escisión de β -lactama es un método indirecto, es decir, en el caso positivo se demuestra que se escinde un antibiótico β -lactámico y se deduce que el antibiótico no será eficaz para esta cepa bacteriana. Sin embargo, la eficacia puede depender de otros factores, como, por ejemplo, la dosis del antibiótico. En la prueba combinada aquí descrita se determina adicionalmente de manera directa el efecto del inhibidor de la β -lactamasa sobre el crecimiento del microorganismo, es decir, si la resistencia se anula o no. Tales resultados tienen una relevancia clínica significativamente mayor.

Sobre la base de lo explicado anteriormente, las pruebas combinadas aquí descritas se pueden utilizar para realizar pruebas en colonias maduras o jóvenes, así como para realizar pruebas directamente a partir de material; por ejemplo de hemocultivo o sangre positivos.

Además de utilizar los métodos descritos en forma de pruebas rápidas individuales, es decir, probar un determinado antibiótico contra un determinado microorganismo, también es posible probar varios antibióticos al mismo tiempo (pruebas múltiples). Esto tiene la ventaja de que al mismo tiempo se puede crear un antibiograma completo para los microorganismos de la muestra microbiana. Además es posible probar varias concentraciones para cada antibiótico simultáneamente, lo que hace posible determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Por CMI se entiende la concentración mínima de un antibiótico que inhibe el crecimiento microbiano. La CMI es una medida de la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos. Por un lado, la CMI hace posible categorizar un microorganismo en las categorías "sensible", "intermedio" o "resistente"; por otro lado, la CMI proporciona información sobre el "grado de sensibilidad" de un microorganismo a un determinado antibiótico. Para las pruebas múltiples, se pueden cubrir muchos puntos de un soporte para MALDI-TOF MS en paralelo, pudiéndose utilizar, por ejemplo, soportes con 96, 384 o incluso 1536 puntos.

El crecimiento de los microorganismos se puede determinar mediante diferentes algoritmos de evaluación. En este contexto, se puede comparar el crecimiento de los microorganismos con antibiótico con el crecimiento de los microorganismos sin antibiótico (control de crecimiento).

Como un posible algoritmo se propone la detección de la biomasa microbiana. Una característica del procedimiento MALDI-TOF MS es un determinado límite inferior de detección, es decir, la cantidad mínima de biomasa microbiana (aproximadamente 10^4 o 10^5 células microbianas por punto) que posibilita una detección en el sentido de generar señales de masa reconocibles en el espectro de masas. Este límite de detección inferior depende de muchos factores, entre otros las características y configuraciones del aparato. Según el algoritmo aquí descrito, un microorganismo en el medio nutritivo líquido se puede aplicar a un punto en una concentración (cantidad) que es inferior al límite inferior de detección del procedimiento de medición MALDI-TOF MS. Es decir, si se llevara a cabo una medición por MALDI-TOF MS sin procesamiento adicional de esta muestra microbiana, no se podría detectar ninguna firma de microorganismo en el espectro de masas por encima del fondo omnipresente. De ello se deduce inmediatamente que, si el microorganismo es sensible al antibiótico que se ha de probar, se inhibe el crecimiento y la biomasa microbiana apenas será detectable incluso después del período de incubación, ya que no se supera el límite inferior de detección. En cambio, en caso de resistencia del microorganismo al antibiótico que se ha de probar, los microorganismos pueden crecer durante la incubación del mismo modo que en el caso del control de crecimiento (sin antibiótico) y se puede detectar la masa microbiana, es decir, se detectan las correspondientes señales de masa microbianas específicas en el espectro de masas.

Para aumentar la precisión del procedimiento y evitar la probabilidad de una interpretación errónea de una firma que aparezca "accidentalmente" en el espectro de masas y que sea similar a una firma de señal de masa microbiana específica, incluso con pequeñas cantidades de biomasa microbiana (normalmente por debajo del límite de detección), puede utilizarse (en caso dado, adicionalmente en combinación) la cuantificación o la cuantificación relativa de la cantidad de biomasa microbiana. Esto se puede conseguir, por ejemplo, comparando la, así llamada, "Área Bajo la Curva" (ABC) y/o máximos de intensidad usando un estándar interno ("MBT-ASTRA", Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) o mediante otros métodos estadísticos que el experto en la técnica conoce fundamentalmente y que aquí no necesitan explicación adicional. En particular, el juego de datos de referencia para la comparación con una firma de masa microbiana en el espectro de masas registrado se puede derivar o determinar a partir de las señales de masa de un estándar interno o una sustancia de referencia en el mismo espectro de masas.

