



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 112014001871-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) **Número do Depósito:** BR 112014001871-5

(22) **Data do Depósito:** 26/07/2012

(43) **Data da Publicação Nacional:** 21/02/2017

(51) **Classificação Internacional:** C12Q 1/18; C12Q 1/06; C12Q 1/68.

(30) **Prioridade Unionista:** ES P201131276 de 26/07/2011.

(54) **Título:** SOLUÇÃO DE LISE, MÉTODO PARA AVALIAR A INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR DAS BACTÉRIAS, MÉTODO PARA PRESCREVER UMA TERAPIA COM ANTIBIÓTICO, MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO QUE ATUA SOBRE A PAREDE CELULAR BACTERIANA, USO DE UMA SOLUÇÃO DE LISE E KIT QUE COMPREENDE UMA SOLUÇÃO DE LISE

(73) **Titular:** UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, -. Endereço: Ciudad Universitaria de Cantoblanco, C/ Einstein, 3, E-28049, Madrid, ESPANHA(ES), Espanhola

(72) **Inventor:** JOSÉ LUIS FERNÁNDEZ GARCÍA; JAIME GOSÁLVEZ BERENGUER; GERMÁN BOU ARÉVALO; MARÍA TAMAYO NOVAS; REBECA SANTISO BRANDARIZ.

(87) **Publicação PCT:** WO 2013/014324 de 31/01/2013

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 26/07/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 30/03/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **“SOLUÇÃO DE LISE, MÉTODO PARA AVALIAR A INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR DAS BACTÉRIAS, MÉTODO PARA PRESCREVER UMA TERAPIA COM ANTIBIÓTICO, MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO QUE ATUA SOBRE A PAREDE CELULAR BACTERIANA, USO DE UMA SOLUÇÃO DE LISE E KIT QUE COMPREENDE UMA SOLUÇÃO DE LISE”**

Campo técnico da invenção

[001] A presente invenção insere-se no campo da indústria biotecnológica e, essencialmente, no que diz respeito à microbiologia, sendo o seu âmbito de aplicação o domínio da saúde (saúde humana, saúde animal, saúde ambiental e saúde básica). A presente invenção diz respeito a um método para avaliar a integridade da parede celular de bactérias existentes numa cultura na presença de um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana, permitindo, sob um ponto de vista prático, determinar rapidamente se uma bactéria é sensível ou resistente a um antibiótico que atue sobre a parede celular.

Antecedentes da invenção

[002] O estudo da sensibilidade de microrganismos aos agentes antimicrobianos é uma das funções mais importantes dos laboratórios de microbiologia clínica. O estudo é feito por meio de análises de sensibilidade ou antibiogramas, cujo objetivo principal consiste em avaliar, em laboratório, a resposta de um microrganismo a um ou vários agentes antimicrobianos.

[003] Alguns dos métodos mais frequentemente mais utilizados na prática clínica diária são (i) os métodos de difusão, tais como o antibiograma de tipo disco-placa baseado no trabalho de Bauer, Kirby *et al.* (Bauer A W, *et al.* Am. J. Clin. Pathol. 1966, 45:493-496) ou o teste Epsilon ou o método do teste E (AB Biodisk, Suécia), ou (ii) os métodos de diluição, tais como o método de diluição em gelose ou o método de microdiluição do caldo de cultura. Fazendo a comparação entre os métodos de difusão e os métodos de diluição conclui-se que estes últimos são mais complexos sob o ponto

de vista técnico e quase sempre mais dispendiosos, particularmente quando são utilizados painéis de microdiluição existentes nos circuitos comerciais. Os métodos de microdiluição em meio líquido são os métodos mais vulgarmente utilizados na prática corrente nos laboratórios de microbiologia clínica.

[004] Em muitos laboratórios, a utilização de painéis comerciais tem por base a utilização de sistemas semiautomáticos de incubação, leitura e interpretação; isto facilita a sua utilização, mas tem o inconveniente de ter custos mais elevados. Algumas empresas introduziram no mercado painéis em que o meio de cultura contém um indicador fluorescente que permite obter os resultados rapidamente (em menos de 8 horas). Em relação à determinação rápida da resistência aos antibióticos que atuam sobre a parede bacteriana, tais como as β -lactamas, acrescenta-se ao meio de cultura (pedido de patente de invenção WO/1992/019763) um composto fluorogênico que possa ser metabolizado. Se o organismo se desenvolver com o antibiótico, então o metabolismo da bactéria vai libertar um fluoróforo. Se o organismo não se desenvolver, então a fluorescência da amostra aumenta.

