

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 034**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)
G06T 7/00 (2007.01)
C12Q 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2015** **PCT/FR2015/052667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016** **WO16055724**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2015** **E 15788145 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024** **EP 3204508**

54 Título: **Método de análisis e interpretación automatizada de un antibiograma**

30 Prioridad:

06.10.2014 FR 1459559

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2024

73 Titular/es:

FONDATION MÉDITERRANÉE INFECTION (20.0%)
Faculté de Médecine 27, Boulevard Jean Moulin
13005 Marseille, FR;
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE
MARSEILLE (20.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%) y
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (20.0%)

72 Inventor/es:

ROLAIN, JEAN-MARC;
RAOULT, DIDIER;
LE PAGE, STÉPHANIE y
BUFFET, SYLVAIN

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 992 034 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de análisis e interpretación automatizada de un antibiograma

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método que permite la automatización de la lectura y de la interpretación de pruebas de sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos, en el campo de la microbiología clínica.

10 **Estado de la técnica**

La presente invención se puede aplicar a las pruebas de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos, principalmente llamados antibiogramas en bacteriología, pero también a otras áreas de la infectología, tales como las pruebas de sensibilidad de los hongos a los antifúngicos denominadas antifungigramas para micología.

15 En la presente descripción, se utiliza el término genérico "antibiograma" indistintamente tanto para los antibiogramas de compuestos antibióticos con respecto a bacterias como para los antifungigramas de compuestos antifúngicos con respecto a hongos.

20 Un antibiograma es una técnica de laboratorio destinada a probar la sensibilidad de una cepa bacteriana con respecto a uno o más antibióticos supuestos o conocidos mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento de la bacteria. El principio consiste en colocar un cultivo de bacterias en presencia del o de los antibióticos y observar las consecuencias sobre su desarrollo y supervivencia. Para hacer esto, por ejemplo, se pueden colocar varias pastillas empapadas de antibióticos sobre una cepa bacteriana colocada en un medio de cultivo sólido. Entonces se produce una difusión del antibiótico a partir de la pastilla, lo que crea un gradiente de concentración alrededor de la pastilla y una zona de inhibición del crecimiento visible a simple vista en forma de un halo oscuro alrededor de la pastilla si la bacteria es sensible al antibiótico. Existen tres tipos de interpretación según el diámetro del círculo de la zona de inhibición que rodea el disco de la pastilla de antibiótico: cepa o bacteria sensible, intermedia o resistente.

30 Las pastillas y su dosis variable de antibiótico están estandarizadas según las recomendaciones de los sistemas expertos del EUCAST (por sus siglas en inglés de *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*: www.eucast.org) [Winstanley T, Courvalin P (2011) Expert systems in clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 24: 515-556. 24/3/515 [pii]; 10.1128/CMR.00061-101, y Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G (2013) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect 19: 141-160. 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x)] y/o del CA-SFM (Comité de Antibiogramas de la Sociedad Francesa de Microbiología: www.sfm-microbiologie.org). Las pastillas de antibióticos están hechas de materiales de sustrato que contienen una concentración conocida de antibiótico y capaz de difundirlo, tales como papel secante impregnado con concentraciones de antibióticos que varían de aproximadamente 1 µg a 500 µg dependiendo de los antibióticos y se comercializan por las empresas i2a (Montpellier, Francia), BD (Becton Dickinson, Estados Unidos), Bio-Rad (Hercules, Estados Unidos), Biomerieux (Marcy l'Etoile, Francia).

45 Los diferentes discos de antibióticos utilizados para realizar el antibiograma en fase sólida en agar llevan los nombres de los antibióticos en forma de abreviaturas estandarizadas en forma de un código de 1 a 3 letras escrito en la cara superior de la pastilla.

La lectura de los resultados consiste esencialmente en medir los diámetros de los halos (zonas de inhibición del crecimiento de la cepa microbiana). Cuanto mayor sea el diámetro de inhibición, más sensible será la bacteria al antibiótico analizado y viceversa. Las dosificaciones de las pastillas se determinan para permitir obtener diámetros de halo proporcionales a las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) del antibiótico en cuestión con respecto a las bacterias probadas.

50 El diámetro de inhibición se mide en mm ya sea manualmente con una regla o con un lector que permite leer el diámetro automáticamente. Este lector automático incluye un escáner equipado con un aparato fotográfico y un detector de pastillas de antibióticos y de zonas de inhibición situadas alrededor de estos discos.

Los antibiogramas realizados por difusión en medio agar se interpretan según las recomendaciones de los sistemas expertos del EUCAST y/o del CA-SFM.

60 Para la interpretación, existen diferentes tablas o gráficos dependiendo de las bacterias y antibióticos donde aparecen concentraciones críticas inferiores y respectivamente superiores así como los diámetros críticos superiores e inferiores respectivamente de la zona de inhibición para una determinada concentración de dicho antibiótico en la pastilla. Cada antibiótico presenta con respecto a cada bacteria:

65 - una concentración crítica inferior (y un diámetro crítico superior) por debajo de la cual (y por encima de la cual, respectivamente) la bacteria se considera sensible al antibiótico determinado (indicado con la letra S), y

- una concentración crítica superior (y un diámetro crítico inferior) por encima de la cual (y por debajo de la cual, respectivamente) la bacteria se considera resistente al antibiótico determinado (indicado por la letra R), y

- 5 - entre las dos concentraciones, la bacteria se denominará intermedia (indicado con la letra I).

De este modo, cada bacteria con respecto a cada antibiótico, se caracteriza con S, I o R con respecto a una determinada bacteria. Para saber si la bacteria es resistente a una determinada familia de antibióticos, la mayoría de las veces se considera que basta con probar solo uno de esta familia para conocer su perfil. Por tanto, la medición de un diámetro de inhibición permitirá interpretar una clase terapéutica de antibióticos. Sin embargo, una sola familia de antibióticos no es suficiente para conocer el fenotipo completo de la bacteria en términos de resistencia o de sensibilidad a los diferentes antibióticos. Por esta razón, en un antibiograma se prueba una pluralidad de antibióticos depositando una pluralidad de pastillas que contienen antibióticos de diferentes clases o familias o subfamilias para obtener un fenotipo de resistencia o sensibilidad a las diferentes familias o subfamilias de antibióticos.

El antibiograma permite al médico elegir el antibiótico adecuado o la asociación de antibióticos para tratar eficazmente a un paciente.

Para poder conocer el fenotipo completo de una cepa bacteriana determinada, por tanto, es necesario probar diferentes antibióticos que pertenezcan a diferentes clases, familias o subfamilias terapéuticas y cuyos mecanismos de resistencia más frecuentes sean conocidos. A continuación, se enumeran los principales antibióticos (con sus códigos entre paréntesis) pertenecientes a cada una de las siguientes familias o subfamilias:

1) Familia: B-Lactámicos:

1.1) Subfamilias de penicilinas:

1.1.1) Penicilinas del grupo G: Penicilina G (P),

1.1.2) Penicilinas M: Oxacilina (OX u OXA),

1.1.3) Penicilinas o aminopenicilinas del grupo A: Amoxicilina (AMX) y Ampicilina (AM);

1.1.4) Penicilinas de muy amplio espectro antibacteriano:

- inhibidor de beta-lactamasa: asociación de amoxicilina + ácido clavulánico (AMC)
- Carboxipenicilinas: Ticarcilina (TIC), asociación de ticarcilina + ácido clavulánico (TCC),
- Ureidopenicilinas: asociación de Piperacilina + Tazobactam (TZP),

1.2) Subfamilias de cefalosporinas:

1.2.1) Cefalosporinas de 1.^a generación: Cefalotina (CF),

1.2.2) Cefalosporinas de 2.^a generación: Cefoxitina (tipo cefamicinas)(FOX), Cefuroxima (CXM),

1.2.3) Cefalosporina de 3.^a generación: Ceftriaxona (CRO), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ),

1.2.4) Cefalosporinas de 4.^a generación de espectro extendido: Cefepima (FEP), Cefpiroma (CPO),

1.3) Subfamilia de monobactamas: Aztreonam (ATM),

1.4) Subfamilias de carbapenémicos: Imipenem (IMP o IPM) y Ertapenem (ERT),

2) Familia de las quinolonas:

2.1) Quinolonas de 1.^a generación: Ácido nalidíxico (NA),

2.2) Quinolonas de 2.^a generación del tipo fluoroquinolonas: Ciprofloxacina (CIP), Ofloxacina (OFX), Pefloxacina (PEF), Levofloxacina (LVX), Moxifloxacina (MXF), Norfloxacina (NOR),

3) Familia de aminoglucósidos: Gentamicina (GEN o GM), Amikacina (AK o AN), Tobramicina (TOB o TM), Kanamicina (K),

4) Familia de las rifamicinas: Rifampicina (RA),

5) Familia de glicopéptidos: Vancomicina (VA o VAN) y Teicoplanina (TEC),

6) Familia de Sulfonamidas y diaminopirimidinas: asociación de Trimetoprima + sulfametoxazol = Cotrimoxazol (SXT),

7) Familia de macrólidos: Eritromicina (E), Telitromicina (TEL),

8) Familia de las lincosamidas: lincomicina (LIN) y clindamicina (CLI o DA),

9) Familia de las Sinergistinas o Estreptograminas: Pristinamicina (PT),

10) Familia de las tetraciclinas: Doxiciclina (DO o TE),

11) Familia de las polimixinas o polipéptidos cíclicos: Colistina (COL o CS),

12) Familia de los furanos: nitrofurano-furano (FT) - Nitrofurantoína (FUR o NT),

13) Familia de los fenicolados: Cloranfenicol (C),

14) Familia de las fusidaninas: Ácido fluídico (FA),

15) Familia de los antibióticos fosfónicos: Fosfomicina (FF o FOS),

16) Familia de las oxazolidinonas: Linezolid (LNZ),

17) Familia de Lipopéptidos cíclicos: Tigeciclina (TGC).

La interpretación de los resultados mediante tablas o gráficos de datos indica para las diferentes bacterias los diámetros críticos correspondientes a las concentraciones críticas para pastillas que contienen determinadas concentraciones de antibióticos o una asociación de determinados antibióticos, procedentes de organismos oficiales como el CA-SFM (Comité de Antibiógramas de la Sociedad Francesa de Microbiología) o el EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing*), como se ha descrito anteriormente, es un procedimiento largo y complejo que representa una limitación importante.

En el estado de la técnica (1-6), se conocen diferentes técnicas automatizadas de análisis de antibiógramas que implican la adquisición de imágenes de la zona de los discos de difusión alrededor de los antibióticos en un sustrato, tal como una pastilla mediante un software que calcula el diámetro de dichas zonas de difusión y lo compara con el diámetro de referencia obtenido por los métodos estándar que utilizan calibres (el llamado método "NCCLS"). Se puede hacer referencia en particular al documento Salgado et al, "Automatic antibiograms inhibition halo determination through texture and directional filtering analysis", 2001, Institute of electrical and electronics engineers, páginas 629-632 que describe un método de análisis e interpretación automatizada de un antibiograma de una muestra bacteriana que implica la adquisición de imágenes del área de los discos de difusión alrededor de los antibióticos de una pastilla mediante un software para calcular el diámetro de los halos de difusión.