Como otra posible variante se propone el algoritmo de resolución espacial. En este contexto, utilizando el procedimiento MALDI-TOF MS, los disparos láser se emiten en una cuadrícula espacial definida con precisión, por ejemplo, 1000 disparos distribuidos en zonas respectivamente definidas de un punto preparado de un soporte para MALDI-TOF MS. El número de disparos "exitosos", es decir, disparos en los que se haya generado un espectro de masas con una firma de microorganismo detectable, se compara, por ejemplo, entre la muestra microbiana con antibiótico y la muestra microbiana sin antibiótico (control de crecimiento).

Este algoritmo también se puede utilizar, por ejemplo, como complemento del algoritmo de detección de biomasa microbiana descrito anteriormente, con el fin de aumentar la precisión del procedimiento de detección y reducir la probabilidad de que se interpreten erróneamente como un crecimiento significativo firmas que aparezcan "accidentalmente" en el espectro de masas, incluso con cantidades pequeñas de biomasa microbiana (normalmente por debajo del límite de detección). Es decir, un pequeño número de disparos exitosos, por ejemplo, todavía no puede interpretarse como crecimiento, sino que se interpreta como accidental y no significativo.

Las **Figuras 5A a 5I** explican un ejemplo de realización de un procedimiento que no entra dentro del alcance de protección de las reivindicaciones adjuntas y sirve para fines ilustrativos. Dado que muchas etapas son similares a las de los procedimientos descritos anteriormente, de modo que las explicaciones correspondientes también se pueden aplicar a este ejemplo, la siguiente descripción se limita, lo más brevemente posible, a las diferencias esenciales con respecto a los procedimientos según el primer aspecto preferido de la divulgación.

