República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1015218-0 B1

(22) Data do Depósito: 06/05/2010

(45) Data de Concessão: 08/10/2019

(54) Título: MÉTODOS PARA DETERMINAR A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

(51) Int.Cl.: G01N 33/569.

(30) Prioridade Unionista: 07/05/2009 US 61/215.594.

(73) Titular(es): BIOMERIEUX INC..

(72) Inventor(es): JOHN WALSH; JONES HYMAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2010033879 de 06/05/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/129779 de 11/11/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/11/2011

(57) Resumo: MÉTODOS PARA DETERMINAR A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA A presente invenção refere-se a métodos e sistemas para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo. A presente invenção propõe ainda métodos para determinar o estado de resistência a antibióticos in situ em um único sistema.

"MÉTODOS PARA DETERMINAR A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA"

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica o benefício do pedido de patente provisório dos Estados Unidos nº 61/215.594, intitulado "*Method for Antimicrobial Resistance Determination*" e depositado no dia 7 de maio de 2009, o qual se incorpora ao presente documento.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a métodos e sistemas para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo. A presente invenção propõe ainda métodos para determinar o estado de resistência a antibióticos *in situ* em um único sistema.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] As infecções na corrente sanguínea estão relacionadas a alta morbidade e mortalidade, mas, ainda assim, os métodos de diagnóstico de cultura atuais, seguidos por testes de identificação bioquímica e susceptibilidade antibiótica, podem levar vários dias. Na maioria das vezes, o médico inicia a terapia empírica, com base nos sintomas clínicos, e os resultados dos testes só influenciam nas decisões clínicas quando esta é mal-sucedida. A possibilidade de caracterizar infecções na corrente sanguínea na primeira hora após um resultado de cultura sanguínea positiva aumentaria significativamente a relevância clínica das informações do diagnóstico. Foram propostos métodos de amplificação molecular para atender a essa necessidade, mas, ainda assim, essa abordagem traz sérios desafios. O caldo de cultura sanguínea positiva em si representa uma população naturalmente amplificada de micro-organismos com potencial para uso em vários testes de identificação (ID) rápidos.

[004] O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é um patógeno perigoso contraído na sociedade e em hospitais que pode causar a rápida infecção até mesmo em pacientes saudáveis. Ele

também se faz presente, com frequência, como flora normal em vários pacientes idosos e enfermos, além de ter o potencial de passar com rapidez a vários pacientes em ambientes médicos. O mecanismo da "resistência à meticilina" é substancialmente mediado pela produção de uma proteína de ligação de penicilina 2 alterada, conhecida como PBP2a, que retém a atividade enzimática funcional, mas apresenta uma afinidade significativamente reduzida por antibióticos β-lactâmicos. O enterococo resistente à vancomicina (YRE) trata-se de outro grupo perigoso de patógenos que requer a identificação imediata. À semelhança da resistência à meticilina, a resistência à vancomicina também é mediada por uma afinidade reduzida do antibiótico à sua membrana celular.

[005] Os métodos atuais para identificar o MRSA e o YRE são trabalhosos e potencialmente inseguros devido a etapas que podem resultar na exposição do usuário a aerossol. Há uma necessidade urgente por métodos rápidos, ainda que seguros e confiáveis, para isolar micro-organismos contidos em caldos de cultura sanguínea que sejam compatíveis com a rápida determinação da resistência. Tais métodos são propostos pela presente invenção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção propõe métodos e sistemas para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo. Os métodos permitem determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo com mais rapidez do que as técnicas anteriores, levando a diagnósticos (por exemplo, em um paciente que tenha ou suspeito de ter septicemia e/ou outras infecções) e à caracterização de materiais contaminados (por exemplo, gêneros alimentícios, abastecimentos de água e produtos farmacêuticos) com mais rapidez. As etapas envolvidas nos métodos da invenção, desde a obtenção de uma amostra à determinação do estado de resistência antibiótica dos micro-organismos, podem ser realizadas em bem menos tempo, produzindo informações clinicamente relevantes, por exemplo,

em menos de cerca de 240 minutos. Ademais, os métodos da invenção podem ser totalmente automatizados, diminuindo assim o risco de manusear materiais contagiosos e/ou de contaminar as amostras.

[007] Um primeiro aspecto da presente invenção refere-se a métodos para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo caracterizados por compreender:

(a) colocar o micro-organismo em contato com um ligante de afinidade que determina a resistência em condições nas quais se forme um complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência;

(b) separar o complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência formado em (a) de ligantes de afinidade que determinam a resistência livres;

(c) determinar a quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência; e

(d) comparar a quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência à quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada a uma linhagem sensível ou resistente a antibióticos do mesmo organismo ou de uma população de linhagens sensíveis ou resistentes a antibióticos conhecidas;

em que, se o micro-organismo no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência se ligar a uma quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência diferente da quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo sensível a antibióticos ou se o micro-organismo no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência se ligar à mesma quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo resistente a antibióticos, o micro-organismo é identificado como resistente a antibióticos.

[008] Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo, o método sendo caracterizado por compreender:

(a) obter uma amostra de teste que contenha ou acredite-se conter micro-organismos;

(b) colocar o micro-organismo da amostra de teste em contato com um ligante de afinidade que determina a resistência em condições nas quais se forme um complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência;

(c) como opção, acrescentar um ou mais corantes fluorescentes que meçam o metabolismo celular ou a integridade da membrana;

(d) como opção, seletivamente submeter a lise qualquer célula não-microbiana que se faça presente na amostra para produzir uma amostra lisada;

(e) separar os micro-organismos de outros componentes da referida amostra de teste, ou referida amostra lisada, para formar um precipitado de micro-organismos;

(f) interrogar o precipitado para tirar medidas dos micro-organismos;

(g) determinar o estado de resistência a antibióticos dos micro-organismos na amostra de teste com base na comparação das medidas com as medidas tiradas, ou previstas, para micro-organismos resistentes e/ou sensíveis a antibióticos da mesma espécie.

[009] Em uma concretização, a etapa de separação é realizada dispondo-se o complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência sobre uma camada de densidade em um recipiente vedado (por exemplo, um recipiente hermeticamente fechado) e centrifugando-se o recipiente para precipitar o complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência, enquanto o meio que contém ligantes livres

permanece sobre a camada de densidade. Em outra concretização, o recipiente possui uma janela óptica debaixo dele e/ou dos lados para possibilitar a interrogação espectroscópica do precipitado do complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência na etapa de determinação. É possível determinar o estado de resistência a antibióticos dos micro-organismos comparando-se o espectro do precipitado a um ou mais espectros de micro-organismos de estado de resistência a antibióticos conhecido. A possibilidade de determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo diretamente no precipitado e/ou em um recipiente hermeticamente fechado, sem outros novos manuseios, torna a identificação microbiana mais segura.

[010] Em uma concretização, a etapa de determinação é realizada recuperando-se o precipitado do complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência, ressuspendendo-se os micro-organismos em um meio adequado e interrogando-se os micro-organismos ressuspensos, por exemplo, por espectroscopia. Em outra concretização, os métodos compreendem ainda realizar outros testes de identificação e/ou caracterização (por exemplo, resistência a fármacos, fatores de virulência, antibiograma) nos mecanismos ressuspensos.

[011] Em ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um sistema para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo, o sistema sendo caracterizado por compreender:

(a) um recipiente com um micro-organismo, ou uma amostra que o contenha, e um ligante de afinidade que determina a resistência;

(b) uma camada de densidade; e

(c) um espectrômetro para produzir medidas;

em que as referidas medidas determinam o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo concentrado no referido recipiente graças à separação *in situ* dentro do referido sistema. Em outra concretização, o sistema compreende uma centrífuga para separar o micro-

organismo de ligantes de afinidade que determinam a resistência livres.

[012] A presente invenção é explicada em mais detalhes nas Figuras anexas e na descrição apresentada abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[013] A Figura 1 ilustra a marcação metabólica de linhagens de *S. aureus* sensíveis a antibióticos (MSSA) e resistentes a antibióticos (MRSA) com BOCILLIN™-FL (penicilina marcada com BODIPY™-FL).

[014] A Figura 2 ilustra o curso no tempo da ligação da BOCILLIN™FL às linhagens de MSSA e MRSA.

[015] A Figura 3 ilustra a titulação da ligação da BOCILLIN™FL às linhagens de MSSA e MRSA.

[016] A Figura 4 ilustra a ligação da BOCILLIN™FL a diferentes linhagens de MSSA e MRSA.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[017] A presente invenção pode ser concretizada de diferentes maneiras e não se limita às concretizações estabelecidas neste documento. Em vez disso, apresentamos essas concretizações a fim de tornar a presente revelação mais detalhada e completa e de transmitir plenamente o âmbito da invenção aos versados na técnica. Por exemplo, características descritas com referência a uma concretização podem ser incorporadas em outras, e características ilustradas com referência a uma concretização específica podem ser excluídas dela. Ademais, vários incrementos e variações às concretizações sugeridas no presente documento transparecerão aos versados na técnica pela leitura da presente revelação sem, com isso, divergir da presente invenção.

[018] Salvo indicação em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm os mesmos significados normalmente inferidos pelos versados na técnica a que pertence a presente invenção. A terminologia usada na descrição da presente invenção serve

apenas ao intuito de descrever concretizações específicas e não visa limitar a presente invenção.

Definições

[019] Conforme usados no presente documento, os artigos “um”, “uns”, “uma”, “umas”, “o”, “os”, “a” e “as” podem significar um ou mais. Por exemplo, “uma” célula pode significar uma única célula ou várias.

[020] Conforme usado no presente documento, “e/ou” refere-se a e abrange toda e qualquer combinação possível de um ou mais itens listados relacionados, bem como a falta de combinações quando interpretado de forma alternativa (“ou”).

[021] Além disso, conforme usados no presente documento, os termos “cerca de” e “em torno de” referem-se a um valor mensurável de modo que a quantidade de um composto ou agente da presente invenção, dose, tempo, temperatura ou algo do gênero abranja variações de ±20%, ±10%, ±5%, ±1%, ±0,5% ou mesmo ±0,1% da quantidade especificada.

[022] Conforme usado no presente documento, o termo “micro-organismo” visa abranger organismos geralmente unicelulares que podem ser multiplicados e manuseados em laboratório, incluindo, entre outros, bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, leveduras, fungos, parasitas e *mollicutes* em qualquer combinação. Exemplos não-limitantes de bactérias gram-negativas da presente invenção incluem bactérias dos gêneros a seguir: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Ralstonia*, *Achromobacter*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Brucella*, *Pasteurella*, *Providencia* e *Legionella*. Exemplos não-limitantes de bactérias gram-positivas da presente invenção incluem bactérias dos gêneros a seguir: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Clostridium*,

Bacteroides, *Gardnerella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacteria* e *Corynebacteria*. Exemplos não-limitantes de leveduras e fundos da presente invenção incluem os dos gêneros a seguir: *Candida*, *Cryptococcus*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Saccharomyces* e *Trichosporon*. Exemplos não-limitantes de parasitas da presente invenção incluem os dos gêneros a seguir: *Trypanosoma*, *Babesia*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Wucheria*, *Brugia*, *Onchocerca* e *Naegleria*. Exemplos não-limitantes de *mollicutes* da presente invenção incluem os dos gêneros a seguir: *Mycoplasma* e *Ureaplasma*.

[023] Conforme usado no presente documento, o termo "separar" abrange qualquer amostra de micro-organismos removida, concentrada ou de alguma outra forma retirada de seu estado original ou de um meio de cultivo ou cultura. Por exemplo, de acordo com a presente invenção, os micro-organismos podem ser separados (por exemplo, como uma amostra separada) de não-micro-organismos ou componentes de não-micro-organismos que, de outro modo, interfeririam na caracterização e/ou identificação. O termo pode incluir uma camada de micro-organismos disposta entre duas outras camadas, por exemplo, micro-organismos aglomerados sobre uma camada de alta densidade após a centrifugação, ou uma camada de micro-organismos aglomerada sobre uma superfície sólida (por exemplo, uma membrana de filtragem). O termo pode incluir ainda um conjunto de micro-organismos que atravessou parcialmente uma camada (por exemplo, uma camada de densidade). Como tal, uma amostra separada de micro-organismos pode incluir qualquer conjunto ou camada de micro-organismos ou de seus componentes que seja mais concentrada ou de alguma outra forma separada da amostra original e pode variar de um denso aglomerado de micro-organismos próximos a uma camada difusa de micro-organismos. Os componentes de micro-organismos que podem ser contidos em uma forma ou amostra separada incluem, entre outros, *pilli*, flagelos, fímbrias e cápsulas em qualquer combinação. Componentes de não-micro-organismos que são separados dos

micro-organismos podem incluir células de não-micro-organismos (por exemplo, células sanguíneas e/ou outras células epidérmicas) e/ou componentes delas.