[005] Uma outra possibilidade consiste em utilizar um composto indicador de cor, tal como o tetrazólio, que faz com que a cor se altere após a adição de um portador de eletrões, tal como o metossulfato de fenazina, no caso de haver sensibilidade ao antibiótico. No entanto, ainda não há informação suficiente que permita sugerir a utilização regular de tais painéis.

[006] Há diversas empresas que estão também a avaliar sistemas lógicos (programas informáticos) que facilitem a interpretação clínica dos resultados obtidos; pode afirmar-se, com alguma certeza, que tais sistemas irão ser profusamente utilizados no futuro. Atualmente já estão disponíveis no mercado diversos sistemas, sendo os sistemas MicroScan WalkAway, Vitek e Wider os mais fiáveis. Na ausência de uma maior experiência com a utilização de indicadores fluorescentes, o tempo médio de resposta para se obter a susceptibilidade de um microrganismo específico aos agentes antimicrobianos está compreendido, tal como sucede com os métodos

de difusão referidos *supra*, entre 18 e 24 horas.

[007] Recentemente foi explicitada a possibilidade de se utilizar o sistema de dielectroforese que permite detectar variações da eletrofisiologia das células após a administração do antibiótico (*Hoettges KF, Dale JW, HughesMP. Rapid determination of antibiotic resistance in E. coli using dielectrophoresis. Phys Med Biol 2007; 52:6001-6009*).

[008] Um outro aproveitamento para os antibióticos que atuam sobre a parede bacteriana, tais como as β -lactamas, é a detecção, por meio de um substrato específico, da atividade de enzimas citoplásmicas libertadas pelas células para o meio, se o antibiótico tiver sido eficaz (patente de invenção europeia EP0135023).

[009] BACcelr8r™ é uma plataforma em desenvolvimento por Accelr8 para a identificação automática de microrganismos e para estudar a sua resistência aos antibióticos. Não utiliza culturas nem necessita do isolamento de bactérias. Trabalha por meio de cassetes, em que cada cassete corresponde a uma amostra. Utiliza um sistema automatizado com um microscópio comandado por meio de um computador, uma câmara digital e aplicações informáticas de análise. Uma bomba mantém um caudal do meio que contém as bactérias, em diferentes condições, a passar através da cassete. A análise da resistência aos antibióticos pode vir a ficar completa em 8 horas.

[010] O pedido de patente de invenção US2004/0014066 descreve um método para detectar, numa amostra, a atividade de um antibiótico que afete a integridade celular, o qual compreende os passos seguintes: (a) arranjar um microrganismo transformado que possua um ácido nucleico que codifique um promotor que esteja funcionalmente ligado a um gene repórter heterólogo capaz de emitir um sinal detectável, (b) colocar a amostra em contato com o microrganismo transformado e (c) observar o referido microrganismo, à procura do referido sinal detectável, em que o promotor é regulado por um sistema de dois componentes de transdução do sinal, em que os componentes são (i) um receptor sensível às modificações do invólucro ou da

membrana celular do microrganismo e (ii) um fator de transativação que é ativado em resposta a um estímulo proveniente do receptor e que regula o referido promotor.

Antibióticos que atuam sobre a parede bacteriana

[011] A estrutura principal da parede da célula bacteriana é feita de um heteropolímero, o peptidoglicano mureína. Esta macromolécula é constituída por uma sequência alternada de N-acetilglucosamina (NAG) e de ácido N-acetilmurâmico (NAM), ligados entre si por meio de ligações β -1,4. A cadeia é linear e não ramificada e forma a estrutura básica da parede celular. O ácido N-acetilmurâmico possui um grupo ácido láctico que se liga a uma cadeia peptídica curta (um tetrapeptídeo). Os aminoácidos típicos desta cadeia são L-alanina, ácido D-glutâmico, ácido m-diaminopimélico ou L-lisina ou D-alanina.