- Una diferencia esencial consiste en que el cultivo/la incubación de microorganismos y la preparación para una medición por espectrometría de masas no tienen lugar en el mismo sustrato plano como un soporte de muestra para espectrometría de masas, sino en sustratos (o secciones de sustrato) separados. Una suspensión de microorganismos en un medio nutritivo líquido se introduce en unos recipientes 28; por ejemplo, pocillos de una placa 30 de microtitulación. El inóculo puede ser de aproximadamente 10^6 ufc por mililitro; el volumen del medio nutritivo es de aproximadamente 50 a 250 microlitros; preferiblemente 100 microlitros. Los pocillos 28 pueden contener (por ejemplo, como un equipo de reactivos de prueba) sustancias antimicrobianas, por ejemplo en forma de una solución, un polvo o en forma liofilizada, para pruebas de resistencia/sensibilidad, ya antes de la adición de una suspensión de microorganismos. Como alternativa, estos antibióticos se pueden añadir más tarde al medio nutritivo. **Figura 5A.**
- 10 La placa 30 de pocillos se coloca en una incubadora 16 y se conserva en la misma durante un tiempo de incubación determinado de, por ejemplo, 4 a 18 horas, para estimular el crecimiento de microorganismos. Como ya se ha explicado, los microorganismos tienden a formar depósitos ("biopelícula de microorganismos") en el fondo y en la parte inferior de las paredes laterales de los pocillos 28. **Figuras 5B-5C.**
- 15 La placa 30 de pocillos se saca de la incubadora 16. Para poder extraer de los pocillos 28 un volumen del medio nutritivo con una cantidad suficiente de microorganismos crecidos intactos a partir de una distribución aproximadamente uniforme de microorganismos, el depósito se puede arremolinar, por ejemplo, moviendo la punta 18 de la pipeta hacia arriba y hacia abajo varias veces o agitando suavemente la placa 30 de pocillos, poco antes de la extracción, de modo pueda tomarse una muestra de los microorganismos en mayor concentración y distribuidos uniformemente con el líquido del medio nutritivo. La cantidad de líquido extraído puede estar entre 1 y 10 microlitros. **Figura 5D-5E.**
- 20 Como alternativa a este procedimiento, la formación de un depósito de microorganismos en los pocillos 28 se puede impedir o detener en caso dado desde el principio durante el cultivo agitando cuidadosamente la placa 30 de pocillos durante el tiempo en la incubadora 16 (no representado). Entonces puede ser innecesario arremolinar con la punta 18 de la pipeta y/o agitar posteriormente.
- 25 La cantidad de líquido extraído con los microorganismos intactos contenidos en el mismo se deposita como gotas 14 sobre los puntos de un soporte 12 de muestra plano para espectrometría de masas. **Figura 5F.**
- 30 Se aguarda un tiempo de espera o de reposo de aproximadamente 10 a 60 minutos, durante el cual se da a los microorganismos la ocasión de fijarse en la interfase entre el líquido de la gota y la superficie del soporte o sedimentarse en la misma. En principio, el tiempo de espera se puede reducir a medida que aumenta la concentración de microorganismos en la gota 14 sobre el soporte 12 de muestra; en otras palabras, si la concentración es alta, el tiempo de espera puede estar en el extremo inferior del intervalo preferido; si la concentración es baja, puede resultar ventajoso esperar un período de tiempo más largo. **Figura 5G.**
- 35 Como ya se explicó anteriormente en otro contexto, después del tiempo de espera se puede eliminar del punto de muestra líquido residual del medio nutritivo, por ejemplo, mediante un tejido absorbente (paño 26), que se pone en la superficie de soporte lateralmente en contacto de transferencia de fluido con la gota 14 en un punto y que aspira simplemente una gran parte del líquido. Sin embargo, naturalmente se pueden utilizar también otros tipos de extracción de líquido, tales como el pipeteado, como ya se describió anteriormente. **Figura 5H.**
- 40 El depósito 20 de microorganismos así expuesto puede prepararse ahora como se ha descrito anteriormente y medirse en un espectrómetro de masas. Por ejemplo, se pueden extraer péptidos/proteínas de los microorganismos y/o se puede lavar el depósito 20 y/o se puede embutir el depósito 20 en una sustancia de matriz MALDI. **Figura 5I.**
- 45 La **Figura 6** ilustra esquemáticamente y a modo de ejemplo una placa 32 de soporte de muestra/pocillo combinada con una depresión 34 (que puede ser representativa de una pluralidad de depresiones), en la que se pueden cultivar los microorganismos, y una sección plana 36 espaciada de la misma con puntos de muestra, que puede utilizarse como sustrato para una preparación de muestras para espectrometría de masas. En la fuente de iones del espectrómetro de masas, la perturbación del campo eléctrico provocada por la depresión 34 se puede reducir, por ejemplo, cubriendo previamente a ras la depresión 34 (no representado).
- Los principios aquí descritos no están limitados forzosamente a procedimientos de medición por MALDI-TOF MS, sino que, en principio, también se pueden implementar con otros métodos de detección o diferenciación, como, por ejemplo, con otros métodos de detección por espectrometría de masas o métodos para determinar la fluorescencia intrínseca.