[024] Conforme usado no presente documento, o termo "precipitado" abrange qualquer amostra de micro-organismos comprimida ou sedimentada em uma massa de micro-organismos. Por exemplo, os micro-organismos de uma amostra podem ser comprimidos ou sedimentados em uma massa no fundo de um tubo por centrifugação ou outros métodos conhecidos na técnica. O termo inclui um conjunto de micro-organismos (e/ou de seus componentes) no fundo e/ou nas laterais de um recipiente após a centrifugação. Os componentes de micro-organismos que podem se fazer presentes em um precipitado incluem, entre outros, *pilli*, flagelos, fímbrias e cápsulas em qualquer combinação. De acordo com a presente invenção, os micro-organismos podem ser precipitados (por exemplo, como um precipitado de micro-organismos substancialmente purificado) de não-micro-organismos ou componentes de não-micro-organismos que, do contrário, interfeririam na caracterização e/ou identificação. Componentes de não-micro-organismos que são separados dos micro-organismos podem incluir células de não-micro-organismos (por exemplo, células sanguíneas e/ou outras células epidérmicas) e/ou qualquer um de seus componentes.

[025] Conforme usado no presente documento, o termo "camada de densidade" refere-se a uma solução de densidade totalmente homogênea.

[026] Conforme usado no presente documento, o termo "ligante de afinidade que determina a resistência" refere-se a qualquer composto ou molécula detectável que se ligue a um micro-organismo resistente a antibióticos em uma proporção diferente (por exemplo, no que se refere à quantidade de ligantes ligados, no grau de ligação e/ou na afinidade de ligação etc.) de uma linhagem sensível a antibióticos do mesmo micro-organismo. Conforme usado no presente documento, o termo inclui ligantes não-marcados

e ligantes que tenham sido conjugados a uma marcação detectável. Em algumas concretizações, o ligante de afinidade que determina a resistência liga-se em uma proporção menor à linhagem resistente a antibióticos do que à linhagem sensível a antibióticos. Em outras concretizações, o ligante de afinidade que determina a resistência liga-se em uma proporção maior à linhagem resistente a antibióticos do que à linhagem sensível a antibióticos.

[027] Conforme usado no presente documento, o termo "ligado", quando se referir a um ligante de afinidade que determina a resistência, trata-se da associação física do ligante ao micro-organismo. O termo inclui a ligação física real do ligante ao micro-organismo, por exemplo, ligação covalente ou não-covalente a uma estrutura do micro-organismo (tal como uma proteína intracelular ou superficial, ácido nucleico, organela, membrana celular, parede celular etc.). O termo também inclui associações do ligante ao micro-organismo que não envolvam a ligação física, por exemplo, aprisionamento do ligante dentro do micro-organismo. Por exemplo, o ligante de afinidade que determina a resistência pode compreender um substrato enzimático para uma enzima intracelular e ficar preso dentro da célula após sofrer a ação da enzima.

[028] Conforme usado no presente documento, o termo "mesmo micro-organismo" refere-se a um micro-organismo do mesmo gênero e espécie que o micro-organismo em questão.

[029] Conforme usados no presente documento, os termos "liga-se a uma quantidade diferente", "diferença na quantidade de ligantes ligados" e suas variantes referem-se a uma diferença na quantidade de ligações de ligantes de afinidade que determinam a resistência entre dois micro-organismos que seja estatisticamente significativa. Uma diferença de ligações "estatisticamente significativa" é de ao menos cerca de 5%, por exemplo, de ao menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% ou mais. O termo "liga-se na mesma quantidade" e suas variantes referem-se a uma diferença na quantidade de ligações do

ligante de afinidade que determina a resistência entre dois micro-organismos que seja inferior a cerca de 20%, por exemplo, inferior a 15%, 10%, 5%, 1% ou menos. A quantidade de ligantes ligados pode ser determinada por qualquer método conhecido pelos versados na técnica, por exemplo, medindo-se uma propriedade inerente do ligante ou uma propriedade de uma marcação detectável ligada ao ligante.

[030] Conforme usados no presente documento, os termos “uma afinidade de ligação diferente”, “diferença na afinidade de ligação do ligante” e suas variantes referem-se a uma diferença na afinidade de ligação do ligante de afinidade que determina a resistência entre dois micro-organismo inferior a cerca de 5%, por exemplo, inferior a cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% ou mais. O termo “mesma afinidade de ligação” e suas variantes referem-se a uma diferença na afinidade de ligação do ligante de afinidade que determina a resistência entre dois micro-organismos inferior a cerca de 20%, por exemplo, inferior a 15%, 10%, 5%, 1% ou menos. A afinidade de ligação de um ligante pode ser determinada por qualquer método conhecido pelos versados na técnica, por exemplo, medindo-se uma propriedade inerente do ligante ou uma propriedade de uma marcação detectável ligada ao ligante.

[031] A presente invenção propõe métodos e sistemas para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo. Os métodos rápidos permitem determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo com mais rapidez do que as técnicas anteriores, levando a diagnósticos (por exemplo, em um paciente que tenha ou suspeito de ter septicemia e/ou outras infecções) e à caracterização de materiais contaminados (por exemplo, gêneros alimentícios, abastecimentos de água e produtos farmacêuticos) com mais rapidez. As etapas envolvidas nos métodos da invenção, desde a obtenção de uma amostra à determinação do estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo, podem ser realizadas em um espaço de tempo bem curto para produzir informações clinicamente relevantes.

Em determinadas concretizações, é possível realizar os métodos da presente invenção em menos de cerca de 240 minutos, por exemplo, em menos de 180, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 ou 1 minuto. A tremenda rapidez dos métodos da presente invenção representa um avanço em relação aos métodos anteriores. Os métodos podem ser usados para determinar o estado de resistência a antibióticos de qualquer micro-organismo, conforme descrito no presente documento. Em uma concretização, o micro-organismo é uma bactéria. Em outra, uma levedura. Em outra, um fungo. Em ainda outra, um parasita. Já em outra, um *mollicute*. Ademais, os métodos da presente invenção podem ser total ou parcialmente automatizados, diminuindo assim o risco de manusear materiais contagiosos e/ou de contaminar as amostras.

[032] Um primeiro aspecto da presente invenção refere-se a um método para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo, o método sendo caracterizado por compreender:

(a) colocar o micro-organismo em contato com um ligante de afinidade que determina a resistência em condições nas quais se forme um complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência;

(b) separar o complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência formado em (a) de ligantes de afinidade que determinam a resistência livres;

(c) determinar a quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência; e

(d) comparar a quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência à quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada a uma linhagem sensível ou resistente a antibióticos do mesmo organismo ou de uma população de linhagens sensíveis ou resistentes a antibióticos conhecidas;

em que, se o micro-organismo no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência se ligar a uma quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência diferente da quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo sensível a antibióticos ou se o micro-organismo no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência se ligar à mesma quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo resistente a antibióticos, o micro-organismo é identificado como resistente a antibióticos.

[033] Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo, o método sendo caracterizado por compreender:

(a) obter uma amostra de teste que contenha ou acredite-se conter micro-organismos;

(b) colocar o micro-organismo da amostra de teste em contato com um ligante de afinidade que determina a resistência em condições nas quais se forme um complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência;

(c) como opção, acrescentar um ou mais corantes fluorescentes que meçam o metabolismo celular ou a integridade da membrana;

(d) como opção, seletivamente submeter a lise qualquer célula não-microbiana que se faça presente na amostra para produzir uma amostra lisada;

(e) separar os micro-organismos de outros componentes da referida amostra de teste, ou referida amostra lisada, para formar um precipitado de micro-organismos;

(f) interrogar o precipitado para tirar medidas dos micro-organismos;

(g) determinar o estado de resistência a antibióticos dos

micro-organismos na amostra de teste com base na comparação das medidas com as medidas tiradas, ou previstas, para micro-organismos resistentes e/ou sensíveis a antibióticos da mesma espécie.

[034] Uma vantagem dos métodos da presente invenção é a rapidez com que são realizados. Outra vantagem é que os métodos podem ser realizados em micro-organismos intactos. A identificação de micro-organismos resistentes a antibióticos pode ser realizada sem a necessidade de submissão a lise ou a destruição dos micro-organismos de alguma outra forma a fim de, por exemplo, expor componentes intracelulares ou isolar membranas celulares, embora os métodos descritos no presente documento possam ser realizados com micro-organismos lisados ou, de alguma outra forma, não-intactos. Sendo assim, não há a necessidade de condições severas, como pH extremo, detergentes ou calor. Ademais, como os micro-organismos não precisam ser destruídos pelos métodos de determinação, eles permanecem disponíveis para novos testes ou usos.

Amostras

[035] Em algumas amostras da invenção, o micro-organismo que será testado quanto à resistência a antibióticos se faz presente em uma ou mais amostras. As amostras que podem ser testadas pelos métodos da presente invenção incluem amostras clínicas e não-clínicas em que haja ou suspeite-se da presença e/ou do desenvolvimento de micro-organismos, bem como amostras de materiais rotineira ou ocasionalmente testadas quanto à presença de micro-organismos. A quantidade da amostra usada varia bastante em virtude da versatilidade e/ou sensibilidade do método. O preparo das amostras pode ser realizado por qualquer número de métodos conhecidos pelos versados na técnica, embora uma das vantagens da presente invenção seja que amostras de tipo complexo, como, por exemplo, o sangue, fluidos corporais e/ou substâncias opacas, podem ser testadas diretamente usando-se o sistema com pouco ou sem nenhum pré-tratamento prolongado.

[036] Amostras clínicas que podem ser testadas

incluem qualquer tipo de amostra normalmente testado em clínicas ou laboratórios de exame, incluindo, entre outros, sangue, soro sanguíneo, plasma, frações sanguíneas, líquidos sinoviais, urina, sêmen, saliva, fezes, líquido cefalorraquidiano, matérias gástricas, secreções vaginais, homogeneizados de tecido, aspirados da medula óssea, homogeneizados ósseos, muco, aspirados, zaragatoa e rinçado de zaragatoa, outros fluidos corporais e seus semelhantes.

[037] A presente invenção encontra aplicação em exames, bem como em aplicações médicas e veterinárias. Pacientes adequados dos quais é possível obter amostras clínicas são geralmente mamíferos, mas podem incluir qualquer animal. Conforme usado no presente documento, o termo “mamífero” inclui, entre outros, seres humanos, primatas, bois, carneiros, bodes, porcos, cavalos, gatos, cães, coelhos, roedores (por exemplo, ratos ou camundongos) etc. Pacientes humanos incluem pacientes neonatos, pediátricos, jovens, adultos e geriátricos. Pacientes dos quais é possível obter amostras incluem, sem restrições, mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes.

[038] Amostras não-clínicas que podem ser testadas também incluem substâncias que abrangem, entre outras, alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, cosméticos, água (por exemplo, água potável, água não-potável e água residual), lastros de água do mar, ar, terra, esgoto, plantas (por exemplo, sementes, folhas, caules, raízes, flores, frutos), componentes sanguíneos (por exemplo, plaquetas, soro sanguíneo, frações de glóbulos brancos etc.), amostras de tecido ou órgãos doados, amostras de guerra biológica, entre outros. O método também é particularmente bastante adequado a testes em tempo real para monitorar níveis de contaminação, controle processual, controle de qualidade e seus semelhantes em padrões industriais, comerciais e/ou clínicos.

[039] Em uma concretização da presente invenção, as amostras são obtidas de um paciente que tenha ou suspeito de ter uma

infecção microbiana. Em outra, ele tem ou suspeita-se ter septicemia, por exemplo, bacteremia ou fungemia. A amostra pode ser uma amostra sanguínea coletada diretamente do paciente. Ela pode ser uma cultura sanguínea cultivada a partir de uma amostra de sangue do paciente, por exemplo, uma cultura sanguínea BacT/ALERT®. A amostra pode ser de uma cultura sanguínea positiva, por exemplo, uma cultura sanguínea que indique a presença de micro-organismos. Em certas concretizações, a amostra é recolhida de uma cultura sanguínea positiva pouco tempo após se tornar positiva, por exemplo, dentro de cerca de 6 horas, por exemplo, em cerca de 5, 4, 3 ou 2 horas, ou em de cerca de 60 minutos, por exemplo, em cerca de 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 ou 1 minuto. Em uma concretização, a amostra é recolhida de uma cultura em que os micro-organismos encontram-se na fase de crescimento exponencial. Em outra concretização, a amostra é recolhida de uma cultura em que os micro-organismos encontram-se na fase estacionária.

[040] A presente invenção confere alta sensibilidade à detecção de micro-organismos resistentes a antibióticos, o que permite a detecção sem, primeiramente, ter que realizar as etapas de isolar os micro-organismos cultivando-os em um meio sólido ou semissólido e recolher amostras das colônias cultivadas. No entanto, em uma concretização da presente invenção, a amostra advém de uma colônia microbiana (por exemplo, de bactérias, leveduras ou fungos) cultivada em uma superfície sólida ou semissólida.