[012] Os antibióticos que inibem a síntese da parede bacteriana são diferentes famílias de fármacos que atuam nos diferentes passos da síntese da parede bacteriana:

- a cicloserina é o análogo de D-alanina e inibe, de forma competitiva, a ligação deste aminoácido às enzimas D-alanina-D-alanina-sintetase e alanina-racemase, impedindo-as de se ligarem aos precursores do peptidoglicano.

- a fosfomicina bloqueia a síntese dos precursores do peptidoglicano.

- a bacitracina inibe a reutilização de undecaprenilo, o transportador de lipídeos que transporta o peptidoglicano para fora da célula.

- os antibióticos glucopeptídicos ou glicopeptídicos são uma classe de peptídeos aos quais estão ligados radicais açúcar, tal como sucede na parede da célula bacteriana, possuindo uma afinidade elevada para os precursores desta estrutura. Os antibióticos glicopeptídicos mais bem conhecidos são a vancomicina e a teicoplanina. A vancomicina realiza a sua ação bactericida inibindo a síntese da parede da célula bacteriana, ligando-se ao fragmento D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) do pentapeptídeo na parede de bactérias Gram+, e bloqueando a incorporação de peptídeos na parede celular. Por outro lado, a vancomicina poderia atuar através

de outros mecanismos, tais como a destruição da permeabilidade da membrana citoplásmica e por inibição da síntese de ARN que tem lugar depois de o fármaco se ter ligado ao peptidoglicano.

- os antibióticos β -lactamas desempenham uma função bactericida ao interferirem com a ligação transversal ou com a ponte interpeptídica necessária para a interligação. Inibem a atividade dos PBP das proteases da serina ou transpeptidases, ao ligarem-se a estas de uma forma irreversível.

- outros antibióticos que interferem com a síntese da parede são isoniazida, etionamida e etambutol. Tal como no caso da cicloserina, referido *supra*, são utilizados para o tratamento de infecções micobacterianas. A isoniazida tem uma atividade bactericida na fase de replicação ativa que afeta a síntese do ácido micólico, interrompendo o alongamento dos ácidos gordos. A etionamida também inibe a síntese do ácido micólico. O etambutol interfere com a síntese do arabinogalactano da parede celular. A resistência a estes antibióticos deve-se à falta de penetração nas bactérias e/ou à modificação dos seus alvos celulares.

[013] A resistência aos antibióticos provoca dezenas de milhares de mortes todos os anos. Muitas destas mortes poderiam ser evitadas por meio de um tratamento com um antibiótico convenientemente selecionado para o efeito. Tendo em consideração os níveis de resistência, é necessário preparar a cultura bacteriana, seguindo-se um antibiograma. Para completar o que se disse anteriormente, as bactérias têm de ficar a desenvolver-se, normalmente, durante 2 a 3 dias. Para se obter o próprio antibiograma é necessário, normalmente, pelo menos 1 dia de incubação, no caso de bactérias vulgares de crescimento rápido.

[014] Na situação dos pacientes em estado crítico em UCI, é importante um tratamento rápido com antibióticos. Tendo em conta o atraso na obtenção do antibiograma, determina-se de forma empírica. Tal tratamento é ineficaz em 20-40% dos casos e a alteração do tratamento, após a obtenção dos resultados do antibiograma, pode já não ser eficaz. Nesta situação, é importante dispor de um

sistema rápido para obtenção de um antibiograma. Os antibióticos que atuam sobre a parede bacteriana, especificamente as β -lactamas, constituem um grupo bastante grande que é o mais vulgarmente utilizado em terapia contra infecções. É do maior interesse dispor de sistemas rápidos de obtenção de antibiogramas para tais antibióticos.