- 50 Además de las realizaciones explicadas a modo de ejemplo, también son imaginables otros modos de realización de la invención. Con el conocimiento de esta divulgación, es posible sin más para el experto en la técnica diseñar otros procedimientos ventajosos de preparación y medición por espectrometría de masas para muestras microbianas vivas y microorganismos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de muestras microbianas vivas para una posterior medición por espectrometría de masas, que comprende las etapas:
 - (a) proporcionar un soporte de muestra plano que comprende varios puntos de muestra;
 - 5 (b) aplicar al menos una muestra microbiana viva en una gota de medio nutritivo a al menos uno de los puntos de muestra;
 - (c) pasar el soporte de muestra a un espacio de incubación con una atmósfera definida durante un período de tiempo predeterminado para estimular el crecimiento de microorganismos;
 - 10 (d) eliminar el líquido residual de la gota de medio nutritivo después del período de tiempo predeterminado para exponer un depósito de microorganismos en el punto de muestra;
 - (e) preparar el punto de muestra para una ionización de desorción;
 - (f) transferir el soporte de muestra a una fuente de iones de desorción de un espectrómetro de masas, generar iones a partir del punto de muestra preparado y registrar al menos un espectro de masas correspondiente; y
 - 15 (g) comparar el espectro de masas registrado con un juego de datos de referencia para determinar al menos una propiedad de la muestra microbiana.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el juego de datos de referencia presenta espectros de referencia sacados de una biblioteca de espectros de masas previamente registrados, comprendiendo la al menos una propiedad de la etapa (g) en el marco de una identificación la especie o subespecie de microorganismos presentes en la muestra microbiana.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la misma muestra microbiana se aplica en paralelo a varios puntos de muestra en la etapa (b) y las gotas de medio nutritivo contienen a veces una sustancia antimicrobiana o una combinación de sustancia antimicrobiana e inhibidor enzimático y otras veces no.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se utiliza un inhibidor de β -lactamasa como inhibidor enzimático.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el juego de datos de referencia es un espectro de masas, registrado de manera próxima en el tiempo, de un punto de muestra sobre el que en la etapa (b) se ha aplicado una gota de medio nutritivo sin sustancia antimicrobiana o combinación de sustancia antimicrobiana e inhibidor enzimático, y la al menos una propiedad de la etapa (g), en el marco de una caracterización, comprende una sensibilidad de los microorganismos presentes en la muestra microbiana a la sustancia antimicrobiana o la combinación de sustancia antimicrobiana e inhibidor enzimático.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que en la etapa (b) se aplican varias gotas de medio nutritivo con concentraciones respectivamente diferentes de la misma sustancia antimicrobiana, y la al menos una propiedad de la etapa (g), en el marco de una caracterización, comprende una concentración mínima inhibitoria de la sustancia antimicrobiana en relación con los microorganismos.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la al menos una propiedad de la etapa (g) se deriva de una diferencia en el crecimiento de microorganismos.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 7, en el que la muestra microbiana de la etapa (b) se dimensiona en la gota de medio nutritivo de tal manera que una cantidad esté ligeramente por debajo del límite de detección de la medición por espectrometría de masas.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la temperatura y la humedad en el espacio de incubación en la etapa (c) se ajustan a aproximadamente 36 °C y cerca de la saturación, respectivamente.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la eliminación del líquido residual en la etapa (d) comprende secar un sobrenadante de gota mediante un material absorbente o pipeteando.
- 45 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la preparación en la etapa (e) comprende una extracción preparatoria de proteínas/péptidos microbianos del depósito de microorganismos y/o lavar el depósito de microorganismos y/o embutir el depósito de microorganismos en un sustancia de matriz absorbente de luz láser, para ionizarlo posteriormente mediante desorción láser asistida por matriz (MALDI) en la etapa (f).
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los espectros de masas de la etapa (f) se registran de manera dispersiva en tiempo de vuelo.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que en la etapa (b) la muestra microbiana (i) se distribuye como una suspensión en la gota de medio nutritivo sobre el al menos un punto de muestra o (ii) se deposita primero en forma de células sobre el al menos un punto de muestra y a continuación se sumerge en una gota de medio nutritivo distribuida.