Objeto de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método más sencillo de realizar y más fiable, que permita prescindir de la lectura e interpretación de los diámetros de los halos de las zonas de inhibición alrededor de las pastillas una por una según los criterios desarrollados por el CA -SFM (Comité de Antibiógramas de la Sociedad Francesa de Microbiología) o el EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing*).

Se descubrió según la presente invención que las imágenes de diferentes antibiógramas podrían ser características de un fenotipo y que un fenotipo de resistencia de bacteria con respecto a los antibióticos puede reconocerse mediante comparación de fotografías mediante un banco de imágenes fotográficas del antibiograma de referencia sin necesidad de interpretarlas según los datos de interpretación del EUCAST o CA-SFM; y esto, aunque existen diferencias de diámetros o de formas entre 2 imágenes globales de antibiógramas de diferentes fotografías de un mismo fenotipo; siempre que para un determinado fenotipo, se disponga de una colección de fotografías de varias bacterias de la misma especie y del mismo fenotipo.

Más precisamente, para ello, la presente invención proporciona un método de análisis y de interpretación automatizada de un antibiograma de una muestra de microorganismo que se va a analizar, preferentemente una bacteria, que permite determinar un fenotipo de resistencia o de sensibilidad a al menos un compuesto antimicrobiano, preferentemente una pluralidad de compuestos antimicrobianos, preferentemente compuestos antibióticos, seleccionándose dicho fenotipo entre una pluralidad de fenotipos de referencia diferentes para cada una de las especies de microorganismos de referencia de una pluralidad de especies de microorganismos de referencia

diferentes en el que:

- 5 a) el antibiograma de la muestra del microorganismo que se va a analizar, preferentemente perteneciente a una de dichas especies de microorganismos de referencia, se lleva a cabo según una metodología determinada en un medio de cultivo sólido, metodología que comprende:
- una concentración de microorganismo, preferentemente de bacteria (UFC/ml), determinada a partir de la muestra de microorganismo, preferentemente de bacteria, depositada sobre dicho medio de cultivo sólido,
 - 10 - un número n determinado de una pluralidad de sustratos, preferentemente $n = 5$ a 20 , más preferentemente $n = 6$ a 16 , una disposición determinada y una forma determinada de sustratos, preferentemente en forma de pastillas, conteniendo cada uno(a) de ellos(as) una concentración determinada de compuesto(s) antimicrobiano(s) determinado(s) y capaces de difundir uno o más compuesto(s) antimicrobiano(s) determinado(s) diferente(s) para cada uno de los n dichos sustratos depositados sobre dicho medio de cultivo sólido, y
 - 15 - condiciones y duración de incubación determinadas de la muestra de microorganismo depositada sobre dicho medio de cultivo sólido, preferentemente de 18 a 24 horas a una temperatura de 35 a 37 °C, y
 - 20 b) se adquiere una imagen fotográfica del antibiograma obtenido en la etapa a), preferentemente utilizando un dispositivo de captura de imagen fotográfica que comprende un escáner y un aparato fotográfico, y
 - 25 c) se determina dicho fenotipo de la muestra de microorganismo que se va a analizar, preferentemente de bacteria, sin medir directamente los diámetros de inhibición en el antibiograma, comparando con un software de reconocimiento de imagen, la imagen fotográfica obtenida en la etapa b) con imágenes de referencia de antibiogramas de referencia, de una base de datos constituida por dichas imágenes de referencia, de tal manera que dicha base de datos comprenda una pluralidad de al menos p imágenes de referencia diferentes de antibiogramas de p cepas diferentes del mismo microorganismo para cada fenotipo de referencia de cada especie de microorganismo de referencia, siendo preferentemente p al menos igual a 5 , siendo más preferentemente p al menos igual a 10 .
 - 30

Preferentemente todos los antibiogramas de referencia se realizan según la misma metodología que el antibiograma que se va a analizar.

- 35 Preferentemente, las imágenes de referencia y la imagen que se va a analizar se realizan con el mismo dispositivo de captura de imagen fotográfica y en las mismas condiciones, notablemente la misma distancia, mismo brillo, mismo fondo, preferentemente un fondo plano, negro y la misma resolución.

Se entiende que:

- 40 - los antibiogramas de referencia se realizan según la misma metodología que el antibiograma que se va a analizar en términos de número, disposición y forma de las pastillas, así como concentración bacteriana y condiciones de incubación, excepto que tienen pastillas que contienen compuestos antibióticos y/o concentraciones de compuestos antibióticos que son al menos parcialmente diferentes para los diferentes fenotipos de referencia, y
- 45 - los fenotipos de referencia de las diferentes cepas de referencia de cada especie de bacterias de referencia en dicha base de datos se determinan manualmente mediante los métodos estándar habituales midiendo el diámetro del halo de la zona de inhibición del crecimiento alrededor de las pastillas de antibióticos y utilizando gráficos que indican los valores de diámetro críticos correspondientes a las concentraciones críticas inferiores y a las concentraciones críticas superiores para una determinada concentración de antibiótico(s) en dicha pastilla, lo que permite clasificar la bacteria de la muestra analizada como:
- 50 - sensible al antibiótico o combinación de antibióticos contenido en dicha pastilla, si el diámetro del halo de inhibición que rodea la pastilla es superior al diámetro correspondiente a la concentración crítica inferior,
- 55 - resistente al antibiótico o combinación de antibióticos contenido en dicha pastilla, si el diámetro del halo de inhibición que rodea la pastilla es inferior al diámetro correspondiente a la concentración crítica superior, e
- 60 - intermedia respecto al antibiótico o combinación de antibióticos contenido en dicha pastilla, si el diámetro del halo de inhibición que rodea la pastilla está comprendido entre los valores de diámetros críticos correspondientes a las concentraciones críticas inferiores y concentraciones críticas superiores;
- 65 - la comparación de la imagen fotográfica obtenida en la etapa b) con dichas imágenes de referencia permite determinar el fenotipo de la muestra de bacteria que se va a analizar como dicho fenotipo de referencia de una especie de bacteria de referencia si la imagen fotográfica obtenida en la etapa b) es idéntica o al menos suficientemente similar a las de dicha imagen de referencia correspondiente a dicho fenotipo de referencia de una

especie de bacteria de referencia. Se puede determinar experimentalmente una tasa mínima de similitud utilizando la pluralidad de imágenes de referencia correspondientes al mismo fenotipo de la misma especie de bacteria de referencia.

- 5 El método según la invención procede instantáneamente mediante el reconocimiento global de imágenes sin el cálculo de los diferentes diámetros de halos como se hace manualmente en el método clásico de interpretación de antibiogramas. Los inventores han descubierto que, a pesar de que el diámetro del halo de inhibición puede variar dentro de un intervalo de valores dentro del mismo fenotipo en relación con el antibiótico en cuestión, en la práctica, el análisis de múltiples zonas o halos combinado con la multiplicidad de imágenes de referencias relacionadas con el mismo fenotipo permite una interpretación correcta del antibiograma.

Otra ventaja del método según la presente invención es que permite detectar y tener en cuenta automáticamente los llamados fenotipos de sinergia entre dos antibióticos contenidos en dos pastillas diferentes dispuestos uno al lado del otro, normalmente resistentes con respecto a esta cepa. Las sinergias se generan con el método sobre agar por difusión de los antibióticos sobre este agar porque si la distancia entre los 2 antibióticos es lo suficientemente cercana (entre 2-2,5 cm para las bacterias Gram negativas) podrán difundirse sobre una parte común del agar y, por tanto, es la asociación de los 2 antibióticos en este lugar preciso lo que permite, si procede, visualizar la aparición de una nueva zona de inhibición que es la zona de sinergia.

20 En este caso de sinergia, en efecto, es posible visualizar mecanismos de sinergias entre dos antibióticos porque aparece una zona de inhibición adicional, generalmente entre los dos antibióticos en cuestión. Puede tratarse de un aumento del diámetro alrededor del disco A hacia el disco B si A y B presentan una sinergia entre ellos. Proporcionando una zona de inhibición de forma aproximadamente ovalada llamada "corcho de champán" entre los dos halos alrededor de las pastillas A y B. En el futuro se podrían descubrir nuevas sinergias; la falta de similitud de una imagen de sinergia si es nueva podría detectarse utilizando el método según la invención.

Preferentemente, en la etapa c), se compara con el software de reconocimiento de imagen, la forma del contorno de los halos correspondientes a las zonas de inhibición alrededor de los sustratos, preferentemente de las pastillas, de antibióticos y preferentemente también las letras de los códigos y cifras de dosificación de antibióticos indicados en las pastillas de antibióticos, y más preferentemente el software reconoce el orden en el que están dispuestas las pastillas.

Los software de este tipo se utilizan para reconocer una especie de planta mediante el análisis de la imagen del contorno de su hoja. Se conoce también un software de reconocimiento de imágenes de libre acceso, denominado XnView, que se describe a continuación y que también es especialmente adecuado en este caso porque tiene en cuenta la variación de las características determinantes, a saber, los diferentes diámetros de los diferentes halos, por un lado, y, por otro lado, de su posible superposición en forma de zona de sinergia.

Más particularmente, se determina un porcentaje mínimo admisible de similitud entre una imagen que se va a analizar y una imagen de referencia, en lo sucesivo denominado umbral de similitud, de modo que se determinará que la bacteria de la muestra que se va a analizar presenta dicho fenotipo de referencia de dicha bacteria de referencia si el software de reconocimiento evalúa un porcentaje de similitud entre la imagen del antibiograma de la bacteria de la muestra que se va a analizar y una imagen de referencia correspondiente a dicho fenotipo de referencia de dicha especie de bacteria de referencia, al menos igual a un porcentaje de similitud de umbral mínimo admisible, preferentemente un porcentaje de similitud de umbral mínimo admisible de al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %.

El software de reconocimiento permite determinar dicho porcentaje de similitud mínimo admisible entre una imagen que se va a analizar y una imagen de referencia, en lo sucesivo denominado umbral de similitud.

En un modo de realización, por lo tanto, se puede determinar un umbral de similitud común aplicable a todos los fenotipos de referencia.