[041] O volume da amostra deve ser grande o bastante para produzir uma quantidade detectável (por exemplo, um precipitado) de micro-organismos que possa ser interrogada após a etapa de separação dos métodos da invenção. O volume adequado dependerá da fonte da amostra e do nível previsto de micro-organismos nela. Por exemplo, uma cultura sanguínea positiva conterá mais micro-organismos por volume do que uma amostra de água potável que será testada quanto à contaminação, fazendo

assim com que seja necessário um menor volume do meio de cultura sanguínea em comparação à amostra de água potável. Em termos gerais, o tamanho das amostras pode ser inferior a 50 ml, por exemplo, inferior a cerca de 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3 ou 2 ml. Em certas concretizações, o tamanho da amostra pode ser de cerca de 1 ml, por exemplo, de cerca de 0,75, 0,5 ou 0,25 ml. Em certas concretizações, em que a separação é realizada em microescala, o tamanho da amostra pode ser inferior a cerca de 200 µl, por exemplo, inferior a cerca de 150, 100, 50, 25, 20, 15, 10 ou 5 µl. Em algumas concretizações (por exemplo, quando espera-se que a amostra contenha poucos micro-organismos), o tamanho da amostra pode ser de cerca de 100 ml ou mais, por exemplo, de cerca de 250, 500, 750, 1.000 ml ou mais.

Etapa de contato

[042] Em um aspecto da presente invenção, colocamos o micro-organismo, ou uma amostra que o contenha, em contato com um ligante de afinidade que determina a resistência. Em uma concretização, o contato pode ocorrer no meio da amostra, por exemplo, acrescentando-se o ligante a ela. Em outra concretização, o contato ocorre em uma mistura ou composição de ligação na qual sejam introduzidos tanto o micro-organismo quanto o ligante. Em outra concretização, o ligante de afinidade que determina a resistência é disposto na camada de densidade no recipiente de separação. Em uma concretização, o ligante de afinidade que determina a resistência é um antibiótico, por exemplo, penicilina ou outro antibiótico β-lactâmico, vancomicina ou outro antibiótico de glicopeptídeos, polimixina B ou ceftobiprole, bem como qualquer combinação desses. Em outra concretização, o ligante de afinidade que determina a resistência é um anticorpo ou fragmento de anticorpo monoclonal ou policlonal, sonda de ácido nucleico, aptâmero, ligante, substrato enzimático, peptídeo mimético, proteínas de ligação derivadas de fagos, lipídio, carboidrato, polissacarídeo, proteína ou qualquer combinação desses. Se o ligante de afinidade que determina a resistência por si só não emitir um sinal detectável, ele pode ser marcado para tanto, tal como

conjugando-o a um marcador (por exemplo, visível ou fluorescente). Marcadores incluem, entre outros, compostos fluorescentes, luminescentes, fosforescentes, radioativos, Raman-ativos, reativos à espectrometria de massa e/ou colorimétricos. Ligantes de afinidade que determinam a resistência marcados incluem, entre outros, penicila marcada (por exemplo, penicilina marcada com BOCILLIN™-FL) e vancomicina marcada (por exemplo, vancomicina marcada com BODIPY™-FL) (Life Technologies, Carlsbad, CA).

[043] O contato do ligante de afinidade que determina a resistência com o micro-organismo, ou amostra que o contenha, pode ser realizado por qualquer método desde que ocorra uma quantidade detectável de ligações entre o ligante e o micro-organismo (por exemplo, forme-se um complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência) e haja uma diferença mensurável na quantidade de ligações ou na afinidade de ligação entre os micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos. A quantidade de ligante de afinidade que determina a resistência posto em contato com o micro-organismo e o tempo de contato devem ser suficientes para que ocorra a ligação do ligante ao micro-organismo, resultando na formação de um complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência, e dependem de vários fatores, incluindo, o tipo do micro-organismo, o tipo do ligante, a afinidade do ligante com o micro-organismo, se o alvo de ligação do ligante é extra ou intracelular, a temperatura, condições de tamponamento etc., como é de conhecimento dos versados na técnica. O tempo de contato pode ser, por exemplo, de 240 minutos ou menos, por exemplo, de cerca de 180, 120, 90, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 10, 5, 4, 3, 2, 1 minuto ou menos. O contato pode ocorrer a qualquer temperatura adequada à ocorrência da ligação do ligante ao micro-organismo, por exemplo, de cerca de 4° C a cerca de 50° C, por exemplo, de cerca de 15° C a cerca de 40° C, por exemplo, de cerca de 37° C ou à temperatura ambiente. A etapa de contato pode ser realizada em um recipiente adequado, por exemplo, no mesmo recipiente em que ocorre a etapa de separação ou em outro recipiente.

Etapa de separação

[044] Após o micro-organismo, ou amostra que o contenha, entrar em contato com um ligante de afinidade que determina a resistência e uma quantidade detectável ou mensurável de ligação do ligante ao micro-organismo ocorrer, realiza-se uma etapa de separação para separar o complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência de ligantes de afinidade que determinam a resistência livres, bem como para separar o micro-organismo de outros componentes da amostra e/ou mistura ou composição de ligação. Em uma concretização, a etapa de separação concentra os complexos de micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência em um precipitado que pode ser interrogado para determinar o estado de resistência a antibióticos do micro-organismo. A separação do micro-organismo de outros componentes da amostra e/ou da mistura ou composição de ligação não precisa ser completa, isto é, não é necessário que ocorra uma separação 100%. Só é necessário que a separação do micro-organismo de outros componentes (por exemplo, ligantes livres) seja suficiente para permitir a interrogação dos micro-organismos sem interferência significativa dos outros componentes. Por exemplo, a separação pode resultar em um precipitado de micro-organismos cerca de ao menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% puro ou mais.

[045] Em uma concretização, a separação é realizada por uma etapa de centrifugação em que os complexos de micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência são dispostos sobre uma camada de densidade em um recipiente de separação e, então, o recipiente é centrifugado em condições em que os complexos se concentrem no fundo e/ou nas laterais do recipiente e os ligantes livres e outros componentes da amostra e/ou mistura ou composição de ligação fiquem sobre a camada de densidade ou dentro da parte superior dela. Esta separação isola os micro-organismos de materiais, tal como o meio, resíduos celulares e/ou outros componentes, que interferem na detecção e/ou medição da ligação do

ligante de afinidade que determina a resistência aos micro-organismos. Em uma concretização, a camada de densidade também serve para separar micro-organismos vivos de micro-organismos mortos (os quais não a atravessam por completo). Em outra concretização, a camada de densidade não compreende um gradiente de densidade, seja antes ou depois da centrifugação. Em outras palavras, o recipiente de separação não é centrifugado por tempo ou aceleração suficientes para que o material que constitui a camada de densidade forme um gradiente de densidade.

[046] A densidade da camada é selecionada de modo que os complexos de micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência na amostra e/ou mistura ou composição de ligação a atravessem, ao passo que ligantes de afinidade que determinam a resistência livres e outros componentes da amostra e/ou mistura ou composição de ligação (por exemplo, o caldo de cultura sanguínea, resíduos celulares etc.) permaneçam sobre ela ou não a atravessem por completo. A camada de densidade também pode ser selecionada para separar micro-organismos vivos (que a atravessam) de micro-organismos mortos (que não a atravessam). A densidade adequada dependerá do material usado na camada de densidade e da amostra que será separada. Em uma concretização, a densidade da camada encontra-se na faixa de cerca de 1,025 g/ml a cerca de 1,120 g/ml, por exemplo, de cerca de 1,030 g/ml a cerca de 1,070 g/ml, de cerca de 1,040 g/ml a cerca de 1,060 g/ml ou qualquer faixa de cerca de 1,025 g/ml a cerca de 1,120 g/ml. Em outra concretização, a densidade da camada é de cerca de 1,025 g/ml, 1,030 g/ml, 1,035 g/ml, 1,040 g/ml, 1,045 g/ml, 1,050 g/ml, 1,055 g/ml, 1,060 g/ml, 1,065 g/ml, 1,070 g/ml, 1,075 g/ml, 1,080 g/ml, 1,085 g/ml, 1,090 g/ml, 1,095 g/ml, 1,100 g/ml, 1,105 g/ml, 1,110 g/ml, 1,115 ou 1,120 g/ml.

[047] O material da camada de densidade pode ser qualquer material ou combinação de materiais que tenha a faixa de densidade adequada aos métodos da presente invenção. Materiais adequados que podem ser usados para preparar a camada de densidade incluem óleos de baixa e alta

densidade, tal como o óleo de imersão para microscopia (por exemplo, Type DF; Cargille Labs, Nova Iorque) e o óleo mineral (por exemplo, Drakeol® 5, Draketex 50, Peneteck®; Penreco Co., Pensilvânia). Outro material adequado é a sílica coloidal. A sílica coloidal pode ser não-revestida (por exemplo, Ludox®, W. R. Grace, CT) ou revestida, por exemplo, com silano (por exemplo, PureSperm®, Nidacon Int'l, Suécia; Isolate®, Irvine Scientific, Santa Ana, CA; ou Percoll™, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ou polivinilpirrolidona (por exemplo, Percoll™, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Em uma concretização, opta-se pela sílica coloidal que apresenta a menor interferência na interrogação espectroscópica, por exemplo, o material com a menor fluorescência intrínseca. A sílica coloidal pode ser diluída em qualquer meio adequado para adotar a densidade adequada, por exemplo, soluções de sal equilibradas, soro fisiológico e/ou 0,25 M de sacarose. A densidade adequada pode ser obtida com a sílica coloidal a uma concentração de cerca de 15% a cerca de 80% em v/v, por exemplo, de cerca de 20% a cerca de 65% em v/v. Outro material adequado seria um agente de contraste iodado, por exemplo, iohexol (Omnipaque™, NycoPrep™ ou Nycodenz®) ou iodixanol (Visipaque™ ou OptiPrep™). A densidade adequada pode ser obtida com iohexol ou iodixanol a uma concentração de cerca de 10% a cerca de 25% em p/v, por exemplo, de cerca de 14% a cerca de 18% em p/v, no caso de amostras de cultura sanguínea. A sacarose pode ser usada como camada de densidade a uma concentração de cerca de 10% a cerca de 30% em p/v, por exemplo, de cerca de 15% a cerca de 20% em p/v, no caso de amostras de cultura sanguínea. Outros materiais adequados a camadas de densidade incluem, entre outros, óleo de silicone (polidimetilsiloxano), óleo de fluorossilicone, gel de silicone, metrizoato-Ficoll® (LymphoPrep™), por exemplo, a uma concentração de cerca de 75% a cerca de 100% no caso de amostras de cultura sanguínea, diatrizoato-dextrano (PolymorphoPrep™), por exemplo, a uma concentração de cerca de 25% a cerca de 50% no caso de amostras de cultura sanguínea, carboximetil-celulose, hidroxipropilmetil-celulose, óxido de polietileno (peso

molecular elevado), Pluronic® F127, Pluronic® F68, misturas de compostos de Pluronic®, ácido poliacrílico, álcool polivinílico reticulado, polivinil-pirrolidina reticulada, metil-éter-metacrilato de PEG, pectina, agarose, xantano, gelano, Phytagel®, sorbitol, Ficoll® (por exemplo, Ficoll® 400 a uma concentração de cerca de 10% a cerca de 15% no caso de amostras de cultura sanguínea), glicerol, dextrano (por exemplo, a uma concentração de cerca de 10% a cerca de 15% no caso de amostras de cultura sanguínea), glicogênio, cloreto de césio (por exemplo, a uma concentração de cerca de 15% a cerca de 35% no caso de amostras de cultura sanguínea), fluidos de perfluorocarbono (por exemplo, perfluoro-n-octano), fluidos de hidrofluorocarbono (por exemplo, Vertrel XF) e seus semelhantes bem conhecidos na técnica. A camada de densidade também pode ser feita de uma combinação de materiais, incluindo uma combinação de dois ou mais dos materiais listados acima. Em uma concretização, a camada de densidade é feita de uma combinação de óleo de imersão com óleo mineral, por exemplo, a uma razão de cerca de 0,8 a cerca de 1,2 partes de óleo de imersão para cerca de 0,7 a cerca de 1,0 partes de óleo mineral. Em uma concretização, a camada de densidade compreende óleo de imersão Type DF e óleo de imersão Drakeol 5, por exemplo, 1.000 do óleo de imersão Type DF para 0,875 partes do óleo mineral Drakeol 5. Em outra concretização, a camada de densidade consiste em cloreto de césio (por exemplo, 24% em p/v de cloreto de césio).