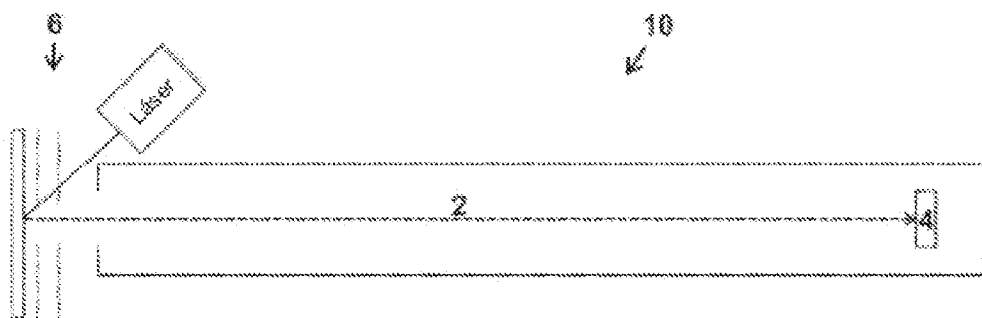


Figura 1

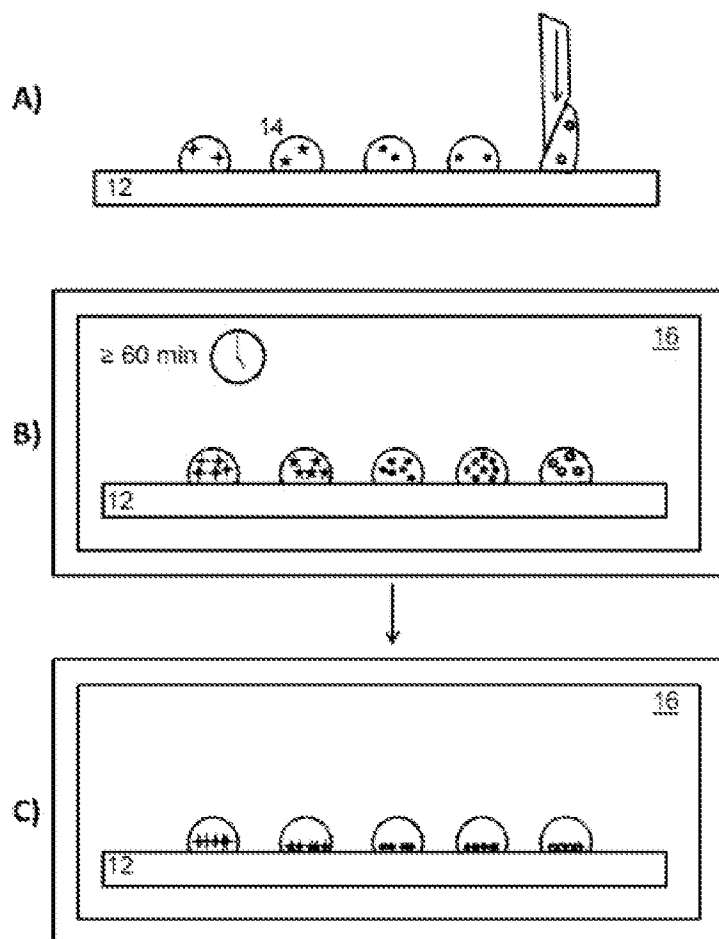


Figura 2
(continuación abajo)

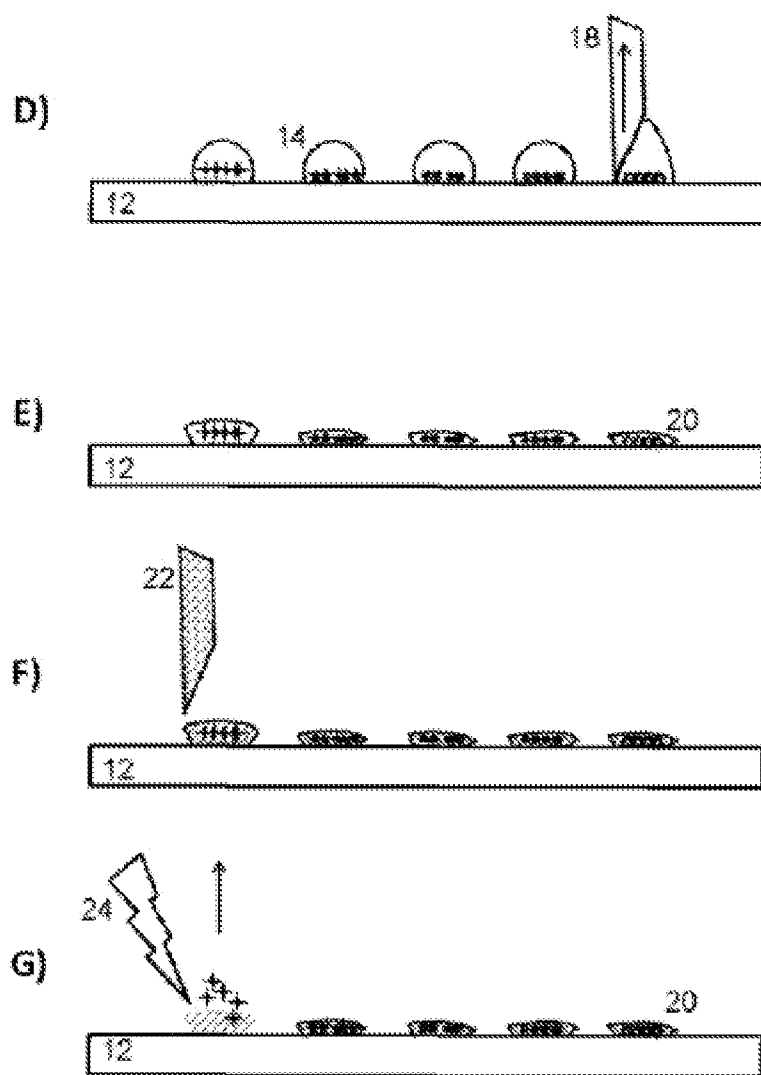


Figura 2
(continuación)