En otro modo de realización, se determina un porcentaje de similitud mínimo admisible entre dichas diferentes imágenes de referencia de los diferentes antibiogramas de las p cepas diferentes, para cada fenotipo de referencia de cada especie de bacteria de referencia, en lo sucesivo denominado umbral de similitud de referencia, preferentemente se determina un porcentaje de umbral de similitud de referencia, correspondiente al porcentaje más bajo de similitud entre las dos imágenes de referencia más distintas para cada fenotipo de referencia de cada especie de bacteria de referencia, de modo que se determinará que la bacteria de la muestra que se va a analizar presenta dicho fenotipo de referencia de dicha bacteria de referencia si el software de reconocimiento evalúa un porcentaje de similitud al menos igual a dicho umbral de similitud de referencia entre la imagen del antibiograma de la bacteria de la muestra que se va a analizar y una imagen de referencia correspondiente a dicho fenotipo de referencia de dicha especie de bacteria de referencia.

En una variante de realización, dicho fenotipo de referencia es una clasificación de resistencia o sensibilidad para un antibiótico o asociación de antibióticos determinados.

En esta variante, el antibiograma puede ser una prueba electrónica, el software puede leer los valores de CMI mencionados en tiras que contienen un gradiente de concentración de un solo antibiótico, siendo el CMI el valor en el extremo más estrecho del halo ovalado que rodea la tira. El procedimiento según la invención permite evitar errores frecuentes en la lectura del CMI a simple vista de los operadores.

En otra realización alternativa, el fenotipo de referencia es una clasificación de resistencia o sensibilidad para una pluralidad de antibióticos y/o asociaciones de antibióticos, preferentemente en sustratos en forma de pastillas.

Preferentemente, dicho fenotipo de referencia comprende un fenotipo de sinergia entre dos antibióticos correspondientes a dos antibióticos para los cuales la bacteria de referencia es resistente cuando se toman por separado y para los cuales la bacteria de referencia es sensible cuando se toman en asociación. Este fenotipo de sinergia se reconoce por la aparición de una zona de inhibición en el espacio entre dos pastillas correspondientes a dos antibióticos a los que la bacteria de referencia es resistente.

Más particularmente, dichas especies de bacterias de referencia se eligen entre las bacterias más comunes, a saber, representan aproximadamente el 80 % de las bacterias responsables de las patologías humanas más comunes, que comprende al menos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Más particularmente aún, los antibiogramas se elaboran a partir de pastillas que contienen los siguientes antibióticos y con los siguientes marcados correspondientes a los siguientes antibióticos: AMX para amoxicilina; AMC para amoxicilina-ácido clavulánico; GEN para gentamicina; SXT para trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol); TIC, para ticarcilina; TCC para ticarcilina-ácido clavulánico; TZP para piperacilina-tazobactam; CAZ para ceftazidima; IMP para imipenem; COL o CL para colistina; FOX para cefoxitina; VPN o VA para vancomicina; TEC para teicoplanina; CLI o DA para clindamicina; CRO para ceftriaxona; FEP para cefepima; L o LIN para lincomicina; FUR o NT para nitrofurantoína, CIP para ciprofloxacina; OFX para ofloxacina; CTX para cefotaxima; AK o AN para amikacina; TOB o TM para tobramicina; FOX para cefoxitina; ATM para aztreonam; ERT para ertapenem; FF o FOS para fosfomicina; DO para doxiciclina; K para kanamicina; L o LIN para lincomicina; LNZ para linezolid; NA para ácido nalidíxico; NOR para norfloxacina; MET para metronidazol; MEM para meropenem; PT para pristamicina; P para penicilina G; RA para rifampicina; TGC para tigeciclina; TEL para telitromicina; E para eritromicina, OX u OXA para oxacilina.

Más particularmente aún, los inventores han determinado fenotipos de referencia particulares, más particularmente adecuados para probar bacterias responsables de patologías humanas detectables en particular en la orina y tratadas con los antibióticos anteriores, siendo el fenotipo de referencia una clasificación de resistencia o elegida entre al menos los siguientes fenotipos:

- Fenotipo denominado "silvestre": bacteria que no tiene ninguna resistencia adquirida a los antibióticos, dicha bacteria puede poseer resistencias naturales,
- Fenotipo denominado "penicilinasa de bajo nivel": bacteria que produce una penicilinasa capaz de inhibir el crecimiento bacteriano mediante bajas concentraciones de antibióticos de la familia de las penicilinas, a saber, concentraciones inferiores a 8 mg/l.
- Fenotipo denominado "penicilinasa resistente a inhibidores": bacteria que produce una penicilinasa resistente a todos los inhibidores de penicilinasa capaces de inactivar esta enzima;
- Fenotipo denominado "penicilinasa de alto nivel": bacteria que produce una penicilinasa capaz de inhibir el crecimiento bacteriano mediante altas concentraciones de antibióticos de la familia de las penicilinas, a saber, concentraciones superiores a 8 mg/l.
- Fenotipo denominado "Betactamasa de Espectro Extendido" (BLEE): bacteria productora de Beta-lactamasa;
- Fenotipo denominado "Cefalosporinasa de alto nivel": bacteria que produce una cefalosporinasa capaz de inhibir el crecimiento bacteriano mediante altas concentraciones de antibióticos de la familia de las cefalosporinas, a saber, concentraciones superiores a 2 mg/l.
- Fenotipo denominado "Carbapenemasa": bacteria productora de una carbapenemasa;
- Fenotipo denominado "permeabilidad selectiva al imipenem": la bacteria posee una sensibilidad intermedia al imipenem;
- "Resistencia a la meticilina" (antiguo nombre de una penicilina del grupo M, actualmente reemplazada por la oxacilina que es una penicilina perteneciente a la subfamilia de penicilinas del grupo M) bacteria resistente a la meticilina (= resistentes a la oxacilina) mediante la adquisición de una nueva diana carente de afinidad por los B-

lactámicos (PLP2a);

- Fenotipo denominado "resistencia a las fluoroquinolonas": bacteria cuyo crecimiento no se inhibe en presencia de compuestos antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas,
- Fenotipo denominado "resistencia a los aminoglucósidos": bacteria cuyo crecimiento no se inhibe en presencia de compuestos antibióticos de la familia de los aminoglucósidos,
- Fenotipo denominado "resistencia a los macrólidos": bacteria cuyo crecimiento no se inhibe en presencia de compuestos antibióticos de la familia de los macrólidos,
- Fenotipo denominado "resistencia al cotrimoxazol": bacteria cuyo crecimiento no se inhibe en presencia de cotrimoxazol,
- fenotipo denominado "resistencia a la rifampicina": bacteria cuyo crecimiento no se inhibe en presencia de rifampicina,
- Fenotipo denominado "fenotipo atípico": fenotipo que no se conoce o no es determinable.

Una penicilinas es una enzima capaz de destruir (hidrolizar) la penicilina y volverla inactiva contra las bacterias.

Una cefalosporinasa es una enzima capaz de destruir (hidrolizar) las cefalosporinas y hacerlas inactivas contra las bacterias.

Una carbapenemasa es una enzima capaz de destruir (hidrolizar) los carbapenems y volverlos inactivos contra las bacterias.

Una beta-lactamasa es una enzima capaz de hidrolizar las penicilinas, cefalosporinas y monobactamas, tal como el aztreonam, pero no carbapenems ni cefamicinas, tal como cefoxitina.

Más particularmente aún, el antibiograma analizado y/o dicha base de datos incluye los fenotipos de referencia para las especies de bacterias de referencia correspondientes a las siguientes resistencias (I,R) o sensibilidades (S) con respecto a las concentraciones de los 6 compuestos antibióticos elegidos de los siguientes grupos a1) a a6), preferentemente dispuestos en círculo en el siguiente orden para cada grupo:

a1) AMX, AMC, TCC, CRO, FEP e IMP,

a2) AMX, AMC, TZP, CRO, FEP e IMP,

a3) AMC, TZP, CRO, PEP, IMP y COL,

a4) AMX, GEN, LIN, FUR, VAN y TEC,

a5) TIC, TCC, TZP, PEP, CAZ e IMP,

a6) FOX, CLI, SXT, GEN, VAN y TEC.

Estos grupos a1) a a6) son especialmente relevantes en relación con los siguientes fenotipos de las bacterias enumeradas anteriormente:

- Fenotipo "silvestre",
- Fenotipo "Penicilinas de bajo nivel",
- Fenotipo "Penicilinas resistente a inhibidores",
- Fenotipo "Penicilinas de alto nivel",
- Fenotipo "Beta-Lactamasa de Espectro Extendido" (BLEE),
- Fenotipo "Cefalosporinas de alto nivel",
- Fenotipo "Carbapenemasa",
- Fenotipo "Permeabilidad selectiva al imipenem",

- "Resistencia a la meticilina", y
- Fenotipo "Fenotipo atípico".

5 Más particularmente aún, el antibiograma analizado y/o dicha base de datos incluye los siguientes fenotipos de referencia para las siguientes especies de bacterias de referencia correspondientes a las siguientes resistencias (I/R)/o sensibilidades (S) con respecto a los 16 compuestos antibióticos elegidos de los siguientes grupos b1) y b2), preferentemente cuyas pastillas están dispuestas en una cuadrícula en el siguiente orden desde la primera fila a la derecha con 4 filas de 4 compuestos alineados en columnas para cada grupo:

10

b1) CIP, OFX, TIC, COL, IMP, CTX, TCC, AK, SXT, AMC, CRO, TOB, AMX, ATM, FOX y GEN,

b2) SXT, DA, FOX, OXA, PT, GEN, CIP, RA, TEC, VAN, LNZ, FF, TOB, E, DO y NT.

15 Estos grupos b1 y b2 son más particularmente relevantes con respecto a los siguientes fenotipos de las bacterias enumeradas anteriormente:

- Fenotipo "silvestre",
- 20 - Fenotipo que asocia "penicilinasa de alto nivel" + "resistencia a las fluoroquinolonas" + "resistencia al cotrimoxazol" + "resistencia a los aminoglucósidos", y
- Fenotipo que asocia "cefalosporinasa" + "resistencia a las fluoroquinolonas" + "resistencia al cotrimoxazol" + "resistencia a los aminoglucósidos", y
- 25 - Fenotipo que asocia "cefalosporinasa" + "resistencia al cotrimoxazol" + "resistencia a los aminoglucósidos", y
- Fenotipo que asocia "Resistencia a la meticilina" + "resistencia a las fluoroquinolonas" + "resistencia a la rifampicina" + "resistencia a los macrólidos" + "resistencia a los aminoglucósidos".

30

Estos fenotipos de referencia a las 16 pastillas anteriores son más particularmente útiles para las llamadas infecciones profundas como la septicemia.

35 Más particularmente aún, en la etapa a), se realizan los antibiogramas de referencia y la muestra bacteriana que se va a analizar, según una metodología determinada en un medio de cultivo sólido como el agar Muller-Hinton, que comprende:

- un número (n), de 6 a 16 pastillas en forma de discos, en concentraciones de antibióticos de 1 a 300 ug, dispuestas en un círculo o cuadrícula,
- 40 - una concentración bacteriana (UFC/ml) determinada de la muestra que se va a analizar o de referencia depositada sobre dicho medio de cultivo sólido, correspondiente a una turbiedad de la suspensión depositada correspondiente al patrón de 0,5 en la gama McFarland, y
- 45 - condiciones y duración de la incubación determinada preferentemente entre 18 y 24 horas a 37 °C.