[048] O volume/altura da camada de densidade deve ser suficiente para consolidar a separação dos complexos de micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência de ligantes de afinidade que determinam a resistência livres e outros componentes da amostra e/ou mistura ou composição de ligação. O volume dependerá do tamanho e do formato do recipiente de separação. Em termos gerais, é possível adotar um volume de cerca de 0,1 ml a cerca de 5 ml, por exemplo, de cerca de 0,2 ml a cerca de 1 ml, por exemplo, de cerca de 0,2 ml a cerca de 0,5 ml. Se a separação for realizada em microescala, o volume da camada de

densidade pode ser de cerca de 1 µl a cerca de 100 µl, por exemplo, de cerca de 5 µl a cerca de 50 µl. O volume da amostra e/ou mistura ou composição de ligação disposta sobre a camada de densidade deve ser suficiente para que um número suficiente de micro-organismos seja detectável e/ou mensurável, por exemplo, para produzir um precipitado suscetível à interrogação. Em geral, é possível usar qualquer volume que caiba no recipiente. Por exemplo, é possível usar um volume de cerca de 0,1 ml a cerca de 5 ml, por exemplo, de cerca de 0,2 ml a cerca de 1 ml, por exemplo, de cerca de 0,2 ml a cerca de 0,5 ml. Se a separação for realizada em microescala, o volume pode ser de cerca de 1 µl a cerca de 100 µl, por exemplo, de cerca de 5 µl a cerca de 50 µl. Em certas concretizações, o volume pode ser reduzido e/ou a concentração de micro-organismos aumentada antes de inserir a amostra e/ou mistura ou composição de ligação no recipiente de separação para que ela passe a ter um volume adequado para preencher o recipiente. Por exemplo, a amostra e/ou mistura ou composição de ligação pode ser filtrada a fim de diminuir-lhe o volume e/ou recolher os micro-organismos. O espaço disponível no recipiente para a amostra e/ou mistura ou composição de ligação dependerá do tamanho e do formato do recipiente. Em algumas concretizações, uma camada intermediária (líquida ou sólida) pode ser disposta sobre a camada de densidade antes de a amostra e/ou mistura ou composição de ligação ser disposta sobre ela a fim de evitar qualquer mistura da camada de densidade com a amostra e/ou mistura ou composição de ligação. Em uma concretização, a camada intermediária pode ser de microesferas de polipropileno. Em outra concretização, uma pequena bolha de ar pode ser disposta entre a camada de densidade e a amostra e/ou mistura ou composição de ligação para evitar que elas se misturem. Em outra concretização, a camada de densidade pode ser disposta sobre um material de alta densidade (por exemplo, um fluido de perfluorocarbono) de modo que os complexos de micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência atravessem a camada de densidade durante a separação e aglomerem-se entre a camada de densidade e o

material de alta densidade.

[049] Em uma concretização da invenção, o recipiente de separação é centrifugado para que os complexos de micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência formem um precipitado diretamente no fundo do recipiente. O recipiente é centrifugado a uma aceleração suficiente e por tempo suficiente para que os complexos de micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência se precipitem e/ou se separem de ligantes livres e outros componentes da amostra e/ou mistura ou composição de ligação. A aceleração da centrifugação pode ser de cerca de 1.000 por g a cerca de 20.000 por g, por exemplo, de cerca de 2.500 por g a cerca de 15.000 por g, por exemplo, de cerca de 7.500 por g a cerca de 12.500 por g etc. O tempo de centrifugação pode ser de cerca de 30 segundos a cerca de 30 minutos, por exemplo, de cerca de 1 minuto a cerca de 15 minutos, por exemplo, de cerca de 1 minuto a cerca de 5 minutos. A centrifugação pode ocorrer a uma temperatura de cerca de 2° C a cerca de 45° C, por exemplo, de cerca de 15° C a cerca de 40° C, por exemplo, de cerca de 20° C a cerca de 30° C. Em uma concretização, o recipiente de separação compreende um dispositivo de fechamento, o qual é aplicado a ele para formar uma vedação hermética antes da centrifugação. A presença de uma tampa diminui o risco inerente do manuseio de micro-organismos que sejam ou possam ser contagiosos e/ou perigosos, bem como o risco de contaminar a amostra e/ou mistura ou composição de ligação. Uma das vantagens dos métodos da presente invenção é a possibilidade de realizar uma ou mais das etapas dos métodos (por exemplo, contato, separação, e/ou comparação) com os micro-organismos em um recipiente fechado (por exemplo, um recipiente hermeticamente fechado). Os métodos da presente invenção, que incluem o uso de sistemas automatizados, evitam riscos à saúde e à segurança inerentes do manuseio de micro-organismos altamente virulentos, como ocorre na recuperação de micro-organismos de amostras para testes diretos. Em uma concretização, o recipiente não é centrifugado por tempo e/ou força suficientes

para que se forme um gradiente de densidade na camada de densidade. A presente invenção não inclui a ultracentrifugação, por exemplo, centrifugação a forças superiores a cerca de 100.000 por g. Ademais, a presente invenção não inclui a sedimentação ou bandagem isopícnica (de equilíbrio).

[050] O recipiente de separação pode ser qualquer recipiente com volume o suficiente para reter uma camada de densidade e uma amostra e/ou mistura ou composição de ligação. Em uma concretização, o recipiente se encaixa ou cabe dentro de um rotor de centrífuga. O volume do recipiente pode ser de cerca de 0,1 ml a cerca de 25 ml, por exemplo, de cerca de 1 ml a cerca de 10 ml, por exemplo, de cerca de 2 ml a cerca de 8 ml. Se a separação for realizada em microescala, o volume do recipiente pode ser de cerca de 2 µl a cerca de 100 µl, por exemplo, de cerca de 5 µl a cerca de 50 µl. Em uma concretização, o recipiente tem um diâmetro interno largo na parte superior, a fim de armazenar a amostra e/ou mistura ou composição de ligação e a maior parte da camada de densidade, e um diâmetro interno estreito na parte inferior, onde se acumula o precipitado do complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência. A parte estreita pode ter um diâmetro interno de cerca de 0,102 cm a cerca de 0,305 cm, por exemplo, de cerca de 0,152 cm a cerca de 0,254 cm, por exemplo, de cerca de 0,203 cm. A parte larga pode ter um diâmetro interno de cerca de 0,813 cm a cerca de 1,016 cm, por exemplo, de cerca de 0,864 cm a cerca de 9,65 cm, por exemplo, de cerca de 0,914 cm. No caso de separações em microescala, os diâmetros internos podem ser ainda menores. Por exemplo, o diâmetro interno da parte estreita pode ser de cerca de 0,003 cm a cerca de 0,102 cm, por exemplo, de cerca de 0,005 cm a cerca de 0,025 cm. Uma parte de diâmetro interno afunilado pode conectar as partes superior e inferior. A parte afunilada pode ter um ângulo de cerca de 20° a cerca de 70°, por exemplo, de cerca de 30° a cerca de 60°. Em uma concretização, a parte estreita inferior corresponde a menos da metade da altura total do recipiente, por exemplo, menos de cerca de 40%, 30%, 20% ou 10% da altura total do recipiente. O recipiente pode ter

um dispositivo de fechamento conectado a ele ou pode ser roscado para aceitar um dispositivo de fechamento (por exemplo, uma tampa) de modo que seja possível mantê-lo fechado hermeticamente durante a centrifugação. Em certas concretizações, o recipiente é projetado de modo que o precipitado de micro-organismos possa ser prontamente recuperado do recipiente após a separação, seja de maneira manual ou automatizada (desde que os técnicos não sejam expostos ao conteúdo do recipiente). Por exemplo, o recipiente pode compreender uma parte removível ou uma parte retirável que contenha o precipitado e que possa se separar do resto do recipiente. Em outra concretização, o recipiente compreende meios para acessar o precipitado após a separação, tal como uma ou mais portas e/ou superfícies permeáveis para a introdução de uma seringa e/ou outro dispositivo de coleta de amostra ou para remover o precipitado. Em uma concretização, o recipiente pode ser um tubo, por exemplo, um tubo de centrífuga. Em outra concretização, o recipiente pode ser um *chip* ou cartão. Em uma concretização, o recipiente é um recipiente independente, isto é, um dispositivo para separar uma única amostra. Em outras concretizações, o recipiente faz parte de um dispositivo que compreende dois ou mais recipientes de separação, possibilitando que várias amostras sejam separadas ao mesmo tempo. Em uma concretização, o dispositivo compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 96 ou mais recipientes de separação. Em uma concretização, o recipiente de separação é o dispositivo de separação revelado no pedido de patente dos Estados Unidos de nº de série 12/589.969, intitulado "*Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms*", depositado no dia 30 de outubro de 2009.

[051] O recipiente pode compreender uma janela óptica através da qual seja possível determinar a ligação (por exemplo, detectar a quantidade de ligação e/ou medir a afinidade de ligação). A janela óptica pode ser debaixo, em cima e/ou nas laterais do recipiente. A janela pode ser feita de qualquer material permeável à luz, por exemplo, permeável a ao menos parte

do espectro de luz infravermelha próxima (NIR; 700 nm a 1.400 nm), ultravioleta (UV; 190 nm a 400 nm) e/ou visível (VIS; 400 nm a 700 nm). Exemplos de materiais adequados incluem, entre outros, acrílico, metacrilato, quartzo, sílica fundida, safira, um copolímero de olefinas cíclicas (COC), poliestireno, policarbonato e/ou polipropileno. Em uma concretização, o recipiente todo é feito do material da janela óptica. Em outra concretização, o recipiente pode ser preparado (por exemplo, moldado) a partir de duas ou mais partes distintas, tal como um componente óptico permeável à luz ultravioleta, visível ou infravermelha próxima para a janela óptica e outro material (por exemplo, um plástico de moldagem padrão econômico) que forme o resto do recipiente. Em uma concretização, a janela óptica é fina o bastante para permitir a interrogação espectroscópica, que dependerá do material da janela. Em outra concretização, a janela óptica é o mais fina possível para diminuir interferências na interrogação espectroscópica. Por exemplo, a janela pode ter uma espessura inferior a cerca de 0,508 cm, por exemplo, inferior a cerca de 0,381 cm, 0,254 cm ou 0,127 cm.

[052] Em outra concretização, a separação ocorre em uma etapa de filtragem, na qual a amostra e/ou mistura ou composição de ligação é disposta em um dispositivo munido de um filtro ou conjunto de filtros seletivos com poros de um tamanho capaz de reter os micro-organismos. Os micro-organismos retidos podem ser lavados passando-se com delicadeza um tampão adequado através do filtro. Os micro-organismos lavados podem, então, ser interrogados diretamente no filtro e/ou recuperados para interrogação coletando amostras diretamente da superfície do filtro ou revertendo-se o fluxo do filtro com um tampão aquoso adequado.

Etapa de lise opcional

[053] Em algumas concretizações dos métodos da invenção, como opção, a amostra que compreende o micro-organismo pode ser tratada para seletivamente submeter a lise células não-microbianas (por exemplo, células indesejadas) que se façam presentes nela, por exemplo,

células sanguíneas e/ou células de tecido, por exemplo, antes da etapa de separação. As células são submetidas a lise para permitir a separação dos micro-organismos de outros componentes da amostra. A separação dos micro-organismos de outros componentes evita interferências durante a etapa de detecção. Caso não se espere a presença de células de não-micro-organismos na amostra ou não se espere que elas interfiram na etapa de detecção, a etapa de lise torna-se desnecessária. Em uma concretização, as células submetidas a lise são células de não-micro-organismos presentes na amostra, e nenhuma célula de micro-organismo presente na amostra é submetida a lise. No entanto, em algumas concretizações, a lise seletiva de classes específicas de micro-organismos pode ser desejada e, portanto, realizada de acordo com os métodos descritos neste documento e conforme de conhecimento geral na técnica. Por exemplo, uma classe de micro-organismos indesejada pode ser seletivamente submetida a lise, por exemplo, as leveduras podem ser submetidas a lise, ao passo que as bactérias não, ou vice-versa. Em outra concretização, os micro-organismos desejados são submetidos a lise a fim de separar um componente subcelular específico deles, por exemplo, membranas celulares ou organelas. Em uma concretização, todas as células não-microbianas são submetidas a lise. Em outras concretizações, parte das células não-microbianas é submetida a lise, por exemplo, células o bastante para evitar interferências na etapa de detecção. É possível realizar a lise das células por meio de qualquer método conhecido na técnica eficiente para submeter seletivamente a lise células com ou sem micro-organismos de lise, incluindo, entre outros, a adição de uma solução de lise, sonicação, choque osmótico, ciclos de congelamento-descongelamento, tratamento químico e/ou uma combinação desses.