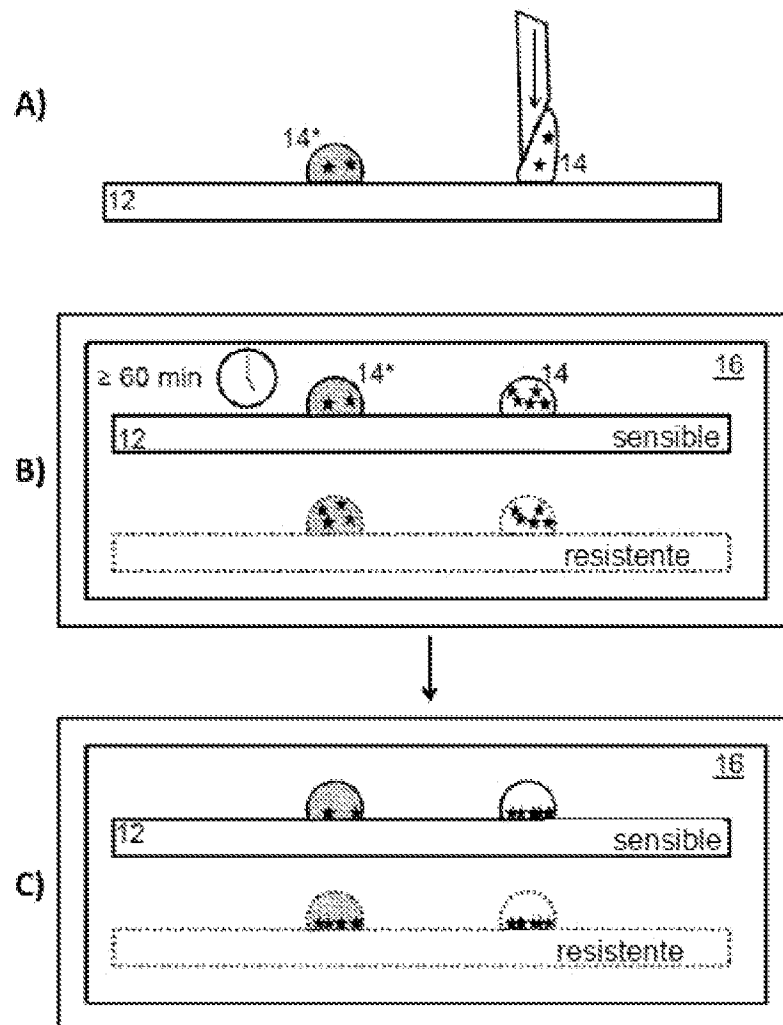


Figura 3
(continuación abajo)