Más particularmente aún, las pastillas están dispuestas en círculo, en el número de 6, sobre un medio de cultivo o dispuestas regularmente en cuadrícula en placas de forma cuadrada, preferentemente 16 en total.

50 Descripción de las figuras

Otras características y ventajas de la presente invención serán más evidentes tras la lectura de la descripción que sigue, realizada de manera ilustrativa y no limitante, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- 55 - las figuras 1A y 1B muestran el principio de reconocimiento de un contorno de imagen global de un antibiograma; la Figura 1A muestra el contorno general de todas las zonas de inhibición 1 a 6 de la imagen de la Figura 1B;
- las figuras 2A a 2C representan imágenes fotográficas de los antibiogramas de las cepas *E. coli* de fenotipo BLEE reconocido como perteneciente al mismo fenotipo con una tasa de similitud del 87 al 100 % mediante el procedimiento según la invención,
- 60 - las figuras 2D y 2E representan imágenes fotográficas de antibiogramas de cepas de *E. coli* de fenotipo de cefalosporinasa reconocido como perteneciente al mismo fenotipo con una tasa de similitud del 75 % mediante el procedimiento según la invención,
- 65 - las figuras 3A y 3B muestran dos fotografías de antibiogramas de 2 cepas de *Escherichia coli* productoras de

penicilinasas de alto nivel y reconocidas como tales con una tasa de similitud del 80 % mediante el procedimiento según la invención,

- las figuras 4A y 4B muestran fotografías de antibiogramas de fenotipos no reconocidos como pertenecientes al mismo fenotipo mediante el procedimiento según la invención, mostrando la figura 4A una cepa de *E. coli* sensible a todos los antibióticos y la figura 4B, una cepa de *E. coli* resistente a todos los antibióticos.
- la figura 5 representa una imagen de una zona de sinergia en forma de corcho de champán (A) para una cepa de *E. coli* de fenotipo BLEE entre las dos pastillas AMC y CRO;
- las figuras 6A y 6B muestran fotografías de antibiogramas dispuestos en un cuadrado de 2 cepas de *K. pneumoniae* del mismo fenotipo de cefalosporinasa reconocido como tal con una tasa de similitud del 88 % mediante el procedimiento según la invención.

Descripción detallada de la invención

Las recomendaciones actuales del comité de expertos son folletos de aproximadamente 100 páginas que incluyen la interpretación SIR de decenas de antibióticos para las especies bacterianas más comunes. Para una determinada clase de antibiótico, el biólogo puede decidir probar uno o más antibióticos propuestos en estas recomendaciones. En la práctica, sólo unos pocos antibióticos son claves para la interpretación y, sobre todo, son útiles para el médico que, por ejemplo, si quiere utilizar una penicilina para tratar a su paciente, sólo utilizará una molécula de esta lista. En el ejemplo ilustrativo siguiente, los inventores determinaron 6 antibióticos representativos de los demás, para determinar determinados fenotipos de las 10 bacterias más extendidas en patología humana.

1) Realización del antibiograma.

Los antibiogramas se realizaron según la siguiente metodología estándar.

1.1) preparación de muestras bacterianas

La preparación del inóculo consiste en realizar una suspensión bacteriana directamente a partir de colonias puestas en solución en tubos de agua esterilizada para que la solución presente una turbidimetría determinada con un espectrofotómetro, precisa equivalente a la del patrón 0,5 de la gama de McFarland. Esta concentración de suspensión bacteriana está estandarizada porque un inóculo más concentrado genera diámetros de zona de inhibición más pequeños y viceversa.

Este inóculo corresponde a concentraciones de aproximadamente 108 UFC/ml para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Estas son las 10 especies bacterianas que se encuentran con mayor frecuencia en las patologías humanas.

1.2). La muestra bacteriana se coloca sobre un medio de cultivo sólido en una placa de Petri de 90 mm de diámetro o en una placa cuadrada de 120 mm compuesta por agar Mueller-Hinton específico para antibiogramas (EUCAST). Debe emplearse idealmente dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación de la suspensión.

La siembra se realiza por el método de difusión sobre medio agar mediante inundación en la que se añade la suspensión bacteriana en exceso al agar Mueller-Hinton. Después de la homogeneización, el exceso de líquido se desecha para evitar la sobreinoculación de las placas. Es necesario esperar previamente a que la superficie de los agares esté seca para eliminar cualquier rastro de humedad que favorezca la invasión bacteriana.

El depósito de los discos de pastillas de antibióticos debe realizarse dentro de los 15 minutos posteriores a la inoculación del agar. La deposición de los discos impregnados de antibiótico se realiza mediante un dispensador automático que coloca firmemente los discos sobre la superficie del agar inoculado y seco. El número de discos depositados por placa está limitado debido a la superposición de zonas de inhibición y para limitar las interferencias entre los antibióticos. Es importante que los diámetros de inhibición sean mensurables. A continuación, los antibiogramas se incuban a 37 °C durante 18 a 24 horas.

Las pastillas de antibióticos están hechas de papel absorbente de alta calidad y miden 6 mm de diámetro impregnadas con concentraciones de antibióticos de aproximadamente 1 µg a 300 µg, dependiendo de los antibióticos.

En los siguientes ejemplos, se utilizan discos de referencia comercializados por las empresas i2a (Montpellier, Francia), BD (Becton Dickinson, Estados Unidos), Bio-Rad (Hercules, Estados Unidos), Biomerieux (Marcy l'Etoile, Francia) que contienen los siguientes antibióticos y llevan los siguientes códigos y dosis: AMX (Amoxicilina) de 25 µg; AMC (Amoxicilina-ácido clavulánico) de 20-10 µg; GM para gentamicina 15 µg; SXT (Trimetoprima-sulfametoxazol) de 1,25/23,75 µg; TIC (Ticarcilina) de 75 µg; TCC (Ticarcilina-ácido clavulánico) de 75/10 µg; TZP (Piperacilina-tazobactam) de 75/10 µg; CAZ (Ceftazidima) de 30 µg; IMP o IPM (Imipenem) de 10 µg; COL (Colistina) de 50 µg;

FOX (Cefoxitina) de 30 µg; VAN (Vancomicina) de 30 µg; TEC (Teicoplanina) de 30 µg; CLI o DA (Clindamicina) de 2 µg; CRO (Ceftriaxona) de 30 µg; CIP (Ciprofloxacina) de 5 µg; OFX (Ofloxacina) de 5 µg; CTX (Cefotaxima) 5 µg; AN o AK (Amikacina) de 30 µg; TM (Tobramicina) de 10 µg; FOX (Cefoxitina) 30 µg; ATM (Aztreonam) de 30 µg; ERT (Ertapenem) de 10 µg; FF (Fosfomicina) de 200 µg; DO (Doxiciclina) de 30 µg; K (Kanamicina) de 1000 µg; L (Lincomicina) de 15 µg; LNZ (linezolid) de 10 µg; AN (Ácido Nalidíxico) de 30 µg; NOR (Norfloxacina) de 10 µg; PT (Pristinamicina) de 15 µg; RA (Rifampicina) de 5 µg; y E (Eritromicina) de 15 µg.

Más precisamente, preparamos el agar de la siguiente manera:

- 10 - se siembra el agar con 1 ml de suspensión y se extiende el volumen con un rastrillo desde el centro hacia los bordes hasta inocular toda la superficie;
- se deja secar de 3 a 5 minutos;
- 15 - se colocan los discos de antibióticos en el fondo de la placa (en el borde mínimo); dividiendo la placa tantas veces (máximo 6 en círculo para una placa de 90 mm, o 16 para una placa de 120 mm) como pastillas hay, ya sea espaciados regularmente dispuestos en un círculo o en una cuadrícula espaciadas de 2,5 cm para placas redondas y 3 cm para placas cuadradas.
- 20 - se deja incubar durante 18 a 24 horas a 37 °C.

2) Lectura e interpretación de los antibiogramas:

25 Después del tiempo de incubación, se ven aparecer halos alrededor de los discos de antibióticos. Estas zonas corresponden a los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano. De hecho, por cada antibiótico presente en el agar, debido al gradiente de concentración de antibiótico, hay una zona donde se inhibe el crecimiento como se explicó anteriormente. Los halos de inhibición aparecen más oscuros porque las fotografías están tomadas sobre un fondo negro y por tanto el contraste es mayor en zonas donde no ha habido crecimiento bacteriano.

30 Para constituir un banco de antibiogramas de referencia que pueda usarse para constituir una base de datos de imágenes de referencia de fenotipos de referencias para las bacterias de referencia, los diámetros de los halos se midieron manualmente y se utilizaron las tablas y gráficos para su interpretación, tal como la Tabla A a continuación.

35 2.1) Si se toma el ejemplo de *Escherichia coli*, por ejemplo, se busca conocer su sensibilidad con respecto a diferentes carbapenems, incluyendo el imipenem, que se puede encontrar en la siguiente tabla a partir de las recomendaciones del EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*: www.eucast.org) [1] y el CA -SFM (Comité de Antibiogramas de la Sociedad Francesa de Microbiología: www.sfm-microbiologie.org):

Tabla A

Carbapenems	Concentraciones críticas (mg/l)		Carga del disco (µg)	Diámetros críticos (mm)	
	S≤	R>		S≥	R<
Doripenem	1	2	10	24	21
Ertapenem	0,5	1	10	25	22
Imipenem	2	8	10	22	16
Meropenem	2	8	10	22	16

40 Para una dosis de 10 µg de antibiótico, los diámetros críticos en mm están comprendidos entre < 16 y ≥ 22 mm, lo que significa que si el diámetro es mayor o igual a 22 mm la cepa es sensible al imipenem, si el diámetro está comprendido entre 16 y estrictamente inferior a 22 mm, la cepa posee una sensibilidad intermedia al antibiótico dado y si el diámetro es estrictamente inferior a 16 mm, la cepa es resistente al imipenem.

45 2.2) Por tanto, con 206 muestras bacterianas de las bacterias de referencia y pastillas de antibióticos enumerados en la Tabla B (con 6 pastillas de 6 antibióticos diferentes) a continuación, se desarrolló un banco de muestras de bacterias de referencia con los siguientes fenotipos de referencia enumerados en la Tabla C1 a continuación.