Descrição da invenção

[015] Os autores da presente invenção concluíram que uma consequência da atividade que os antibióticos que atuam sobre a parte de celular bacteriana têm sobre as bactérias é a libertação de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura. Para observarem este efeito, os inventores mantiveram a incubar uma estirpe de *E.coli* sensível à ampicilina (um antibiótico β -lactama) na presença do referido antibiótico, após o que a cultura ficou a incubar em diferentes microgeles sobre diversas lamelas, a que se acrescentou proteínase K ou DNAase I (exemplos 7 e 8). As culturas que não foram tratadas com ampicilina não apresentaram nenhuma formação secundária microgranular e fibrilar na preparação (figura 10a), ao passo que nas culturas tratadas com ampicilina foi observada uma formação secundária microgranular. Quando as culturas tratadas com ampicilina ficaram a incubar com proteínase K, a formação secundária permaneceu inalterada (figura 10f), ao passo que quando ficaram a incubar com DNAase I deixou de se observar a formação secundária (figura 10d), indicando isso que a formação secundária observada contém principalmente fragmentos de ADN extracelular provenientes das células afetadas pelo antibiótico. A referida formação secundária não foi observada quando foram utilizados outros tipos de antibióticos, tais como as quinolonas, que não atuam sobre a parede celular.

[016] No entanto, os inventores também concluíram que o referido método, quando a cultura bacteriana é uma cultura mista ou contaminada, isto é, há uma mistura de células sensíveis e resistentes, não seria muito conveniente como critério estrito de discriminação, uma vez que a morfologia das bactérias, apesar da libertação de fragmentos de ADN extracelular, não é modificada pela ação do antibiótico, isto é,

tanto as bactérias sensíveis como as resistentes ao antibiótico apresentam uma parede celular aparentemente intacta. Para a resolução deste problema, os inventores conceberam uma solução de lise que afeta apenas as bactérias cujas paredes celulares tenham sido previamente danificadas pela ação de um antibiótico que atue sobre a parede celular, e que ao ser acrescentada à cultura bacteriana, que tenha sido previamente exposta à ação do referido antibiótico, origina a libertação do nucleóide bacteriano, observando-se então uma bactéria com uma parede celular danificada (exemplos 1 a 5). Posto isto, a presença do nucleóide bacteriano, após a aplicação da solução de lise, é um indicador da presença de bactérias sensíveis ao antibiótico.

[017] Assim sendo, de acordo com uma dos seus aspectos, a invenção diz respeito a um método para avaliar a integridade da parede celular de uma bactéria numa cultura pura na presença de um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana, o qual compreende os passos seguintes:

i) acrescentar à referida cultura pura da referida bactéria um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana e

ii) determinar a presença de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura,

em que a presença de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura é um indicador de que a integridade da parede celular da bactéria foi danificada.

[018] De acordo com um outro dos seus aspectos, a invenção diz respeito a um método para avaliar a integridade da parede celular das bactérias existentes numa cultura, na presença de um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana, o qual compreende os passos seguintes:

i) acrescentar à referida cultura um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana,

ii) acrescentar uma solução de lise à cultura resultante do passo (i), em que a referida solução de lise é uma solução de lise específica para as bactérias cujas paredes celulares tenham sido danificadas pelo antibiótico que atua sobre a parede

celular bacteriana, compreendendo tal solução um tampão com um pH compreendido entre 3 e 11,5 e

iii) determinar a presença de nucleóides bacterianos,

em que a presença de nucleóides bacterianos no meio é um indicador de que a integridade da parede celular das bactérias foi danificada.

[019] De acordo com um outro dos seus aspectos, a presente invenção diz respeito a um método para determinar a sensibilidade de uma bactéria a um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana, o qual consiste em medir a integridade da parede celular da referida bactéria por meio de um método de acordo com a presente invenção e no caso de a integridade da parede celular bacteriana ter sido danificada, então a bactéria é sensível ao antibiótico.

[020] De acordo com um outro dos seus aspectos, a presente invenção diz respeito a um método para prescrever uma terapia com um antibiótico, personalizada para um indivíduo que padeça de uma doença bacteriana, o qual compreende os passos seguintes:

i) isolar a bactéria causadora da doença bacteriana a partir de uma amostra retirada do referido indivíduo e

ii) avaliar a integridade da parede celular da referida bactéria por meio de um método de acordo com a presente invenção,

[021] concluindo-se que no caso de a integridade da parede celular da referida bactéria ter sido danificada, então o referido indivíduo pode receber uma terapia à base de um antibiótico que atue sobre a parede celular.