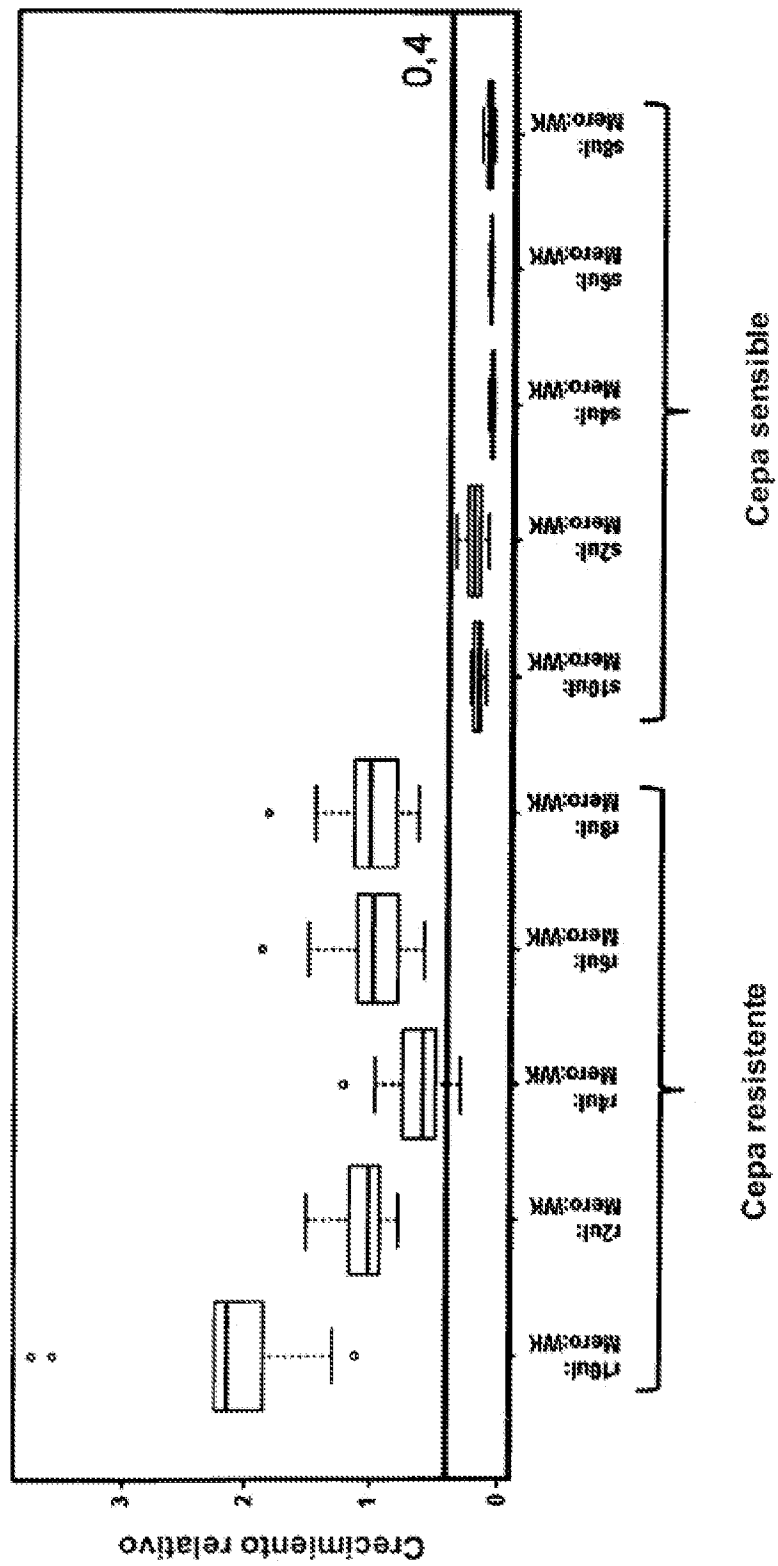


Figura 4B

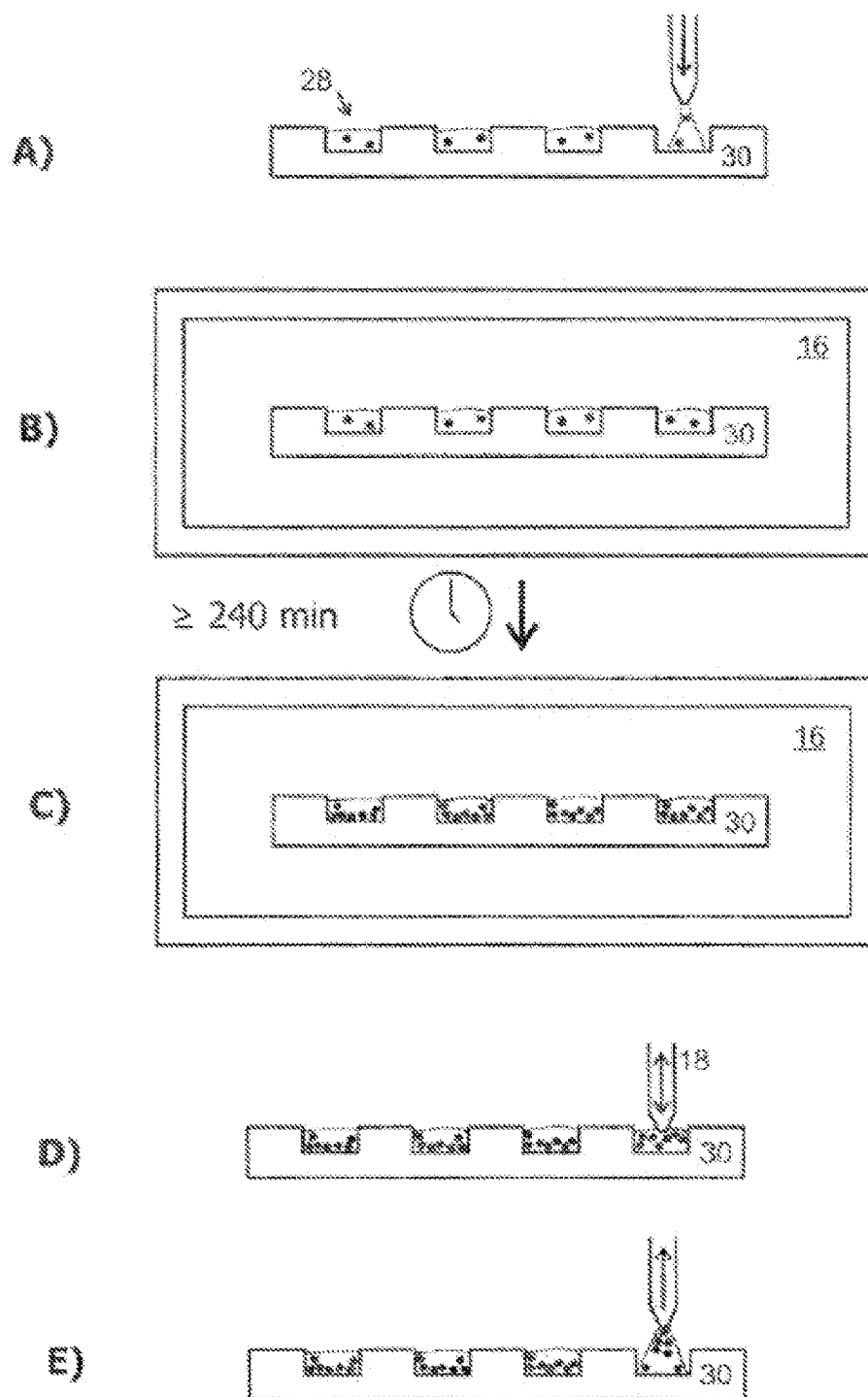


Figura 5
(continuación abajo)