50 Tabla B

Bacteria (número de cepas)	Panel de los 6 antibióticos de concentraciones fijas					
<i>E. coli</i> (42)	AMX 25 µg AMC 20/10 µg	AMC 20/10 µg TZP 75/10 µg	TCC 75/10 µg CRO 30 µg	CRO 30 µg FEP 30 µg	FEP 30 µg IMP 10 µg	IMP 10 µg COL 50 µg
<i>P. Mirabilis</i> (16)						
<i>K. pneumonia</i> (38)						
<i>K. oxytoca</i> (6)						
<i>E. cloacae</i> (8)						
<i>E. aerogenes</i> (11)						

<i>P. aeruginosa</i> (.35)	TIC 75 µg	TCC 75/10 µg	TZP 75/10 µg	FEP 30 µg	CAZ 30 µg	IMP 10 µg
<i>E. faecalis</i> (17)	AMX 25 µg	GEN 15 µg	LIN 15 µg	FUR 300 µg	VAN 30 µg	TEC 30 µg
<i>S. aureus</i> (25)	FOX 30 µg	CLI 2 µg	SXT 1,25/23,75 µg	GEN 15 µg	VAN 30 µg	TEC 30 µg
<i>S. epidermidis</i> (8)						

La Tabla C1 enumera diferentes fenotipos de referencia para las especies de bacterias de referencia analizadas correspondientes a la resistencia o sensibilidad con respecto a los antibióticos en los que:

- 5 - los fenotipos y códigos de antibióticos tienen los significados indicados anteriormente,
- S significa: sensible al antibiótico o a la combinación de antibióticos contenidos en dicha pastilla, siendo el diámetro del halo de inhibición que rodea la pastilla superior al diámetro correspondiente a la concentración crítica inferior,
- 10 - R significa: resistente al antibiótico o a la combinación de antibióticos contenidos en dicha pastilla, siendo el diámetro del halo de inhibición que rodea la pastilla inferior al diámetro correspondiente a la concentración crítica superior,
- I significa: intermedia en relación con el antibiótico o la combinación de antibióticos contenidos en dicha pastilla, estando el diámetro del halo de inhibición que rodea la pastilla entre los valores de diámetro crítico correspondientes a la concentración crítica inferior y a la concentración crítica superior.
- 15

Dicha base de datos incluye los fenotipos de referencia para las especies de bacterias de referencia correspondientes a las siguientes resistencias (I,R) o sensibilidades (S) con respecto a las concentraciones de los 6 compuestos antibióticos mencionados en la Tabla C1.;

20

Bacterias	Fenotipos	Antibióticos					
<i>E. coli</i>		AMX	AMC	TCC	CRO	FEP	IMP
	Silvestre	S	S	S	S	S	S
	Penicilinasa de bajo nivel	R	S	S	S	S	S
	Penicilinasa resistente a inhibidores	R	R	R	S	S	S
	Penicilinasa de alto nivel	R	I/R	I/R	S	S	S
	BLEE	R	R	R	R	R	S
	Cefalosporinasa de alto nivel	R	R	R	R	R	S
	Carbapenemasa	R	R	R	R	R	R
<i>P. mirabilis</i>		AMX	AMC	TCC	CRO	FEP	IMP
	Silvestre	S	S	S	S	S	S
	Penicilinasa de bajo nivel	R	S	S	S	S	S
	Penicilinasa resistente a inhibidores	R	R	R	S	S	S
	Penicilinasa de alto nivel	R	I	I	S	S	S
	Cefalosporinasa de alto nivel	R	R	R	R	R	S
<i>K. pneumoniae</i>		AMC	TZP	CRO	FEP	IMP	COL
	Silvestre	S	S	S	S	S	S
	Penicilinasa de bajo nivel	S	R	S	S	S	S
	Penicilinasa de alto nivel	I/R	S/I/R	I	S	S	S
	BLEE	R	R/I	I/R	R	S	S
	Cefalosporinasa de alto nivel	I/R	I/R	I/R	S	S	S
	Carbapenemasa	R	R	R	R	R	S
<i>K. oxytoca</i>		AMC	TZP	CRO	FEP	IMP	COL
	Silvestre	S	S	S	S	S	S
<i>E. faecalis</i>		AMX	GEN	LIN	FUR	VAN	TEC
	Silvestre	S	S	S	S	S	S
	Atípico	R	S	S	S	S	S
<i>E. aerogenes</i>		AMC	TZP	CRO	FEP	IMP	COL
	Silvestre	S	S	S	S	S	S
	BLEE	R	R	R	R/I	S	S
<i>E. cloacae</i>		AMC	TZP	CRO	FEP	IMP	COL
	Silvestre	S	S	S	S	S	S
	BLEE	R	R	R	R	S	S
<i>P. aeruginosa</i>		TIC	TCC	TZP	FEP	CAZ	IMP
	Silvestre	S	S	S	S	S	S
	Permeabilidad selectiva al imipenem	S	S	S	S	S	I
	Penicilinasa	R	I/R	I/S	S	S	S
	BLEE	I/R	I/R	I/R	I/R	R	S

	Carbapenemasa	R	R	R	R	R	R
	Fenotipo anormal	R	R	R/S	R	S	S
<i>S. aureus</i>	Silvestre	FOX	CLI	SXT	GEN	VAN	TEC
	Resistente a la meticilina	S	S	S	S	S	S
		R	R/S	S	S	S	S
<i>S. epidermidis</i>	Silvestre	FOX	CLI	SXT	GEN	VAN	TEC
	Resistente a la meticilina	S	S	S	S	S	S
		R	R/S	S	S	S	S

Las pastillas de la tabla C1 anterior están dispuestas sucesivamente en un círculo en los antibiogramas en el orden de las columnas de izquierda a derecha de la tabla correspondiente al orden de las agujas del reloj en el círculo.

- 5 El fenotipo BLEE incluye un fenotipo de sinergia entre la ceftriaxona y el ácido clavulánico, por tanto entre CRO y TCC o AMC (para todas las bacterias BLEE de la tabla).

- 2.3) Los inventores comprobaron que el software también podía reconocer antibiogramas realizados en placas cuadradas con mayor número de antibióticos. Realizaron 25 antibiogramas de 16 pastillas que incluían: AMX de 25 µg; AMC de 20-10 µg; GM o GEN de 15 µg; SXT de 1,25/23,75 µg; TIC de 75 µg; TCC de 75/10 µg; IMP o IPM de 10 µg; COL de 50 µg; CRO de 30 µg; CIP de 5 µg; OFX de 5 µg; CTX de 5 µg; AN o AK de 30 µg; TOB de 10 µg; FOX de 30 µg; ATM de 30 µg, CLI o DA 2 µg, 30 µg, 30 µg, VA o Van 30 µg, FF de 200 µg, E de 15 µg, NT o FUR 300 µg, PT 15 µg, TEC 30 µg, LNZ 10 µg.

- 15 Dicha base de datos incluye los siguientes fenotipos de referencia para las siguientes especies de bacterias de referencia correspondientes a las siguientes resistencias (I/R)/o sensibilidades (S) con respecto a los 16 antibióticos mencionados en la siguiente tabla C2 de los cuales se disponen las siguientes pastillas en una cuadrícula en el siguiente orden desde la primera fila a la derecha con 4 filas de 4 compuestos alineados en columnas para cada grupo:

20

Tabla C2:

Bacterias	Fenotipos	Antibióticos							
<i>E. coli</i>	Silvestre	CIP	OFX	TIC	COL	IPM	CTX	TCC	AK
		S	S	S	S	S	S	S	S
		SXT	AMC	CRO	TOB	AX	ATM	FOX	GEN
		S	S	S	S	S	S	S	S
	Penicilinasa de alto nivel + R a las Fluoroquinolonas + R al Cotrimoxazol + R parcial a los aminoglucósidos	CIP	OFX	TIC	COL	IPM	CTX	TCC	AK
		R	R	R	S	S	S	I	S
		SXT	AMC	CRO	TOB	AX	ATM	FOX	GEN
		R	I	S	R	R	S	S	R
	Cefalosporinasa + R a las Fluoroquinolonas + R al Cotrimoxazol + R parcial a los aminoglucósidos	CIP	OFX	TIC	COL	IPM	CTX	TCC	AK
		R	R	R	S	S	R	R	S
		SXT	AMC	CRO	TOB	AX	ATM	FOX	GEN
		R	R	R	R	R	R	S	R
<i>K. pneumoniae</i>	Silvestre	CIP	OFX	TIC	COL	IPM	CTX	TCC	AK
		S	S	R	S	S	R	R	R
		SXT	AMC	CRO	TOB	AX	ATM	FOX	GEN
		R	R	R	R	R	R	S	R
	Cefalosporinasa + R a los Aminoglucósidos + R al Cotrimoxazol	CIP	OFX	TIC	COL	IPM	CTX	TCC	AK
		R	R	R	S	S	R	R	S
		SXT	AMC	CRO	TOB	AX	ATM	FOX	GEN
		R	R	R	R	R	R	S	R
<i>S. aureus</i>	Silvestre	SXT	DA	FOX	OXA	PT	GEN	CIP	RA
		S	S	S	S	S	S	S	S
		TEC	VA	LNZ	FF	TOB	E	DO	NT
		S	S	S	S	S	S	S	S
	R a la meticilina, R a los aminoglucósidos, a las Fluoroquinolonas, a la rifampicina, a los Macrólidos y afines...	SXT	DA	FOX	OXA	PT	GEN	CIP	RA
		R	R	R	R	R	R	R	R
		TEC	VA	LNZ	FF	TOB	E	DO	NT
		S	S	S	R	R	R	R	R

Estos fenotipos de referencia a las 16 pastillas anteriores son más particularmente útiles para las llamadas infecciones profundas como la septicemia.

- 25 3) Banco de imágenes de referencia e interpretación según la invención mediante comparación de imágenes fotográficas de antibiogramas.

3.1) Las fotografías se toman con un dispositivo de captura de imágenes que incluye un escáner Scan®1200 Interscience Ref 437 000 (INTERSCIENCE, Francia).

La toma de imágenes se estandariza mediante un escáner de alta resolución, en el que la placa que se va a fotografiar se coloca en este escáner y el brillo, la altura y la calidad de la fotografía en píxeles es siempre la misma. Cada fotografía se tomará en las mismas condiciones:

- Fondo plano y negro

- Misma luz/mismo brillo que el software ajusta automáticamente con 6 combinaciones de iluminación blanca por abajo y/o por arriba, sobre un fondo negro.

- Mismo dispositivo de captura de imágenes: Scan®1200 Interscience Ref. 437 000.

- Misma distancia de 10 cm

- Misma escala comprendida entre 1,5 y 3.

Proporciona fotografías con una resolución de al menos 1280 × 960 píxeles.