[022] De acordo com um outro aspecto, a invenção diz respeito a um método para identificar um composto que atue sobre a parede celular bacteriana, o qual compreende os passos seguintes:

i) preparar uma cultura que contenha uma bactéria sensível a um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana e colocá-la em contato com o composto candidato e

ii) avaliar a integridade da parede celular da referida bactéria por meio de um método de acordo com a presente invenção,

em que no caso de a integridade da parede celular da referida bactéria ter sido danificada, então o composto candidato é um composto que atua sobre a parede celular bacteriana.

[023] De acordo com um outro aspecto, a invenção diz respeito a um método para identificar uma bactéria dormente ou uma bactéria tolerante a um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana numa cultura que contenha bactérias sensíveis, o qual compreende a avaliação da integridade da parede celular das bactérias presentes na referida cultura por meio de um método de acordo com a presente invenção, sendo a bactéria cuja integridade da parede celular não tenha sido danificada identificada como uma bactéria tolerante ou dormente.

[024] De acordo com um outro aspecto, a invenção diz respeito a uma solução de lise caracterizada por afetar apenas as bactérias que tenham paredes bacterianas danificadas pela ação de um antibiótico, a qual compreende um tampão e tem um valor de pH entre 3 e 11,5.

[025] De acordo com um outro aspecto, a invenção diz respeito à utilização de uma solução de lise da presente invenção para avaliação da integridade da parede celular bacteriana.

[026] De acordo com um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um estojo que contém uma solução de lise da invenção.

Descrição abreviada dos desenhos

[027] A figura 1 ilustra três estirpes diferentes de *Escherichia coli*, que é uma bactéria Gram-, que foram expostas ao antibiótico β -lactama, amoxicilina, conjuntamente com o inibidor de β -lactamase, o ácido clavulânico, em conformidade com a técnica para a avaliação da integridade da parede celular. A incubação teve lugar em meio líquido de Mueller-Hinton durante a fase de crescimento exponencial a 37°C com agitação durante 40 minutos. As doses de antibiótico foram escolhidas de

acordo com os pontos críticos indicados pelo "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)". Posto isto, considera-se que a estirpe é sensível quando o valor da concentração inibidora mínima (CIM) é $\leq 8/4$ (amoxicilina a 8 µg/mL e ácido clavulânico a 4 µg/mL) e considera-se que é resistente quando o valor da CIM é $\geq 32/16$ (amoxicilina a 32 µg/mL e ácido clavulânico a 16 µg/mL). De acordo com técnicas convencionais da microbiologia, a primeira estirpe (fila superior: a, a', a'') é uma estirpe sensível, a segunda estirpe é uma estirpe com uma sensibilidade intermédia (fila do meio: b, b', b'') e a terceira estirpe é uma estirpe resistente (fila inferior: c, c', c''). Coluna a, b, c: contraprova sem antibiótico; coluna a', b', c': 8/4; amoxicilina a 8 µg/mL e ácido clavulânico a 4 µg/mL; coluna a'', b'', c'': 32/16; amoxicilina a 32 µg/mL e ácido clavulânico a 16 µg/mL. As contraprovas sem antibiótico (a, b, c) mostram as bactérias não destruídas por lise. Após a aplicação de uma dose igual a 8/4, apenas as bactérias da primeira estirpe sensível são destruídas por lise, apresentando os nucleóides (a'). Após uma dose igual a 32/16, a primeira estirpe sensível e a segunda estirpe com sensibilidade intermédia são destruídas por lise (a'' e b''), ao passo que a terceira estirpe resistente não é destruída (c''). No entanto, são visíveis alguns danos nas paredes celulares em algumas células isoladas. Quando o antibiótico é eficaz, para além da libertação e da disseminação de nucleóides, observa-se uma formação secundária microgranular que contém fragmentos de ADN provenientes das células.