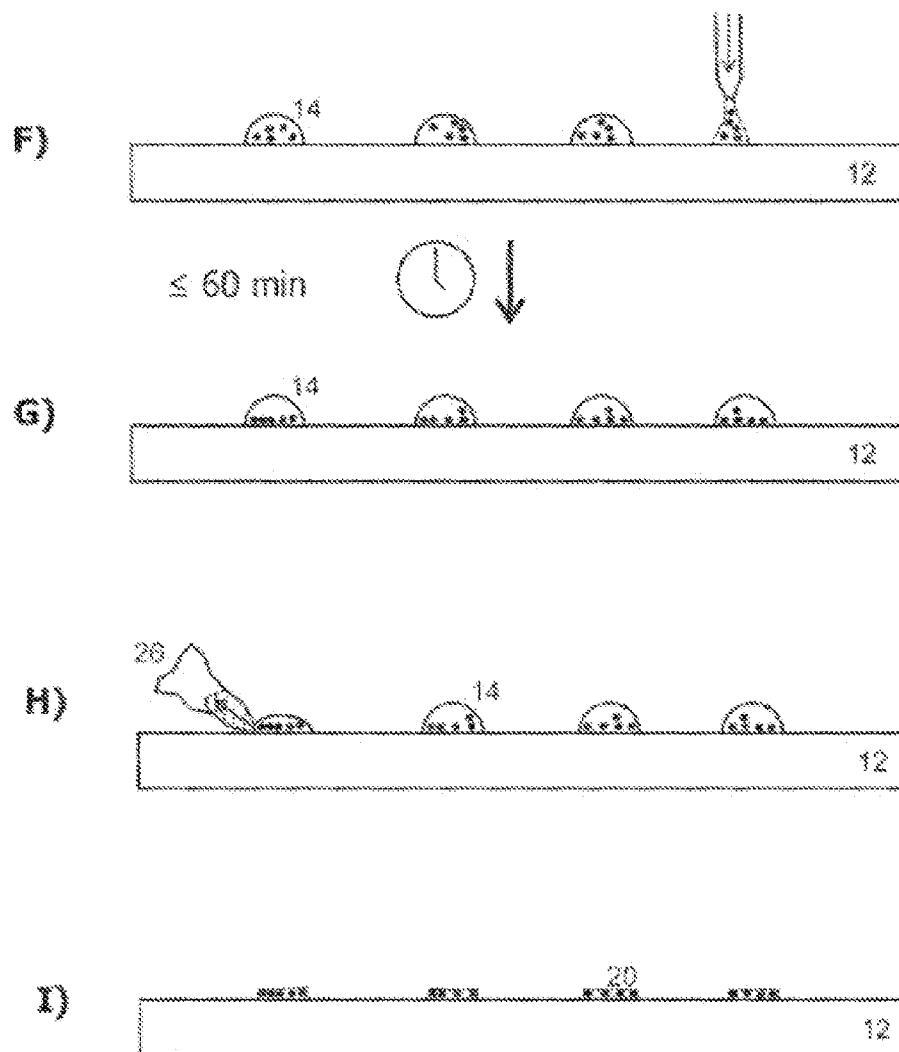


Figura 5
(continuación)

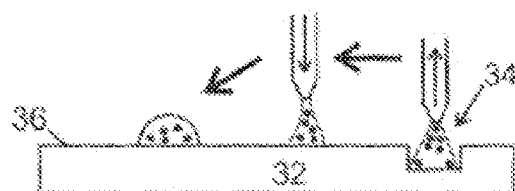


Figura 6