[054] Uma solução de lise é aquela capaz de submeter células a lise, por exemplo, células de não-micro-organismos (por exemplo, solubilizando membranas celulares eucarióticas) e/ou células de micro-organismos. Em uma concretização, a solução de lise compreende um ou mais

detergentes, uma ou mais enzimas ou uma combinação de um ou mais detergentes e uma ou mais enzimas, além de poder incluir ainda outros agentes. Em uma concretização, o detergente é um detergente lítico não-desnaturalizante, tal como Triton® X-100, Triton® X-100-R, Triton® X-114, NP-40, Genapol® C-100, Genapol® X-100, Igepal® CA 630, Arlasolve™ 200, Brij® 96/97, CHAPS, octil-β-D-glicopiranosídeo, saponina, éter de nonaetileno-glicol-monododecila (C12E9, polidocenol) e éter de polioxietileno (C12E10, por exemplo, Genapol® C-100). Como opção, é possível incluir detergentes líticos desnaturalizantes, tal como dodecil-sulfato de sódio, N-laurilsarcosina, desoxicolato de sódio, sais biliares, brometo de hexadeciltrimetilamônio, SB3-10, SB3-12, amidossulfobetaína-14, e C7BzO. Como opção, também é possível incluir solubilizantes, tal como Brij® 98, Brij® 58, Brij® 35, Tween® 80, Tween® 20, Pluronic® L64, Pluronic® P84, Pluronic® F108, sulfobetaínas não-detergentes (NDSB 201), anfipóis (PMAL-C8) e metil-β-ciclodextrina. Normalmente, os detergentes não-desnaturalizantes e os solubilizantes são usados em concentrações acima de sua concentração micelar crítica (CMC), ao passo os detergentes desnaturalizantes podem ser acrescentados a concentrações abaixo de sua CMC. Por exemplo, é possível usar detergentes líticos não-desnaturalizantes a uma concentração de cerca de 0,010% a cerca de 10%, por exemplo, de cerca de 0,015% a cerca de 1,0%, por exemplo, de cerca de 0,05% a cerca de 0,5%, por exemplo, de cerca de 0,10% a cerca de 0,30% (concentração final após diluição com a amostra). Em outra concretização, detergentes de polioxietileno podem ser preferidos. Os detergentes de polioxietileno podem compreender a estrutura C_{12-18}/E_{9-10}, em que C_{12-18} indica uma cadeia de carbono com 12 a 18 átomos de carbono, e E_{9-10} indica de 9 a 10 grupos-cabeça hidrófilos de oxietileno. Por exemplo, o detergente de polioxietileno pode ser escolhido dentre o grupo composto por Brij® 97, Brij® 96V, Genapol® C-100, Genapol® X-100, polidocenol ou uma combinação desses. Enzimas que podem ser usadas em soluções de lise incluem, entre outras, enzimas que digiram ácidos nucléicos e outros materiais

que incrustam a membrana (por exemplo, proteinase XXIII, DNase, neuraminidase, polissacaridase, Glucanex® e Pectinex®). Outros aditivos que podem ser usados incluem, entre outros, agentes redutores, como 2-mercaptoetanol (2-Me) ou ditiotreitol (DTT), e agentes estabilizantes, como magnésio, piruvato e umectantes. A solução de lise pode ser tamponada a qualquer pH adequado à lise das células desejadas e dependerá de vários fatores, incluindo, entre outros, o tipo da amostra, as células que serão submetidas a lise e o detergente usado. Em algumas concretizações, o pH pode ser na faixa de cerca de 2 a cerca de 13, por exemplo, de cerca de 6 a cerca de 13, por exemplo, de cerca de 8 a cerca de 13, por exemplo, de cerca de 10 a cerca de 13. Tampões de pH adequados incluem qualquer um capaz de manter o pH na faixa desejada, por exemplo, cerca de 0,05 M a cerca de 1,0 M de CAPS.

[055] Em uma concretização, misturamos a amostra e a solução de lise e, em seguida, incubamos a mistura por tempo o suficiente para que ocorra a lise e a solubilização das membranas celulares, por exemplo, em torno de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ou 60 segundos ou em torno de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ou 20 minutos ou mais, por exemplo, de cerca de 1 segundo a cerca de 20 minutos, de cerca de 1 segundo a cerca de 5 minutos ou de cerca de 1 segundo a cerca de 2 minutos. O tempo de incubação dependerá da resistência da solução de lise, por exemplo, da concentração do detergente e/ou das enzimas e da temperatura de lise. Em termos gerais, tampões de lise mais brandos exigem mais tempo e uma maior diluição da amostra para solubilizar por completo as células não-microbianas. A resistência da solução de lise pode ser selecionada com base nos micro-organismos presentes ou de cuja presença na amostra se suspeita. No caso de micro-organismos mais suscetíveis a lise, é possível usar uma solução de lise branda. A lise pode ocorrer a uma temperatura de cerca de 2° C a cerca de 45° C, por exemplo, de cerca de 15° C a cerca de 40° C, por exemplo, de cerca de 30° C a cerca de 40° C. Em uma concretização, é possível introduzir a solução

de lise em uma seringa e, então, aspirar a amostra para dentro da seringa de modo que a mistura e a incubação ocorram dentro dela.

[056] Em algumas concretizações, as condições de lise (por exemplo, a solução ou o tempo de incubação), bem como as etapas de separação e/ou interrogação, podem ser suficientes para exterminar alguns ou todos os micro-organismos da amostra. Os métodos da presente invenção são amplamente versáteis e não exigem que os micro-organismos estejam vivos para que ocorra o isolamento e a identificação. Em certas concretizações, alguns ou todos os micro-organismos podem estar mortos, podendo a morte ocorrer antes, durante e/ou depois das etapas dos métodos sendo realizados.

Etapa de detecção/comparação

[057] Depois que o complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência for separado dos ligantes de afinidade que determinam a resistência livres, é possível detectar e/ou medir a quantidade de ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo ou a afinidade de ligação do ligante. Se o complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência for separado por centrifugação para produzir um precipitado, o precipitado pode ser interrogado para detectar a quantidade ligada ou a afinidade de ligação do ligante de afinidade que determina a resistência. Em uma concretização, a interrogação ocorre de maneira não-invasiva, ou seja, interrogamos o precipitado ainda dentro do recipiente de separação. Em outra concretização, o recipiente de separação permanece fechado durante toda a interrogação. A possibilidade de identificar micro-organismos resistentes a antibióticos de maneira não-invasiva, aliada opcionalmente à manutenção do recipiente fechado durante todo o processo de separação e caracterização e à automação de parte do procedimento, ou dele todo, evita o manuseio constante de amostras contaminadas e/ou contagiosas e aumenta bastante a segurança do processo como um todo. Além disso, a possibilidade de caracterizar os micro-organismos por interrogação direta, sem um novo processamento do precipitado (por

exemplo, ressuspensão, revestimento e cultivo de colônias), aumenta bastante a velocidade com que é realizada a identificação de micro-organismos resistentes a antibióticos.

[058] Em certos aspectos da invenção, os métodos envolvem recuperar o precipitado do complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência formado durante a etapa de separação, ou parte dele, do recipiente de separação antes da interrogação dos micro-organismos. Por exemplo, depois da formação do precipitado, os fluidos podem ser aspirados dele e o precipitado ressuspenso em um meio adequado (por exemplo, um meio viável aos micro-organismos). Os micro-organismos ressuspensos podem ser removidos do recipiente de separação. Os micro-organismos podem, então, ser interrogados para detectar a ligação ou afinidade dos ligantes, por exemplo, na suspensão ou após serem reprecipitados. Em outras concretizações, os micro-organismos ressuspensos podem ser interrogados no recipiente de separação, por exemplo, na suspensão ou após serem reprecipitados. Em outra concretização, o precipitado é recuperado e/ou ressuspenso após uma interrogação *in situ* e, então, realiza-se uma nova interrogação. Por exemplo, técnicas, tal como testes de aglutinação em látex ou testes de identificação fenotípica automatizados, que podem ser aplicadas a micro-organismos isolados, mas não a um precipitado de micro-organismos, podem ser realizadas nos micro-organismos recuperados e/ou ressuspensos. Em outra concretização, os micro-organismos recuperados do precipitado podem ser usados diretamente para novas interrogações (por exemplo, por espectroscopia de massa) sem serem ressuspensos.

[059] Em algumas concretizações, o precipitado e/ou os micro-organismos ressuspensos podem ser interrogados por espectroscopia. A espectroscopia pode ser usada para analisar uma propriedade do ligante de afinidade que determina a resistência (por exemplo, uma propriedade intrínseca ou uma propriedade de uma marcação ligada a ele) a fim de detectar

a ligação. Além de detectar o ligante de afinidade que determina a resistência, a espectroscopia também pode ser usada para analisar uma ou mais propriedades intrínsecas (por exemplo, a fluorescência intrínseca) dos micro-organismos no complexo, por exemplo, uma propriedade presente nos micro-organismos na ausência de agentes adicionais, tal como linhagens, corantes, agentes de ligação etc. A fluorescência intrínseca ou autofluorescência do micro-organismo, especialmente bactérias, intensifica o fato de que as bactérias contêm fluoróforos naturais (por exemplo, triptofano, tirosina, fenilalanina, NADH e flavina) que podem ser estimulados por meio de uma fonte de luz com vários comprimentos de onda. Nessas concretizações, a ligação do ligante de afinidade que determina a resistência pode ser comparada ao sinal de propriedade intrínseca do micro-organismo e a quantidade de ligação do ligante calculada por célula. A interrogação pode ser realizada, por exemplo, por espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de refletância difusa, espectroscopia de absorção e transmissão, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia por *terahertz*, espectroscopia Raman, incluindo espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS), espectroscopia Raman com compensação espacial e/ou espectroscopia Raman de ressonância. Para intensificar os sinais Raman (SERS) e de fluorescência, os micro-organismos podem ser revestidos com nanopartículas de ouro e/ou prata antes da centrifugação, e/ou a superfície óptica interna pode ser pré-revestida com coloides metálicos com tamanho e formato de partículas específicos (Lakowicz, *Anal. Biochem.,* 337: 171, 2005, para fluorescência; Efrima e col., *J. Phys. Chem. B.* (carta), 102: 5.947, 1998, para SERS). Em outra concretização, as nanopartículas se fazem presentes na camada de densidade antes da centrifugação e aderem-se aos micro-organismos à medida que eles a atravessam. Em outras concretizações, os micro-organismos (ressuspensos ou no precipitado) podem ser interrogados usando-se técnicas de espectrometria de massa, tal como espectrometria de massa MALDI-TOF, espectrometria de massa DESI, espectrometria de massa GC, espectrometria

de massa LC e espectrometria com tubo de fluxo com seleção de íons (SIFT). Em uma concretização, o precipitado é interrogado ainda dentro do recipiente de separação. O recipiente pode ser interrogado através de uma janela óptica formada nele. A janela óptica pode ser embaixo, em cima, em uma das laterais ou em ambas as laterais do recipiente. Em uma concretização, o recipiente de separação encaixa-se ou cabe dentro do suporte de um espectrômetro em uma posição adequada à interrogação. A interrogação espectroscópica pode ser realizada por qualquer técnica conhecida pelos versados na técnica eficiente à detecção de uma ou mais propriedades intrínsecas ou extrínsecas dos ligantes de afinidade que determinam a resistência e/ou micro-organismos. Por exemplo, a fim de detectar micro-organismos em precipitados, é possível utilizar a fluorescência em face frontal (na qual a luz de estímulo emitida penetra e sai pela mesma superfície óptica e, se a amostra for substancial e opticamente fina, a luz de estímulo penetra por uma distância bem pequena na amostra (vide, por exemplo, Eisinger, J. e J. Flores, "*Front-face fluorometry of liquid samples*", *Anal. Biochem.*, 94:15, 1983). Outras formas de medição, tal como medições por epifluorescência, refletância, absorbância e/ou dispersão, também podem ser usadas na presente invenção. Em certos aspectos da invenção, além de analisar uma ou mais propriedades intrínsecas do micro-organismo com o intuito de determinar a ligação do ligante por célula, as propriedades intrínsecas podem ser usadas para identificar o micro-organismo. Em uma concretização, as propriedades intrínsecas do micro-organismos são comparadas a um banco de dados com propriedades intrínsecas de micro-organismos conhecidos a fim de identificar o micro-organismo.

[060] Em ainda outra concretização, a determinação da resistência pode ser realizada indiretamente medindo-se mudanças em propriedades medidas (por exemplo, mudanças nas propriedades de fluorescência intrínseca) do micro-organismo de teste e/ou pelo uso de corantes fluorescentes usados para monitorar o metabolismo ou a integridade da membrana. De acordo com esta concretização, o ligante ou agente em si

não precisa emitir um sinal detectável ou ser marcado com um sinal detectável já que a resistência é determinada medindo-se indiretamente mudanças em propriedades mensuráveis (por exemplo, mudanças nas propriedades de fluorescência intrínseca) resultantes da ligação do ligante ou agente ao micro-organismo de teste. Por exemplo, a ligação e/ou exposição de um antibiótico não-marcado pode mudar, alterar ou enfraquecer de alguma outra forma a parede celular do micro-organismo. O micro-organismo pode ser interrogado (por exemplo, por espectroscopia, conforme descrito no presente documento) e as mudanças na parede celular podem ser medidas indiretamente e comparadas a um banco de dados com micro-organismos resistentes e/ou sensíveis a antibióticos conhecidos para determinar o estado de resistência antimicrobiana do micro-organismo. Como alternativa, a parede celular alterada, ou enfraquecida de alguma outra forma, pode ser permeável (ou mais permeável) a um ou mais corantes fluorescentes; portanto, é possível acrescentar um ou mais corantes fluorescentes à amostra e interrogá-la para detectar e/ou medir os corantes fluorescentes a fim de determinar indiretamente o estado de resistência antimicrobiana do micro-organismo (por exemplo, como no exemplo 5).