3.2) Inicialmente, los inventores simplemente querían estandarizar el número de antibióticos limitado a un número reducido, en particular, sólo 6 antibióticos en una sola placa para las bacterias más comunes. Esto los llevó a probar la reproducibilidad y repetibilidad de la técnica en una gran cantidad de muestras para poder automatizarla. Para hacer esto, tomaron fotografías de todos los resultados y así crearon un banco de datos con estas imágenes. En esta gran cantidad de fotografías, las compararon entre sí y descubrieron por casualidad que las fotografías de cada fenotipo, aunque distintas, parecían reconocibles entre sí. En otras palabras, parecía posible reconocer el fenotipo de la bacteria basándose en una imagen general del antibiograma sin medir directamente los diámetros de inhibición en el antibiograma y sin necesidad de interpretarlos según los datos de interpretación del EUCAST.

A continuación, intentaron confirmar este reconocimiento utilizando un software de reconocimiento automático de imágenes. Para hacer esto, utilizaron el software de reconocimiento de imagen XnView, descargable en línea (<http://www.xnview.com/fr/>, Gougelet Pierre-Emmanuel-10 rue René de Chateaubriand, La neuville-51100 REIMS-FRANCIA). Este software permite crear directorios de bancos de imágenes y después buscar en el ordenador en el que está instalado, imágenes similares de manera específica (en otro directorio) o en todas las unidades de almacenamiento del ordenador. De este modo, el software no queda "parasitado" por imágenes que no tienen nada que ver con la investigación en curso.

Este software también indica un porcentaje de similitud de las fotografías en comparación con las fotografías del banco de imágenes. Cada fotografía corresponde a una hoja que ha sido escaneada. Las hojas fueron digitalizadas por el escáner para obtener hojas verdes sobre un fondo blanco y permitir una segmentación simple de la hoja. A continuación, el color de la imagen se convirtió a escala de grises. Los contornos binarios de la imagen se trazan mediante análisis secuencial. Si se encuentra un píxel, el software busca los límites más cercanos a este punto para identificar sólo el contorno. Sólo se tiene en cuenta el borde más largo de la imagen, los otros límites de los dos objetos, así como los agujeros, se consideran ruido.

Dicho software resulta adecuado para reconocer fotografías de antibiogramas porque sólo los diámetros de inhibición varían de un fenotipo a otro, lo que da como resultado una variación en el contorno de la imagen general del antibiograma como se muestra en las Figuras 1A y 1B. Por tanto, este software es capaz de reconocer indirectamente los diferentes diámetros de inhibición y dar sus interpretaciones fenotípicas comparando la imagen global del antibiograma.

Una fotografía de un antibiograma que se va a analizar se compara con las imágenes de referencia del banco de imágenes producidas a partir de los antibiogramas de referencia mediante el software de reconocimiento de imagen, que puede reconocer fotografías de cepas que en la práctica tienen una similitud o semejanza inferior al 70 % y, por tanto, proporcionar el fenotipo de referencia correspondiente a la muestra analizada, si procede. Si el software reconoce la imagen con una similitud de al menos un 70 % en comparación con una imagen de referencia, esto significa que la bacteria tiene el mismo fenotipo que la imagen de referencia, para que el software pueda asignarle su fenotipo.

Otro software desarrollado para reconocer imágenes como fotografías de hojas de determinadas plantas y por tanto deducir la especie de la planta (Novotny P, Suk T (2013) Leaf recognition of woody species in central Europe. J Clin Microbiol), también es capaz de reconocer fotografías de antibiogramas en comparación con fotografías encontradas en un banco de datos existente y previamente establecido. Más particularmente, este software es capaz de reconocer la especie de un árbol a partir de un banco de datos de hojas y varias fotografías de hojas de la misma especie comparando solo el contorno de la hoja sin considerar todo lo que está dentro o fuera de los contornos y por analogía de forma del contorno determina la especie del árbol.

Entonces es posible proporcionar recomendaciones terapéuticas automáticamente al mismo tiempo que el fenotipo durante la validación para que el médico tenga todos los datos.

Por tanto, por ejemplo, para *E. coli*, inicialmente, los inventores crearon un directorio de fotografías a partir de fotografías de antibiogramas de 42 aislados clínicos de *E. coli*. En estas 42 fotografías, seleccionaron varias para cada fenotipo dado. Cada una de estas fotografías fue renombrada en función de su fenotipo y se preguntó al software si era capaz de reconocer otros fenotipos similares a los de referencia y a partir de qué porcentaje de similitud el software comenzaba a cometer errores a nivel de reconocimiento de fenotipo.

Al disminuir gradualmente la tasa de similitud de 5 en 5 %, con este software se determinó una tasa de similitud mínima requerida del 70 % para reconocer fotografías de antibiogramas diferentes pero con el mismo fenotipo sin cometer error.

Las Figuras 2A a 2C ilustran el hecho de que este software de reconocimiento de imagen XnView es capaz de proporcionar el fenotipo exacto de las bacterias *E. coli* de fenotipo BLEE con una similitud de:

- 100 % entre las imágenes de las Figuras 2A y 2B;
- 87 % entre las imágenes de las Figuras 2A y 2C.

Las figuras 2D y 2E ilustran el hecho de que este software de reconocimiento de imagen XnView es capaz de proporcionar el fenotipo exacto de las bacterias *E. coli* de fenotipo de cefalosporinasa con una similitud de:

- 74 % las imágenes de las figuras 2D y 2E, y
- 65 % entre las imágenes de las Figuras 2A y 2D, distinguidas esencialmente por la presencia de una zona de sinergia entre AMX y TCC para BLEE (fig. 2A a 2C) y ausencia de zona de sinergia entre AMX y TCC para el fenotipo de cefalosporinasa.

Las figuras 3A y 3B muestran que el software es capaz de reconocer fotografías de antibiogramas que muestran el mismo fenotipo de "penicilinas de alto nivel" de las bacterias *E. coli* a partir de una base de datos de 42 fotografías de 42 muestras de *E. coli* que muestran varios fenotipos y con un 80 % de similitud.

Las figuras 4A y 4B muestran fotografías de antibiogramas de 2 cepas de *Escherichia coli*: el de la figura 4A es sensible a todos los antibióticos probados (cepa silvestre) mientras que el de la figura 4 B es resistente a todos los antibióticos.

La Figura 5 muestra que se puede interpretar un mecanismo de resistencia muy específico mediante imágenes de sinergias que nos permiten visualizar mecanismos de sinergia entre dos antibióticos.

En la figura 5, una bacteria *E. coli* que tiene un mecanismo de resistencia a los antibióticos BLEE (B-Lactamasa de espectro extendido) presenta una sinergia entre dos antibióticos particulares ceftriaxona (cefalosporina de tercera generación de la familia de los b-lactámicos) y la asociación amoxicilina + ácido clavulánico (Amoxicilina que es una aminopenicilina + un inhibidor de b-lactamasa). Esta sinergia se puede ver directamente en el agar porque aparece una pequeña zona de inhibición en forma de corcho de champán entre las dos pastillas de antibióticos que normalmente son resistentes con respecto a esta cepa. El reconocimiento global de imágenes de antibiograma permite identificar este tipo de mecanismo de sinergia entre 2 antibióticos.

Los inventores comprobaron que el software también podía reconocer antibiogramas realizados en placas cuadradas con mayor número de antibióticos. Realizaron 25 antibiogramas de 16 pastillas que incluían diferentes fenotipos descritos anteriormente.

Las figuras 6A y 6B muestran que el software es capaz de reconocer fotografías de antibiogramas que presentan el mismo fenotipo ("Cefalosporinasa + resistencia a aminoglucósidos y al cotrimoxazol") de bacterias *K. pneumoniae* a partir de una base de datos de 9 fotografías de 9 muestras de *K. pneumoniae* que muestran fenotipos variados con un 88 % de similitud.

El software es capaz de reconocer fotografías como aquellas de la misma bacteria de referencia que tiene el mismo fenotipo con una similitud de al menos el 70 %.

Esta tasa de similitud garantiza el reconocimiento del color, las letras de los códigos de antibióticos y los números de dosis de concentración escritos en los discos, los contornos de la imagen de los halos. Cada antibiótico colocado en el agar tiene un código de 2 o 3 letras que permite identificarlo (correspondiente a la abreviatura de su nombre) y verificar que el antibiótico presente en el agar es efectivamente el antibiótico correcto. También se anota la dosificación del antibiótico. Por ejemplo, en el disco de imipenem se encuentra el código "IPM 10 µg" que corresponde a un disco de imipenem dosificado a 10 µg. Finalmente, el software reconoce que la disposición de las pastillas en círculo o en

cuadrado es correcta.

Los contornos y la forma de la imagen son dos cosas diferentes. La forma de la imagen incluye la forma general de esta imagen, mientras que los contornos de la imagen se refieren en este caso solo a una única parte de la imagen, como por ejemplo solo los contornos de las zonas de inhibición como se ven en las Figuras 1A y 1B.

Teniendo en cuenta que para un mismo fenotipo el diámetro puede variar (véase el ejemplo anterior entre 16 y 22 mm para I y R si >16 o S si > 22 mm) cuantas más imágenes de referencia haya para el mismo fenotipo en la base de datos mejor es el reconocimiento del mismo fenotipo incluso si el diámetro es ligeramente diferente sin cambiar la interpretación.

Este software es capaz de utilizar un banco de datos de imágenes conocidas para buscar simultáneamente las imágenes más similares rápidamente, independientemente de la cantidad de imágenes en el banco de datos. Además, un software puede generar automáticamente una interpretación completa así como un informe de análisis y recomendaciones terapéuticas de diferente tipo (comentarios u otras según recomendaciones de comités de expertos).

El uso del software incluye las siguientes etapas:

- a) Seleccionar un archivo que contenga una fotografía de antibiograma para analizar;
- b) Seleccionar en herramientas: "Buscar archivos similares" que permite el reconocimiento de imagen;
- c) seleccionar el archivo que contiene el banco de imágenes de referencia para compararlo con la imagen que se va a analizar;
- d) Indique la tasa de similitud, por ejemplo, una tasa de similitud del 73 %.

La comparación es tal que cada par de imágenes obtiene un valor de similitud calculado y si este valor es mayor que la tolerancia mínima del 73 % entonces el par se considera similar y ambas imágenes pertenecen al mismo fenotipo de referencia.

El banco de imágenes de referencia se puede ampliar a todas las bacterias que se encuentran frecuentemente en el ser humano, a saber, unas 200 especies bacterianas diferentes, o incluso todas las bacterias (alrededor de 2000 especies aisladas al menos una vez en humanos).

El hecho de añadir imágenes de referencia permite mejorar la interpretación y aumentar el porcentaje del umbral de similitud para un mismo fenotipo.