[028] A figura 2 ilustra a bactéria *Enterococcus faecalis*, que é uma bactéria Gram+ sensível ao antibiótico β -lactama, ampicilina (CIM = 4 µg/mL), tratada com doses diferentes de ampicilina durante 60 minutos. Caso a: contraprova sem antibiótico; b: 4 µg/mL (CIM); c: 8 µg/mL; d: 16 µg/mL; e: 32 µg/mL. A dose na CIM é suficiente para se observar o efeito sobre a parede provocado pelo antibiótico e a formação secundária de fragmentos de ADN extracelular.

[029] A figura 3 ilustra a bactéria *Enterococcus faecium*, que é uma bactéria Gram+ que é resistente ao antibiótico β -lactama, ampicilina (CIM > 32), depois de

incubar com doses diferentes deste antibiótico durante 60 minutos. Caso a: contraprova sem antibiótico; b: 32 µg/mL; c: 320 µg/mL. Após a aplicação da doses de 320 µg/mL, observou-se um efeito sobre a parede de algumas células isoladas, com uma tênue formação secundária de fragmentos de ADN extracelular.

[030] A figura 4 ilustra o caso da bactéria *E. coli* que é sensível ao antibiótico β -lactama, ceftazidima, do tipo cefalosporina. A estirpe foi exposta a doses diferentes durante 60 minutos. Caso a: contraprova sem antibiótico; b: 1 µg/mL (CIM); c: 8 µg/mL. A CIM dá origem ao aspecto filamentoso das células, revelando um efeito sobre as paredes. Após a aplicação de uma dose de 8 µg/mL, observou-se um forte efeito sobre as paredes, sendo visível, nitidamente, a formação secundária de fragmentos de ADN extracelular.

[031] A figura 5 ilustra células de *E. coli* provenientes de uma cultura em meio líquido, em fase de desenvolvimento exponencial, sensíveis a uma mistura de amoxicilina/ácido clavulânico e expostas a uma dose elevada de 32/16 durante 90 minutos. Após o processamento, utilizando a técnica da invenção, para além das células que manifestam um efeito sobre as paredes que libertam os nucleóides e para além da formação secundária de fragmentos de ADN extracelular, observa-se, nitidamente, uma célula com morfologia intacta (asterisco) que não foi afetada. Esta célula tem um comportamento idêntico ao de uma "célula dormente".

[032] A figura 6 corresponde a gráficos eu ilustram as percentagens de células em cultura, de células sem halo e de células com paredes danificadas, de *E. coli*, provenientes de uma cultura em meio líquido, em fase de desenvolvimento exponencial, sensíveis a uma mistura de amoxicilina/ácido clavulânico e expostas a uma dose elevada de 32/16 durante períodos diferentes. Observa-se na parte superior que a proporção de células não destruídas por lise aumenta gradualmente na cultura ao longo do tempo, à medida que o número de células afetadas pelo antibiótico diminui gradualmente (LH: halo grande + SH: halo pequeno + F: células destruídas por lise com ADN fragmentado). Na parte inferior vemos a mesma figura, mas com os dados

normalizados de acordo com a percentagem de células restantes na cultura. Verifica-se que a +percentagem de células com halo tem tendência para permanecer constante ao longo do tempo, ao passo que a percentagem de células com as paredes danificadas diminui gradualmente, de uma maneira semelhante à observada nas células em cultura. Isto permite afirmar que as células sem halo se comportam como "células dormentes".

[033] A figura 7 ilustra células de *E. coli* provenientes de uma cultura em meio líquido, em fase de desenvolvimento exponencial, sensíveis a uma mistura de amoxicilina/ácido clavulânico e expostas a uma dose elevada de 32/16 durante 60 minutos. Após o processamento, utilizando a técnica da invenção, para além da formação secundária típica foram observadas três células que libertam o nucleóide. Um dos nucleóides não mantém uma morfologia intacta, verificando-se que, em vez disso, se apresenta fragmentado, corado com muito menor intensidade e mais difuso (asterisco), apresentando um halo amplo com pequenos fragmentos de ADN que se difundem a partir do resíduo bacteriano central.