[061] A fonte de iluminação, ou fonte de estímulo, da amostra pode ser escolhida dentre várias fontes luminosas adequadas conhecidas pelos versados na técnica. Qualquer parte do espectro eletromagnético que produza dados utilizáveis pode ser aproveitada. Fontes luminosas capazes de emissão nos espectros ultravioleta, visível e/ou infravermelho próximo, bem como outras partes do espectro eletromagnético, podem ser usadas e são conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, as fontes luminosas podem ser lâmpadas contínuas, tal como uma lâmpada de arco de xenônio ou deutério, para gerar iluminação ultravioleta, e/ou uma lâmpada de halogênio de tungstênio, para gerar estímulo visível/infravermelho próximo. Essas fontes luminosas proporcionam uma faixa de emissão ampla, e a largura de banda espectral para comprimentos de onda de estímulos

específicos pode ser reduzida usando-se filtros de interferência óptica, prismas e/ou grades ópticas, conforme bem conhecido na técnica.

[062] Como alternativa, várias fontes luminosas de banda estreita, tal como diodos emissores de luz e/ou *lasers*, podem ser espacialmente multiplexadas para proporcionar uma fonte de estímulo com vários comprimentos de onda. Por exemplo, os diodos emissores de luz são disponibilizados de 190 nm a no máximo 900 nm e as fontes têm uma largura de banda espectral de 20 a 40 nm (largura total na metade máxima). Os *lasers* são disponibilizados em comprimentos de onda discretos do ultravioleta ao infravermelho próximo e podem ser empregados por métodos de multiplexação bem conhecidos pelos versados na técnica.

[063] A seletividade espectral de qualquer uma das fontes luminosas pode ser aprimorada usando-se meios de discriminação espectral, tal como um monocromador de varredura. É possível usar outros métodos de discriminação conhecidos pelos versados na técnica, tal como um filtro opticoacústico sintonizável, um filtro sintonizável de cristal líquido, um conjunto de filtros de interferência óptica, espectrógrafos prismáticos etc. em qualquer combinação. Uma consideração a se levar em conta na hora de escolher o discriminador espectral refere-se à faixa de sintonização, bem como o nível de seletividade. A título ilustrativo, por exemplo, um discriminador pode utilizar a faixa de comprimentos de onda de 300 a 800 nm com uma seletividade de 10 nm. Esses parâmetros geralmente determinam a tecnologia ideal necessária para se chegar à faixa de sintonização, bem como à seletividade.

[064] Normalmente, a fonte luminosa resulta no estímulo da amostra, seguido pela medição da emissão de fluorescência da amostra em momentos predeterminados ou continuamente. De maneira semelhante, é possível medir a luz refletida pela interação da fonte de estímulo com a amostra para prover dados pertinentes à detecção e/ou caracterização.

[065] A emissão da amostra pode ser medida por

qualquer meio de discriminação espectral adequado e, em algumas concretizações, usando-se um espectrômetro. O espectrômetro pode ser um monocromador de varredura que detecta comprimentos de onda de emissão específicos, em que a saída do monocromador é detectada por um tubo fotomultiplicador, e/ou o espectrômetro pode ser configurado como um espectrógrafo de geração de imagens, em que a saída é detectada por um conjunto detector com geração de imagens, tal como uma conjunto detector de dispositivos de carga acoplada (CCD). Em uma concretização, um discriminador permite a observação da fluorescência e/ou a difusão de sinais por um meio de fotodetecção (tal como um tubo fotomultiplicador, fotodiodo de avalanche, conjunto detector CCD e/ou conjunto detector de dispositivos de carga acoplada com multiplicação de elétrons (EMCCD).

[066] A técnica espectroscópica é usada para produzir medidas que são, de preferência, proporcionadas como medidas de Matriz Estímulo-Emissão (EEM). Conforme usado no presente documento, EEM significa a intensidade de emissão espectral luminescente de substâncias fluorescentes em função dos comprimentos de onda de estímulo e emissão e inclui um espectro completo, ou subconjunto dele, em que um subconjunto pode conter um único ou vários pares de estímulo/emissão. Além disso, uma seção transversal da EEM com um comprimento de onda de estímulo fixo pode ser usada para apresentar os espectros de emissão de um dado comprimento de estímulo, e uma seção transversal da EEM com um comprimento de onda de emissão fixo pode ser usada para apresentar os espectros de estímulo de uma amostra. Em uma concretização, várias EEMs são medidas em mais de um par de comprimentos de onda de estímulo-emissão específicos, por exemplo, ao menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais pares de comprimentos de onda de estímulo-emissão específicos. Por exemplo, uma ou mais EEMs podem ser tiradas a comprimentos de onda que detectem o ligante de afinidade que determina a resistência, ao passo que uma ou mais EEMs adicionais são tiradas a comprimentos de onda que detectem propriedades intrínsecas do

micro-organismo, tal como pontos de dispersão de Rayleigh (260 a 580 nm), triptofano (285/350 nm), colágeno (305/315 a 330 nm), NADH (345/460 nm) e flavina (460/520 nm).

[067] De acordo com uma concretização da invenção, descobrimos que a espectroscopia de fluorescência em face frontal é vantajosa para medir propriedades de fluorescência e/ou refletância em amostras altamente dispersantes e altamente inibidoras. O método em face frontal é um método espectroscópico particularmente útil, pois é menos afetado pelos componentes de interferência em meios de cultura sanguínea e microbiológica. A superfície óptica do recipiente pode ser iluminada a um ângulo que produza resultados aceitáveis, como de conhecimento dos versados na técnica (por exemplo, Eisinger, J. e J. Flores, "*Front-face fluorometry of liquid samples*", *Anal. Biochem.*, 94:15 a 21, 1983). Em uma concretização, o sistema é projetado de modo que o sistema espectroscópico meça a luz refletida difusa, no mínimo, a um ângulo fixo em aditamento à medição da fluorescência emitida, no mínimo, a um ângulo fixo.

[068] De acordo com a presente invenção, tiramos medidas de controle de micro-organismos conhecidos (sensíveis e/ou resistentes a antibióticos), permitindo assim a correlação dos dados de teste medidos na caracterização dos micro-organismos de interesse por meio de vários métodos matemáticos conhecidos pelos versados na técnica. Por exemplo, é possível comparar os dados das amostras a parâmetros ou medidas de controle usando-se sistemas de *software* conhecidos pelos versados na técnica. Mais especificamente, os dados podem ser analisados por vários métodos de análise multivariada, tal como, por exemplo, Análise Discriminante Generalizada (GDA), Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLSDA), Regressão por Mínimos Quadrados Parciais, Análise dos Componentes Principais (PCA), Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC), Análise de Rede Neural (NNA) e/ou Máquina de Vetores de Suporte (SVM). Em uma concretização, a etapa de comparação compreende

comparar a quantidade de ligação ou a afinidade de ligação do ligante de afinidade que determina a resistência a uma linhagem sensível ou resistente a antibióticos do mesmo micro-organismo. Em outra concretização, a etapa de comparação compreende comparar a quantidade de ligação ou a afinidade de ligação do ligante de afinidade que determina a resistência tanto a uma linhagem sensível quanto a uma linhagem resistente a antibióticos do mesmo micro-organismo. Em uma concretização, a quantidade de ligação ou a afinidade de ligação a uma linhagem sensível ou resistente a antibióticos conhecida do mesmo micro-organismo são determinadas ao mesmo tempo em que a quantidade se liga ao micro-organismo. Em outra concretização, a quantidade de ligação ou a afinidade de ligação a uma linhagem sensível ou resistente a antibióticos conhecida do mesmo organismo já foram determinadas. Os dados previamente determinados podem se fazer presentes, por exemplo, em um banco de dados.

[069] Além de medir a resistência antibiótica intrínseca de um micro-organismo e, como opção, uma ou mais propriedades intrínsecas de um micro-organismo (tal como a fluorescência intrínseca), os métodos da presente invenção podem compreender ainda o uso de outros agentes identificadores para ajudar no processo de separação e/ou caracterização. Agentes que se ligam a micro-organismos específicos, tal como ligantes de afinidade, podem ser usados para separar micro-organismos a fim de identificar uma classe ou espécie de micro-organismos (por exemplo, pela ligação a uma proteína ou receptor de superfície específico) e/ou a fim de identificar uma característica dos micro-organismos. Agentes identificadores ou ligantes de afinidade que podem ser usados incluem, entre outros, anticorpos monoclonais e policlonais e seus fragmentos (por exemplo, anti-Eap para a identificação do *S. aureus*), sondas de ácido nucleico, apatâmeros, peptídeos miméticos, proteínas de ligação derivadas de fagos, lectinas, peptídeos de defesa do hospedeiro (por exemplo, defensinas, catelicidinas, proteogrinas, magaininas), bacteriocinas (por exemplo, antibióticos, tal como nisina, mersacidina,

epidermina, galidermina e plantaricina C, e peptídeos de classe II), bacteriófagos e corantes seletivos para ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos, polissacarídeos ou proteínas ou qualquer combinação desses. Se o agente não emitir um sinal detectável por si só, ele pode ser marcado para tanto, tal como conjugando-o a um marcador (por exemplo, visível ou fluorescente). Marcadores incluem, entre outros, compostos fluorescentes, luminescentes, fosforescentes, radioativos, Raman-ativos, reativos à espectrometria de massa e/ou colorimétricos. O agente pode ser acrescentado aos micro-organismos em qualquer etapa dos métodos da invenção, por exemplo, quando da obtenção da amostra, durante a etapa de contato, durante a etapa de separação e/ou durante a etapa de detecção. Em algumas concretizações, é possível determinar a presença do agente no precipitado durante sua interrogação. Outros agentes identificadores que podem ser usados incluem substratos para enzimas microbianas, agentes quelantes, agentes fotossensíveis, agentes inibidores, agentes redutores, agentes oxidantes, tampões, ácidos, bases, solventes, fixadores, detergentes, surfactantes, desinfetantes (por exemplo, alcoóis, água sanitária, peróxido de hidrogênio), compostos tóxicos (por exemplo, azida de sódio, cianeto de potássio), inibidores metabólicos, tal como a ciclohexamida, etc. De maneira semelhante, é possível utilizar diversos compostos fluorescentes para medir a viabilidade celular microbiana, o metabolismo e/ou o potencial da membrana como agentes identificadores na presente invenção. Conforme os versados na técnica perceberão prontamente, a sensibilidade de um micro-organismo específico a qualquer composto que afete seu estado físico ou seu metabolismo, tal como um antibiótico, pode ser determinada com rapidez acrescentando-se o composto à amostra, ao tampão de lise, à camada de densidade ou a qualquer mistura desses.

[070] Em um aspecto da presente invenção, o método pode compreender ainda uma etapa de recuperar o precipitado do complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência e realizar testes adicionais. Em uma concretização, o precipitado pode ser recuperado

aspirando-se o meio da amostra e/ou mistura ou composição de ligação e a camada de densidade. Em outra concretização, o precipitado pode ser recuperado inserindo-se uma seringa no recipiente e aspirando-o, ao passo que o meio da amostra e/ou mistura ou composição de ligação e a camada de densidade permanecem intactos. O precipitado recuperado pode, então, ser ressuspenso em um meio adequado, por exemplo, em uma solução salina. Uma vez ressuspensos, os micro-organismos podem ser submetidos a qualquer teste adicional desejado conhecido pelos versados na técnica ou conforme descrito acima. Em particular, qualquer teste que exija amostras de micro-organismos limpas pode ser realizado nos micro-organismos ressupensos. Em algumas concretizações, é possível realizar novos testes de identificação. Exemplos de testes de identificação incluem o Vitek® 2, testes de ácido nucléico (NAT) amplificado e não-amplificado, ensaios de aglutinação em látex e cromogênicos, imunoensaios (por exemplo, usando-se anticorpos marcados e/ou outros ligantes), espectrometria de massa (por exemplo, espectrometria de massa MALDI-TOF) e/ou outras técnicas ópticas como espectroscopia de infravermelho (FTIR) ou espectroscopia Raman. Também é possível realizar testes de caracterização adicionais, tal como resistência a fármacos. A nova caracterização pode fazer parte de um teste que teve início durante as etapas iniciais de separação e caracterização do método.

[071] Em um aspecto da invenção, algumas ou todas as etapas do método podem ser automatizadas. Conforme usado no presente documento, o termo “automatizado” significa controlado por computador. Em uma concretização, as várias etapas de emissão de fluorescência, detecção e correlação são automatizadas, e as informações resultantes obtidas com os métodos são usadas automaticamente para preencher o banco de dados. Em outras concretizações, outras etapas do método, tal como contato, separação e/ou detecção também podem ser automatizadas. A automatização das etapas do método não só permite testar mais amostras com mais rapidez, mas também diminui os riscos de falha humana no manuseio das amostras, que

podem conter micro-organismos nocivos e/ou contagiosos.

[072] Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a um sistema para identificar um micro-organismo resistente a antibióticos, o sistema sendo caracterizado por compreender:

(a) um recipiente com um micro-organismo, ou uma amostra que o contenha, e um ligante de afinidade que determina a resistência;

(b) uma camada de densidade; e

(c) um espectrômetro para produzir medidas;

em que as referidas medidas identificam o referido micro-organismo resistente a antibióticos que se concentrou no referido recipiente por meio de uma separação *in situ* dentro do referido sistema. Em outra concretização, o sistema compreende uma centrífuga para separar o micro-organismo de ligantes de afinidade que determinam a resistência livres.