Referencias bibliográficas

- 1) Journal of Clinical Microbiology 1998, página 302-304, Volumen 36 N.º 1, Kent Korgenski *et al.*
- 2) Journal of Clinical Microbiology, Abril de 2000, páginas 1688-1693, volumen 38 n.º 4.
- 3) Clinical Microbiology and Infection, Volumen 10 N.º 5 - 2004 Kolbert *et al.*
- 4) Journal of Clinical MICROBIOLOGY, Abril de 2005, páginas 1846-1850, Volumen 43 n.º 4 - Bert *et al.*
- 5) Journal of Microbiological Methods 2008, Volumen 75 páginas 177-181.
- 6) International Journal of Antimicrobial Agents 45 (215) 61-65 - Lepage *et al.*
- 7) Salgado *et al.*, "Automatic antibiograms inhibition halo determination through texture and directional filtering analysis", 2001, Institute of electrical and electronics engineers, página 629-632.

REIVINDICACIONES

1. Método de análisis e interpretación automatizada de un antibiograma de una muestra de microorganismo que se va a analizar, preferentemente una bacteria, que permite determinar un fenotipo de resistencia o sensibilidad a al menos un compuesto antimicrobiano, correspondiendo dicho fenotipo a la resistencia o sensibilidad de una muestra de microorganismo que se va a analizar, preferentemente una bacteria, con respecto a al menos un compuesto antimicrobiano, preferentemente una pluralidad de compuestos antimicrobianos, preferentemente compuestos antibióticos, seleccionándose dicho fenotipo entre una pluralidad de fenotipos de referencia diferentes para cada una de las especies de microorganismos de referencia de una pluralidad de especies de microorganismos de referencia diferentes en la que:

a) el antibiograma de la muestra del microorganismo que se va a analizar, preferentemente perteneciente a una de dichas especies de microorganismos de referencia, se lleva a cabo según una metodología determinada en un medio de cultivo sólido, metodología que comprende:

- una concentración de microorganismo, preferentemente de bacteria (UFC/ml), determinada a partir de la muestra de microorganismo, preferentemente de bacteria, depositada sobre dicho medio de cultivo sólido,
- un número n determinado de una pluralidad de sustratos, una disposición determinada y una forma determinada de sustratos, preferentemente en forma de pastillas, conteniendo cada uno(a) de ellos(as) una concentración determinada de compuesto(s) antimicrobiano(s) determinado(s) y capaces de difundir uno (o más) compuesto(s) antimicrobiano(s) determinado(s) diferente(s) para cada uno de los n dichos sustratos depositados sobre dicho medio de cultivo sólido, y
- condiciones y duración de incubación determinadas de la muestra de microorganismo depositada sobre dicho medio de cultivo sólido, preferentemente de 18 a 24 horas a una temperatura de 35-37 °C, y

b) se adquiere una imagen fotográfica del antibiograma obtenido en la etapa a), preferentemente utilizando un dispositivo de captura de imagen fotográfica que comprende un escáner y un aparato fotográfico, estando dicho método **caracterizado por que**:

c) se determina dicho fenotipo de la muestra de microorganismo que se va a analizar, preferentemente de bacteria, sin medir directamente los diámetros de inhibición en el antibiograma, comparando con un software de reconocimiento de imagen, la imagen fotográfica obtenida en la etapa b) con imágenes de referencia de antibiogramas de referencia, de una base de datos constituida por dichas imágenes de referencia, de manera que dicha base de datos comprenda una pluralidad de al menos p imágenes de referencia diferentes de antibiogramas de p cepas diferentes de un mismo microorganismo, para cada fenotipo de referencia de cada especie de microorganismo de referencia.

2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado por que** en la etapa c), todos los antibiogramas de referencia se realizan según la misma metodología que el antibiograma que se va a analizar, y dichas imágenes de referencia y la imagen que se va a analizar se realizan con el mismo dispositivo de captura de imagen fotográfica y en las mismas condiciones, notablemente la misma distancia, mismo brillo, mismo fondo y misma resolución.

3. Método según la reivindicación 1 o 2 **caracterizado por que** se utiliza una pluralidad de n dichos sustratos, siendo n de 5 a 20, preferentemente n= 6 a 16, y dicha base de datos comprende una pluralidad de al menos p imágenes de referencia diferentes de antibiogramas de p cepas diferentes del mismo microorganismo, siendo p al menos igual a 5, siendo preferentemente p al menos igual a 10.

4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** en la etapa c), se compara con dicho software de reconocimiento de imagen, la forma del contorno de los halos correspondientes a las zonas de inhibición alrededor de los sustratos, preferentemente de las pastillas, de antibióticos y preferentemente también las letras de los códigos y cifras de dosificación de antibióticos indicados en las pastillas de antibióticos.

5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado por que** se determina un porcentaje mínimo admisible de similitud entre una imagen que se va a analizar y una imagen de referencia, en lo sucesivo denominado umbral de similitud, de modo que se determinará que la bacteria de la muestra que se va a analizar presenta dicho fenotipo de referencia de dicha bacteria de referencia si el software de reconocimiento evalúa un porcentaje de similitud entre la imagen del antibiograma de la bacteria de la muestra que se va a analizar y una imagen de referencia correspondiente a dicho fenotipo de referencia de dicha especie de bacteria de referencia, al menos igual a un porcentaje de similitud de umbral mínimo admisible, preferentemente un porcentaje de similitud de umbral mínimo admisible de al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %.

6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado por que** se determina un porcentaje de similitud de umbral mínimo entre dichas diferentes imágenes de referencia de los diferentes antibiogramas de las p cepas diferentes para cada fenotipo de referencia de cada especie de bacteria de referencia, en lo sucesivo denominado umbral de similitud de referencia, preferentemente se determina un porcentaje de similitud de umbral de referencia correspondiente al porcentaje más bajo de similitud entre las dos imágenes de referencia más distintas para cada fenotipo de referencia de cada especie de bacteria de referencia, de modo que se determinará que la bacteria de la

muestra que se va a analizar presenta dicho fenotipo de referencia de dicha bacteria de referencia si el software de reconocimiento evalúa un porcentaje de similitud al menos igual a dicho umbral de similitud de referencia entre la imagen del antibiograma de la bacteria de la muestra que se va a analizar y una imagen de referencia correspondiente a dicho fenotipo de referencia de dicha especie de bacteria de referencia.

7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado por que** dicho fenotipo de referencia es una clasificación de resistencia o de sensibilidad para un antibiótico o una asociación de antibióticos determinados.

8. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado por que** el fenotipo de referencia es una clasificación de resistencia o sensibilidad para una pluralidad de antibióticos y/o de asociación de antibióticos.

9. Método según la reivindicación 7 **caracterizado por que** dicho fenotipo de referencia comprende un fenotipo de sinergia entre dos antibióticos correspondientes a dos antibióticos para los cuales la bacteria de referencia es resistente cuando se toman por separado y para los cuales la bacteria de referencia es sensible cuando se toman en asociación.

10. Método según una de las reivindicaciones 1 a 9 **caracterizado por que** dichas especies de bacterias de referencia se eligen entre al menos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

11. Método según una de las reivindicaciones 1 a 10 **caracterizado por que** los antibiogramas se producen a partir de pastillas que comprenden los siguientes antibióticos y con los siguientes marcados correspondientes a dichos antibióticos: AMX para amoxicilina; AMC para amoxicilina-ácido clavulánico; GEN para gentamicina; SXT para trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol); TIC, para ticarcilina; TCC para ticarcilina-ácido clavulánico; TZP para piperacilina-tazobactam; CAZ para ceftazidima; IMP para imipenem; COL o CL para colistina; FOX para ceftioxima; VPN o VA para vancomicina; TEC para teicoplanina; CLI o DA para clindamicina; CRO para ceftriaxona; FEP para cefepima; L o LIN para lincomicina; FUR o NT para nitrofurantoina; CIP para ciprofloxacina; OFX para ofloxacina; CTX para cefotaxima; AK o AN para amikacina; TOB o TM para tobramicina; FOX para ceftioxima; ATM para aztreonam; ERT para ertapenem; FF o FOS para fosfomicina; DO para doxiciclina; K para kanamicina; L o LIN para lincomicina; LNZ para linezolid; NA para ácido nalidixico; NOR para norfloxacina; MET para metronidazol; MEM para meropenem; PT para pristamicina; P para penicilina G; RA para rifampicina; TGC para tigeciclina; TEL para telitromicina; E para eritromicina, OX u OXA para oxacilina.

12. Método según la reivindicación 1 a 11 **caracterizado por que** el fenotipo de referencia es una clasificación de resistencia o se elige entre al menos los siguientes fenotipos:

- Fenotipo "silvestre",
- Fenotipo "Penicilinasa de bajo nivel",
- Fenotipo denominado "Penicilinasa resistente a inhibidores",
- Fenotipo "Penicilinasa de alto nivel",
- Fenotipo "Beta-Lactamasa de Espectro Extendido" (BLEE),
- Fenotipo "Cefalosporinasa de alto nivel",
- Fenotipo "Carbapenemasa",
- Fenotipo "Permeabilidad selectiva al imipenem",
- Fenotipo "Resistencia a la meticilina",
- Fenotipo "resistencia a las fluoroquinolonas",
- Fenotipo "resistencia a los aminoglucósidos",
- Fenotipo de "resistencia a los macrólidos",
- Fenotipo de "resistencia al cotrimaxol",
- Fenotipo de "resistencia a la Rifampicina",
- Fenotipo denominado "Fenotipo atípico".

13. Método según la reivindicación 11 **caracterizado por que** el antibiograma analizado y/o dicha base de datos incluye los fenotipos de referencia para las especies de bacterias de referencia correspondientes a las siguientes resistencias (I,R) o sensibilidades (S) con respecto a las concentraciones de los 6 compuestos antibióticos elegidos de los siguientes grupos a1) a a6), preferentemente dispuestos en círculo en el siguiente orden para cada grupo:

- a1) AMX, AMC, TCC, CRO, FEP e IMP,
- a2) AMX, AMC, TZP, CRO, FEP e IMP,
- a3) AMC, TZP, CRO, PEP, IMP y COL,
- a4) AMX, GEN, LIN, FUR, VAN y TEC,
- a5) TIC, TCC, TZP, PEP, CAZ e IMP,
- a6) FOX, CLI, SXT, GEN, VAN y TEC.

14. Método según la reivindicación 11 **caracterizado por que** el antibiograma analizado y/o dicha base de datos

incluye los siguientes fenotipos de referencia para las siguientes especies de bacterias de referencia correspondientes a las siguientes resistencias (I/R)/o sensibilidades (S) con respecto a los 16 compuestos antibióticos elegidos de los siguientes grupos b1) y b2), preferentemente cuyas pastillas están dispuestas en una cuadrícula en el siguiente orden desde la primera fila a la derecha con 4 filas de 4 compuestos alineados en columnas para cada grupo:

- 5
- b1) CIP, OFX, TIC, COL, IMP, CTX, TCC, AKSXT, AMC, CRO, TOB, AMX, ATM, FOX y GEN,
b2) SXT, DA, FOX, OXA, PT, GEN, CIP, RA, TEC, VAN, LNZ, TOB, E, DO y NT.
- 10
15. Método según una de las reivindicaciones 1 a 14 **caracterizado por que** en la etapa a), se realizan los antibiogramas de referencia y la muestra bacteriana que se va a analizar, según una metodología determinada en un medio de cultivo sólido como el agar Muller-Hinton, que comprende:
- 15
- un número (n), de 6 a 16 pastillas en forma de discos, en concentraciones de antibióticos de 10 a 300 ug, dispuestas en un círculo o cuadrícula,
 - una concentración bacteriana (UFC/ml) determinada de la muestra que se va a analizar o de referencia depositada sobre dicho medio de cultivo sólido, correspondiente a una turbiedad de la suspensión depositada correspondiente al patrón de 0,5 en la gama McFarland, y
 - condiciones y duración de la incubación determinada de 18 a 24 horas a 37 °C.