[073] Descreveremos a presente invenção em mais detalhes nos exemplos a seguir, apresentados a título exemplificativo e sem o intuito de limitar a invenção de forma alguma. Técnicas padrão de conhecimento geral no campo ou técnicas especificamente descritas abaixo são adotadas.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 – Ligação de BOCILLIN™-FL a linhagens de MRSA e MSSA

[074] Duas abordagens experimentais foram usadas para testar a ligação da BOCILLIN™-FL (Molecular Probes, Invitrogen) a linhagens de *S. aureus*: (1) tratamento das células com hidróxido de sódio (NaOH), neutralização, adição de BOCILLIN™-FL e, então, separação das células (pré-tratamento severo); e (2) cultivo de células com BOCILLIN™-FL e, então, separação das células (marcação metabólica).

[075] No primeiro método, cultivamos linhagens de *S. aureus* ATCC 25923 (sensível à meticilina, MSSA) e D14906 (resistente à meticilina, MRSA) até o crescimento exponencial (6 horas) em caldo de tríptico

de soja (TSB). Submetemos amostras de cada suspensão (0,9 ml em TSB) e 0,1 N de NaOH (0,1 ml; ± µl de TRITON® X100-R a 7,5%) a vórtice por 5 segundos e, então, neutralizamos imediatamente ou após 1 minuto acrescentando 1 M de KH_2PO_4 (0,125 ml) e submetemos a vórtice por 5 segundos. Acrescentamos BOCILLIN™-FL (15 µl de 1,0 mg/ml) à suspensão, que, então, submetemos a vórtice e incubamos por 5 minutos à temperatura ambiente. Removemos a BOCILLIN™-FL livre centrifugando a mistura em 0,2 ml de uma mistura de óleo otimizada para separar micro-organismos de meios de cultura (1,0 parte de óleo de imersão para microscopia Type DF + 0,875 partes de óleo mineral Drakeol 5) a 10.000 rpm por 1 minuto. Removemos o sobrenadante e a camada de óleo e ressuspendemos o precipitado em 3,0 ml de PBS a um pH de 7,4. As amostras foram lidas pelo sistema FluoroLog-3 a um comprimento de onda de estímulo de 490 nm, registrando-se a emissão de fluorescência a 510 nm.

[076] A tabela 1 apresenta os resultados. O tratamento das células a um pH de 12 por 5 segundos resultou na maior ligação da BOCILLIN™-FL a células das linhagens MSSA do que a células das linhagens MRSA (condição a = razão de 2,3). A inclusão de Triton X-100 na mistura de reação não trouxe benefícios. O prolongamento do tratamento das células a um pH de 12 para 60 segundos não trouxe benefícios e levou à perda de células.

TABELA 1

Condições	MSSA (25923)	MRSA (D14906)	Razão de MSSA/MRSA
a = 5" a um pH de 12	$3,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	2,3
b = 60" a um pH de 12	$1,0 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$	1,1
c = 5" a um pH de 12 + TX100	$0,9 \times 10^6$	$0,6 \times 10^6$	1,5
d = 60" a um pH de 12 + TX100	$0,8 \times 10^6$	$0,4 \times 10^6$	2,0

[077] No segundo método, misturamos as duas suspensões bacterianas (13 ml) a BOCILLIN™-FL (175 µl de 1,0 mg/ml de

material). Dividimos as misturas em amostras de 1,0 ml dentro de tubos de microcentrífuga contendo 0,2 ml de mistura de óleo. Incubamos os tubos a 37° C em vários pontos no tempo (mantendo 1 conjunto de tubos em gelo no ponto no tempo T_0). Removemos um conjunto de tubos aos 30 minutos e separamos as células da BOCILLIN™-FL livre lavando-as duas vezes com PBS. Removemos um conjunto de tubos aos 30, 52, 58 e 86 minutos e separamos as células da BOCILLIN™-FL livre centrifugando-as com a mistura de óleo. Recuperamos as células e as ressuspendemo em 3 ml de PBS. As amostras foram lidas pelo sistema FluoroLog-3 a um comprimento de onda de estímulo de 490 nm, registrando-se a emissão de fluorescência a 510 nm.

[078] Os resultados são apresentados na tabela 2 (dados brutos) e na Figura 1 (dados normalizados). As linhagens de MRSA ligaram-se de 2 a 7 vezes menos à BOCILLIN™-FL do que as linhagens de MSSA (tabela 2) ou de 3 a 4 vezes menos quando estimado por célula normalizando-se o sinal da BOCILLIN™-FL ao sinal de triptofano microbiano (Figura 1). A maior diferença entre as linhagens de MRSA e MSSA ocorreu após cerca de 60 minutos de cultivo a 37° C. A centrifugação de bactérias pela mistura de óleo proporcionou maiores níveis de ligação da BOCILLIN™-FL do que lavando-se duas vezes com PBS, embora sinais de plano de fundo mais altos tenham sido observados (a T_0) com o método de separação à base de óleo.

TABELA 2

Condição do ensaio	Método de separação	MSSA (25923)	MRSA (D14906)	Razão de MSSA/MRSA
T_0 (gelo)	Óleo	2.745.600	1.163.240	2,36
30' a 37° C	Lavagem dupla (PBS)	410.830	206.250	2,00
30' a 37° C	Óleo	1.831.790	326.790	5,60
52' a 37° C	Óleo	1.941.930	363.000	5,35
68' a 37° C	Óleo	2.481.450	346.270	7,17
86' a 37° C	Óleo	2.285.980	510.150	4,48

EXEMPLO 2 – Experimento de lapso de tempo

[079] Cultivamos amostras de linhagens de *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) e D14906 (MRSA) em meios de cultura BacT/ALERT SA a 37° C até chegar ao crescimento exponencial (de 8 a 10 horas). Medimos a OD a 660 nm de cada cultura e ajustamos as suspensões de caldo em 0,50 com meios SA pré-aquecidos. Diluímos a BOCILLIN™-FL nos meios SA pré-aquecidos, filtramos usando um filtro de 0,2 µm e mantivemos à temperatura de 37 °C. Amostras das bactérias (9,0 ml) foram misturadas a 1,0 ml de 100 µM de BOCILLIN™-FL, misturadas bem e dispensadas em dez alíquotas de 1,0 ml dentro de tubos de microcentrífuga contendo 0,2 ml da mesma mistura de óleo usada no exemplo 1. Levamos todos os tubos, menos o tubo T_0, à temperatura de 37° C. Removemos os tubos e processamos a 6, 11, 16, 22, 45, 60, 75 e 91 minutos. Centrifugamos cada tubo por 1 minuto, aspiramos o sobrenadante e ressuspendemos o precipitado em 0,1 ml de PBS para, então, acrescentá-lo a 3,0 ml de PBS em um cadinho de acrílico. As amostras foram lidas pelo sistema FluoroLog-3 a um comprimento de onda de estímulo de 490 nm, registrando-se a emissão de fluorescência a 510 nm.

[080] A ligação da BOCILLIN™-FL a linhagens de *S. aureus*, conforme avaliada pelo método em óleo, ocorreu com rapidez (Figura 2). Os dados foram representados usando-se um ajuste de curva polinomial de segunda ordem. A ligação máxima foi medida após apenas 5 min à temperatura ambiente (isto é, o tubo T_0). A esta concentração de BOCILLIN™-FL, as linhagens de MSSA ligaram-se a cerca de 2 a 3 vezes mais BOCILLIN™-FL por célula do que as linhagens de MRSA, independentemente do tempo de cultura.

EXEMPLO 3 – Titulação de BOCILLIN™-FL

[081] Cultivamos amostras de linhagens de *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) e D14906 (MRSA) em meios de cultura BacT/ALERT SA a 37° C por cerca de 6 horas até chegar a uma OD a 660 nm de cerca de 0,35. Preparamos diluições de BOCILLIN™-FL (0,1 ml) em meios SA e as inserimos em tubos de cultura. Acrescentamos amostras da suspensão bacteriana (0,9

ml) aos tubos e misturamos. Fechamos os tubos e os levamos a uma incubadora a 37° C por 60 minutos. Transferimos amostras (1,0 ml) para tubos de microcentrífuga contendo 0,2 ml da mesma mistura de óleo usada no exemplo 1, centrifugamos por 1 minuto, aspiramos e ressuspendemos o precipitado em 0,1 ml de PBS para, então, acrescentá-lo a 3,0 ml de PBS a um pH de 7,4 em um cadinho de acrílico. As amostras foram lidas pelo sistema FluoroLog-3 a um comprimento de onda de estímulo de 490 nm, registrando-se a emissão de fluorescência a 510 nm.

[082] As linhagens de MSSA ligaram-se a 2 a 4 vezes mais BOCILLIN™-FL por célula do que as linhagens de MRSA, dependendo da concentração de BOCILLIN™-FL (Figura 3). Os dados foram representados usando-se um ajuste de curva polinomial de segunda ordem. A curva de ligação de MSSA foi bifásica. Houve uma curva saturável inicial de 0,5 a cerca de 10 µM, seguida por uma segunda fase com maior ligação. A cerca de 5 µM de BOCILLIN™-FL, houve uma diferença de 3 vezes entre as linhagens de MSSA e MRSA. A cerca de 0,5 µM de BOCILLIN™-FL, houve uma diferença de 4 vezes entre as linhagens de MSSA e MRSA.

EXEMPLO 4 – Avaliação de um grupo de linhagens de MRSA e MSSA

[083] Propagamos 20 linhagens diferentes de *S. aureus* (10 linhagens de MRSA e 10 de MSSA, confirmadas por discos de cefoxitina e Vitek-2). Removemos uma alçada de crescimento (1 µl) de placas de 24 horas e suspendemos em meios de cultura BacT/ALERT SA (8 ml em tubos de vidro fechados com tampas roscadas). Submetemos os tubos a vórtice bem e incubamos a 36° C por 6 horas. Medimos a OD de cada suspensão a 660 nm e ajustamos mais ou menos na mesma densidade (0,50 a 0,75 OD; na amostra #12166 somente 0,28). Inserimos 50 µM de BOCILLIN™-FL (0,1 ml) em cada um de 20 tubos de microcentrífuga marcados. Acrescentamos uma amostra de cada linhagem (0,9 ml) a cada tubo, misturamos e incubamos a 37° C por 30 minutos. Em seguida, removemos a mistura de reação e acrescentamos a um

segundo conjunto de tubos contendo 0,2 ml de uma mistura de óleo (1,000 parte de óleo de imersão Type DF mais 0,875 partes de óleo mineral Drakeol 5). Centrifugamos os tubos por 2 minutos a 10.000 rpm em um rotor A-8-11 (Eppendorf 5417R). Aspiramos o sobrenadante e a maior parte do óleo com um dispositivo a vácuo. Removemos o óleo restante usando uma ponta Gilson P200 e ressuspendemos o precipitado em 100 µl de PBS. As células foram transferidas a um cadinho de acrílico contendo 3 ml de PBS e lidas no sistema FluoroLog 3 usando o FluoroScan com os pontos em "Bocillin" listados na tabela 3. Além disso, cartões Vitek AST foram aplicados a cada um dos 20 isolados (a partir das mesmas placas de 24 horas).

TABELA 3

Pontos de Rayleigh	260 a 580
Pico de triptofano	285/350
MRSA/MRSE	305/315 a 330
Colágeno	320/405
NADH	345/460
Flavina	460/520
BOCILLIN™-FL	490/510

[084] Obtivemos resultados ideais quando o sinal de BOCILLIN™-FL (Ex490_Em510) foi normalizado ao sinal de triptofano (Ex285_Em350). As 5 linhagens sensíveis à benzil-penicilina ligaram-se a mais que o dobro da quantidade de BOCILLIN™-FL do que as 15 linhagens resistentes à benzil-penicilina (Figura 4). Esse resultado demonstra que o ensaio é específico e condiz com as MIC de Vitek observadas. Cinco das 10 linhagens sensíveis à oxacilina (MSSA) ligaram-se a maiores quantidades de BOCILLIN™-FL para uma sensibilidade de MRSA de 50% e uma especificidade de 100%. Essas 5 linhagens foram classificadas como resistentes à benzil-penicilina e sensíveis à oxacilina por cartões Vitek e 3,5 linhagens tiveram uma MIC de oxacilina de 0,5.

[085] O supramencionado serve apenas para ilustrar a presente invenção e não para limitá-la. A invenção é definida pelas reivindicações a seguir, incluindo seus equivalentes. Todas as publicações,

pedidos de patente, patentes, publicações de patente e qualquer outra referência citada no presente documento incorporam-se por referência na íntegra aos ensinamentos relevantes à oração e/ou parágrafo em que a referência for apresentada.

EXEMPLO 5 – Determinação do estado de resistência de um micro-organismo indiretamente por meio de mudanças na fluorescência intrínseca e/ou na integridade da membrana

[086] Selecionamos quatro linhagens de *E. faecium* para este estudo. Duas foram VRE com MIC de vancomicina superior a 32 µg/ml de acordo com o VITEK 2 (#12406, #13185) e duas foram VSE com MIC de vancomicina superior a 0,5 µg/ml de acordo com o VITEK 2 (#14054, #12480).