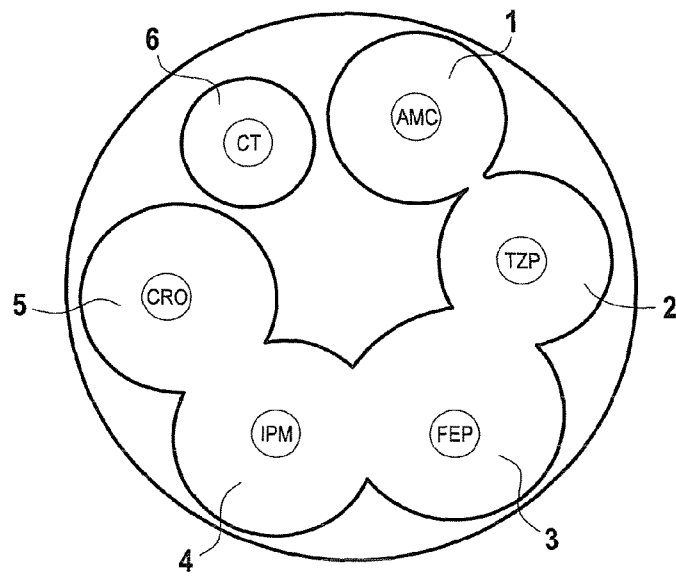


FIG.1A

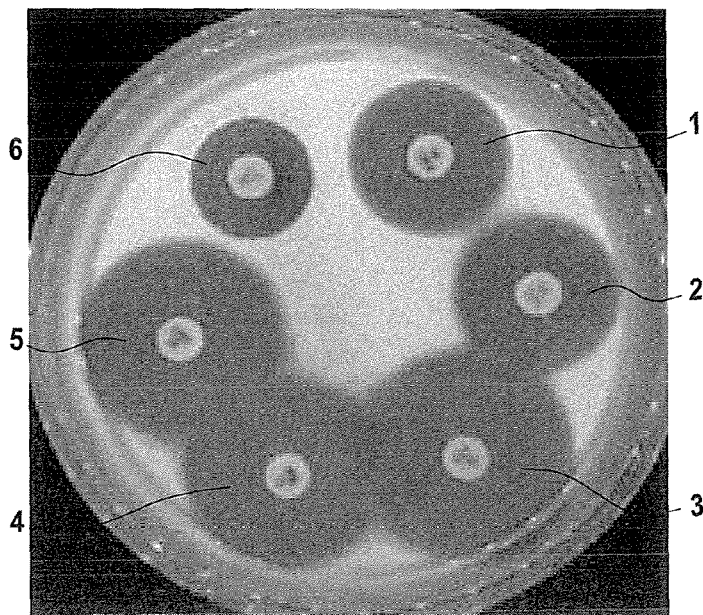


FIG.1B

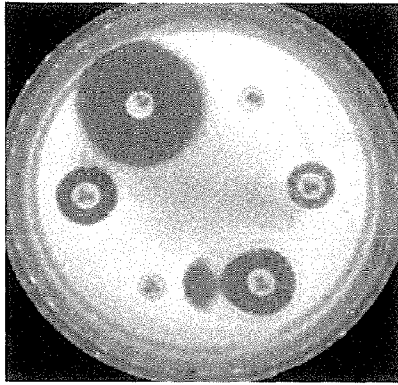


FIG. 2A

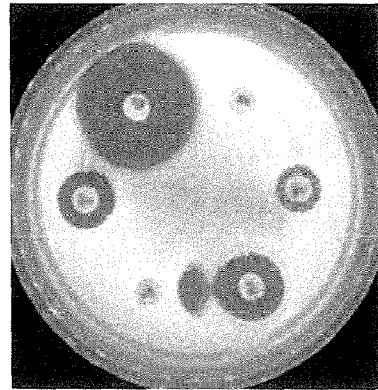


FIG. 2B

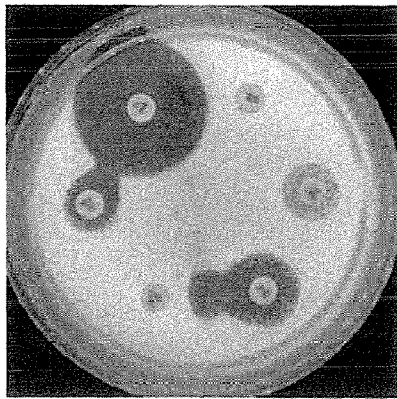


FIG. 2C

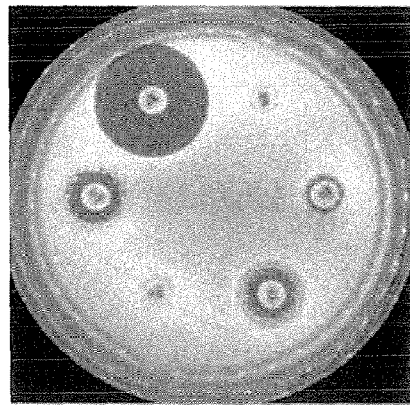


FIG. 2D

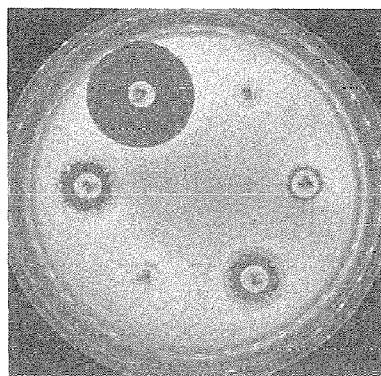


FIG. 2E

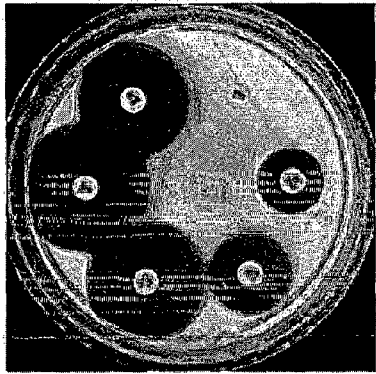


FIG. 3A

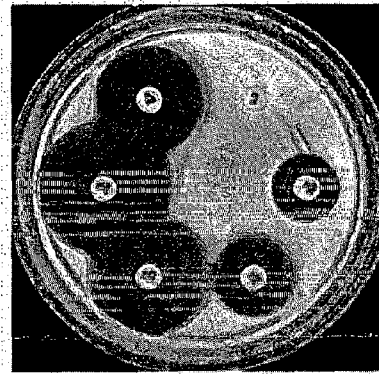


FIG. 3B

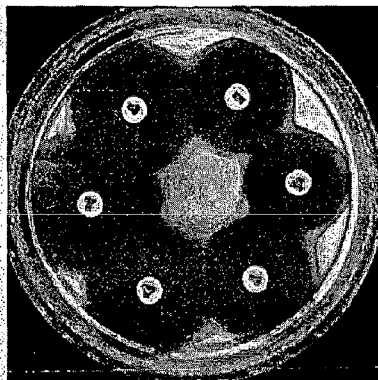


FIG. 4A

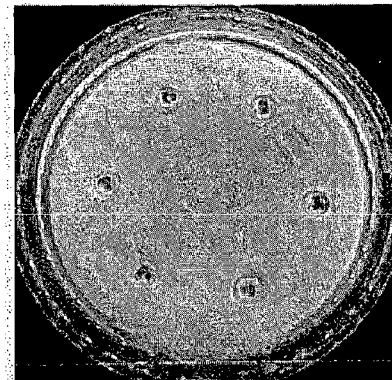


FIG. 4B

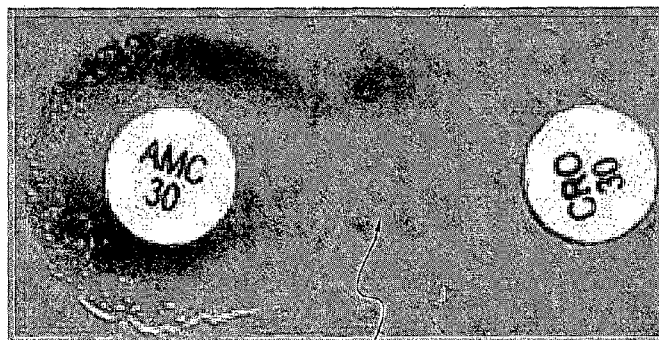


FIG. 5

A

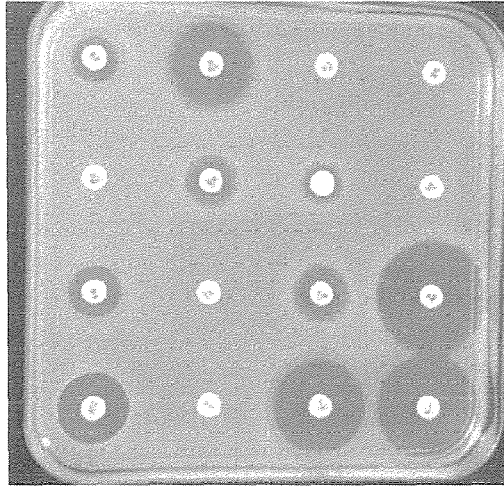


FIG. 6A

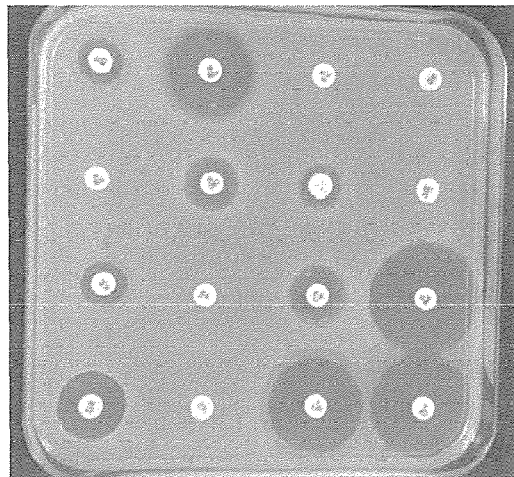


FIG. 6B