[087] Para cada linhagem de teste, suspendemos uma alçada de colônias de 1µl oriunda de uma placa de 24 a 48 horas em meios BacT/ALERT SA de 10 a 12 ml e cultivamos por 4 a 9 horas a 37° C. Em seguida, incubamos amostras de cada cultura na fase exponencial com 0, 0,25, 2,5 e 12,5 µg/ml de vancomicina-HCl junto com uma diluição de 1:5000 de linhagem Sytox Green, uma linhagem de DNA impermeável a células viável (Molecular Probes, cat. # S7020) por um período de 4 horas a 37° C. Recolhemos alíquotas das culturas para análise imediata (T_0) e após 1, 2,5 e 4 horas.

[088] No ponto no tempo adequado, dispomos 0,5 alíquota das culturas (0,5 ml) sobre uma camada de densidade composta por 24% em p/v de CsCl em 10 mM de Hepes a um pH de 7,4 e 0,005% de Pluronic F-108 contido em tubos de centrifugação óptica feitos sob medida conforme revela o pedido de patente dos Estados Unidos relacionado de nº de série 12/589.969, intitulado "*Separation Device for Use in the Separation, Characterization and/or Identification of Microorganisms*", depositado no dia 30 de outubro de 2009. Fechamos e centrifugamos os tubos a 10,000 rpm por 2 minutos para separar micro-organismos intactos do meio de cultura e produtos

químicos livres. Em seguida, dispomos os tubos em um suporte para tubos feito sob medida diretamente sobre uma sonda de fibra óptica construída na base. A sonda foi ligada a um espectrofluorímetro FluoroLog 3. Interrogamos o tubo através de sua base transparente a UV e registramos as leituras de refletância difusa e fluorescência.

[089] Os resultados da fluorescência microbiana de NADH (Ex340 nm/Em 440 nm) são dados na tabela 4. A quantidades de vancomicina inibitórias às duas linhagens de VSE (2,5 e 12,5 µg/ml), as quantidades de NADH celular caíram gradualmente com o tempo. Em contrapartida, as quantidades de NADH nas duas linhagens de VRE tratadas com as mesmas quantidades de vancomicina cresceram após cerca de 1 hora em cultura e continuaram a crescer ao longo do período de cultura de 4 horas. Uma linhagem de VRE (#12406) teve um maior retardo na produção de NADH, o que coincide com o influxo de Sytox Green ao longo deste período.

[090] Os resultados da fluorescência microbiana de triptofano (Ex300 nm/Em 360 nm) são dados na tabela 5. A quantidades de vancomicina inibitórias às duas linhagens de VSE (2,5 e 12,5 µg/ml), as quantidades de triptofano celular permaneceram estáveis com o tempo. Em contrapartida, as quantidades de triptofano nas duas linhagens VRE tratadas com as mesmas quantidades de vancomicina aumentaram lentamente ao longo do período de cultura de 4 horas.

[091] Os resultados para a Sytox Green (Ex510 nm/Em530 nm) são dados na tabela 6 e expressos como a razão de Sytox Green para fluorescência de NADH a fim de compensar a biomassa celular viável. Os dados demonstram que uma das duas linhagens de VRE (#14206) foi afetada pela vancomicina durante as primeiras 2 horas de cultura e, então, começou a se recuperar. Essa descoberta indica que esta linhagem precisou de algumas horas de co-cultura com a vancomicina para que o fenótipo resistente dominasse esta população em específico. Este comportamento indica que esta linhagem provavelmente possui resistência induzível, a qual foi

detectada pelo método.

[092] Este experimento demonstrou que, medindo-se mudanças na fluorescência intrínseca de células microbianas co-cultivadas com antibiótico, é possível determinar com rapidez se determinado micro-organismo é resistente ao antibiótico em questão. Além disso, a adição de corantes fluorescentes para monitorar a integridade das membranas celulares na população microbiana por meio de testes fornece informações de valor sobre a viabilidade e a indução de resistência de uma população microbiana.

TABELA 4: MUDANÇAS TEMPORAIS NO NADH MICROBIANO EM LINHAGENS SENSÍVEIS E RESISTENTES À VANCOMICINA

Nº da linhagem	Vanc. (µg/ml)	Tempo zero	1 hora	2,5 horas	4 horas
12406 (VRE)	0	176.514	514.368	690.324	588.224
12406 (VRE)	0,25	207.307	616.448	703.451	598.853
12406 (VRE)	2,5	440.416	253.323	573.926	931.786
12406 (VRE)	12,5	172.372	207.520	279.170	765.401
14054 (VSE)	0	385.933	323.090	710.289	479.486
14054 (VSE)	0,25	449.599	298.998	733.656	534.989
14054 (VSE)	2,5	290.986	195.152	349.287	96.954
14054 (VSE)	12,5	248.332	188.273	128.491	109.080
13185 (VRE)	0	345.051	516.677	564.287	624.663
13185 (VRE)	0,25	316.618	708.442	496.545	627.392
13185 (VRE)	2,5	256.533	237.463	965.305	782.908
13185 (VRE)	12,5	234.554	226.769	775.629	710.100
12480 (VSE)	0	201.074	487.559	477.522	500.649
12480 (VSE)	0,25	184.649	271.470	500.618	483.445

Nº da linhagem	Vanc. (µg/ml)	Tempo zero	1 hora	2,5 horas	4 horas
12480 (VSE)	2,5	221.692	254.828	149.686	100.931
12480 (VSE)	12,5	178.982	210.963	171.994	127.042

TABELA 5: MUDANÇAS TEMPORAIS NO TRIPTOFANO MICROBIANO EM LINHAGENS SENSÍVEIS E RESISTENTES À VANCOMICINA

Nº da linhagem	Vanc. (µg/ml)	Tempo zero	1 hora	2,5 horas	4 horas
12406 (VRE)	0	451.075	661.339	761.500	869.806
12406 (VRE)	0,25	463.942	666.793	679.880	800.658
12406 (VRE)	2,5	425.860	560.948	656.768	651.886
12406 (VRE)	12,5	463.985	433.269	560.607	738.461
14054 (VSE)	0	395.244	583.435	673.219	826.840
14054 (VSE)	0,25	387.455	601.874	670.217	808.566
14054 (VSE)	2,5	369.386	431.754	437.349	428.796
14054 (VSE)	12,5	384.046	421.876	387.066	403.029
13185 (VRE)	0	535.014	565.301	852.060	923.848
13185 (VRE)	0,25	546.862	557.453	809.317	880.899
13185 (VRE)	2,5	531.239	569.043	489.661	868.768
13185 (VRE)	12,5	537.160	579.537	537.067	782.106
12480 (VSE)	0	405.128	497.676	662.021	745.217
12480 (VSE)	0,25	425.539	460.266	678.352	706.797
12480 (VSE)	2,5	361.962	438.541	466.525	416.780
12480 (VSE)	12,5	389.264	428.402	455.446	438.978

TABELA 6: MUDANÇAS TEMPORAIS NO INFLUXO DE SYTOX GREEN EM LINHAGENS SENSÍVEIS E RESISTENTES À VANCOMICINA

Nº da linhagem	Vanc. (µg/ml)	Tempo zero	1 hora	2,5 horas	4 horas
12406 (VRE)	0	0,4	0,7	0,4	0,5
12406 (VRE)	0,25	0,3	0,6	0,4	0,5
12406 (VRE)	2,5	0,2	17,7	4,5	1,2
12406 (VRE)	12,5	0,4	19,8	14,6	1,9
14054 (VSE)	0	0,6	1,2	0,6	1,0
14054 (VSE)	0,25	0,4	1,4	0,6	0,8
14054 (VSE)	2,5	0,7	30,1	17,6	43,4
14054 (VSE)	12,5	0,9	14,1	39,1	35,4
13185 (VRE)	0	0,2	0,4	0,3	0,3
13185 (VRE)	0,25	0,3	0,3	0,3	0,2
13185 (VRE)	2,5	0,3	1,8	0,4	0,3
13185 (VRE)	12,5	0,4	1,4	0,5	0,3
12480 (VSE)	0	0,2	0,5	0,7	0,5
12480 (VSE)	0,25	0,3	1,0	0,6	0,6
12480 (VSE)	2,5	0,2	6,7	20,	20,8
12480 (VSE)	12,5	0,2	1,5	7,8	8,7

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar o estado de resistência a antibióticos de um micro-organismo intacto, **caracterizado** por compreender:

(a) colocar o micro-organismo intacto em contato com um ligante de afinidade que determina a resistência em condições nas quais se forme um complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência;

(b) dispor o referido complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência sobre uma camada de densidade em um recipiente e centrifugar o referido recipiente para separar o referido complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência formado em (a) de ligantes de afinidade que determinam a resistência livres;

(c) determinar a quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo intacto no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência; e

(d) comparar a quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo intacto no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência à quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada a uma linhagem sensível ou resistente a antibióticos do mesmo organismo ou de uma população de linhagens sensíveis ou resistentes a antibióticos conhecidas;

em que, se o micro-organismo intacto no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência se ligar a uma quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência diferente da quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo sensível a antibióticos ou se o micro-organismo intacto no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência se ligar à mesma quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ao micro-organismo resistente a antibióticos, o micro-organismo intacto é identificado como resistente a antibióticos, em que o referido método é

realizado em menos de cerca de 240 minutos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por uma ou mais das etapas (a), (b), (c) ou (d) serem realizadas dentro de um recipiente fechado.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo ligante de afinidade que determina a resistência ser selecionado dentre o grupo composto por antibióticos, anticorpos monoclonais e policlonais e fragmentos deles, sondas de ácido nucleico, substratos enzimáticos, aptâmeros, peptídeos miméticos, proteínas de ligação derivadas de fagos, lectinas, peptídeos de defesa do hospedeiro, bacteriocinas, bacterófagos, corantes seletivos para ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos, polissacarídeos, proteínas e combinações desses.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo o ligante de afinidade que determina a resistência compreender uma marcação detectável e a marcação detectável é um marcador de composto fluorescente, luminescente, fosforescente, radioativo, Raman-ativo, reativo à espectrometria de massa e/ou colorimétrico.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo pela amostra que contém o microorganismo intacto ser tratada para seletivamente submeter a lise qualquer célula não-microbiana que se faça presente na amostra antes da etapa de separação (b) e a referida camada de densidade compreende um ou mais óleo de imersão para microscopia, óleo mineral, óleo de silicone, óleo de fluorossilicone, gel de silicone, sílica coloidal, agentes de contraste iodados, sacarose, metrizoato-Ficoll®, diatrizoato-dextrano, carboximetil-celulose, hidroxipropilmetil-celulose, óxido de polietileno (peso molecular elevado), Pluronic® F127, Pluronic® F68, ácido poliacrílico, álcool polivinílico reticulado, pirrolidina polivinílica reticulada, metil-éter-metacrilato de PEG, pectina, agarose, xantano, gelano, Phytagel®, sorbitol, Ficoll®, glicerol, dextrano, glicogênio, cloreto de césio, fluidos de perfluorocarbono e/ou fluido de hidrofluorocarbono em qualquer combinação.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo referido recipiente possuir uma janela óptica no fundo, no topo e/ou em uma ou mais de suas laterais e a referida janela óptica é transparente a ao menos parte do espectro de luz infravermelha próxima, visível e/ou ultravioleta.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela referida etapa de determinação (c) envolver a espectroscopia e a espectroscopia é selecionada dentre o grupo composto por espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de refletância difusa, espectroscopia de absorção e transmissão, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia por *terahertz*, espectroscopia Raman, espectroscopia Raman intensificada pela superfície, espectroscopia Raman com compensação espacial, espectroscopia Raman de ressonância e qualquer combinações dessas.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pela referida espectroscopia ser a espectroscopia de fluorescência em face frontal.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pela referida espectroscopia compreender determinar uma matriz estímulo-emissão (EEM)., sendo que referida EEM compreende ao menos dois comprimentos de onda diferentes e a referida EEM é comparada a um banco de dados de EEMs de micro-organismos conhecidos.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada ser determinada por célula comparando-se a quantidade ligada a uma propriedade intrínseca do micro-organismo intacto e opcionalmente a propriedade intrínseca é a fluorescência intrínseca.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela etapa (c) compreender a etapa de recuperar o micro-organismo para produzir um micro-organismo recuperado.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela etapa (d) compreender comparar a quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada à quantidade do ligante de afinidade que determina a resistência ligada a uma linhagem sensível e a uma linhagem resistente a antibióticos do mesmo micro-organismo.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela quantidade ligada a uma linhagem sensível ou resistente a antibióticos conhecida do mesmo micro-organismo é previamente determinada.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela referida etapa de comparação (d) compreender comparar a afinidade de ligação do ligante de afinidade que determina a resistência ao micro-organismo intacto no complexo micro-organismo/ligante de afinidade que determina a resistência à afinidade de ligação do ligante de afinidade que determina a resistência a uma linhagem sensível ou resistente a antibióticos do mesmo organismo ou a uma população de linhagens sensíveis ou resistentes a antibióticos conhecidas.