[034] A figura 8 mostra as mesmas estirpes de *E. coli* apresentadas na figura 1 que foram criadas em cultura durante 24 horas num prato e depois durante 40 minutos num meio líquido com uma dose de 0 (a, b, c), 8/4 (dose fraca; a', b', c') e 32/16 (dose elevada; a'', b'', c'') de mistura de amoxicilina/ácido clavulânico. O processamento das estirpes teve lugar sem o passo de lise por exposição à solução de lise. A estirpe sensível está ilustrada na fila superior (a, a', a''); a estirpe com sensibilidade intermédia está ilustrada na fila central (b, b', b'') e a estirpe resistente está ilustrada na fila inferior (c, c', c''). Nestas condições de crescimento e após este período de incubação com o antibiótico, apenas a estirpe sensível revela a formação secundária microgranular ou fibrilar, homogénea e difusa, de fragmentos de ADN extracelular provenientes das células. Esta formação secundária é evidente após a aplicação de uma dose fraca (8/4) e aumenta significativamente após a aplicação de uma dose elevada (32/16). Deste modo, a estirpe sensível pode ser claramente diferenciada das outras.

[035] A figura 9 ilustra uma estirpe de *E. coli* sensível à ampicilina, que esteve a incubar com uma dose do referido antibiótico na concentração de 8 µg/mL durante 60 minutos. Casos a e b: observação em suporte húmido. Caso a: cultura de contraprova sem antibiótico; caso b: cultura tratada com ampicilina. Observa-se uma formação secundária microgranular ou fibrilar difusa de fragmentos de ADN bacteriano extracelular entre as bactérias da cultura tratada com ampicilina. Casos c e d: cultura estabilizada em metanol:ácido acético. Caso c: cultura de contraprova sem antibiótico; caso d: cultura tratada com ampicilina, em que se observa o material da formação secundária de ADN entre as bactérias, formando agregados com diversas formas e tamanhos.

[036] A figura 10 ilustra uma estirpe de *E. coli* sensível à ampicilina que esteve a incubar com uma dose do referido antibiótico na concentração de 32 µg/mL durante 60 minutos. Foram incluídas em microgeles alíquotas da cultura de contraprova sem antibiótico e alíquotas da cultura com o tratamento com ampicilina, tendo sido feita a sua coloração com o corante 'SYBR Gold'. A cultura de contraprova sem antibiótico não apresenta nenhuma formação secundária microgranular ou fibrilar na preparação (a), ao passo que a cultura tratada com ampicilina apresenta a referida formação secundária (b). A incubação dos microgeles com tampões que contêm as enzimas, DNAase I (c) ou a proteínase K (e), não afeta a referida formação secundária. Quando o microgel das culturas tratadas com ampicilina fica a incubar com doses 2,5 U de DNAase I durante 30 minutos, a formação secundária desaparece da preparação (d), ao passo que no caso em que fica a incubar com a proteínase K na concentração de 2 mg/mL durante 30 minutos a formação secundária permanece inalterada (f). O tampão que contém a proteínase K possui SDS e EDTA que destroem as células por lise. O aumento da concentração da proteínase K para 10 mg/mL, no mesmo tampão ou em água, também não afeta a formação secundária. Esta experiência demonstra que esta formação secundária corresponde a fragmentos de ADN extracelular.

[037] A figura 11 ilustra uma hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com uma

sonda de ADN genômico integral de *E. coli*, sobre extensões de cultura, fixadas em solução de Carnoy, das referidas bactérias tratadas com ampicilina durante 60 minutos. A solução de Carnoy faz com que o material microgranular ou fibrilar da formação secundária se agregue, envolvendo as bactérias. Assim sendo, a contração com DAPI revela agregados do material da formação secundária com bactérias cujos nucleóides são intensamente colorados com DAPI. Este material da formação secundária agregada também é colorado com o referido corante, embora de uma forma mais ligeira (a). A sonda de ADN genômico integral hibrida quer com os nucleóides celulares quer com o material da formação secundária, demonstrando que este último corresponde a ADN bacteriano fragmentado.

[038] A figura 12 ilustra uma estirpe de *Acinetobacter baumannii* sensível a imipenem que esteve a incubar com este antibiótico na concentração de 0,76 µg/mL durante 1 hora. Diluiu-se uma alíquota da cultura e integrou-se num microgel de agarose, efetuou-se a sua desidratação com soluções alcoólicas em concentrações crescentes, secou-se e colorou-se com o corante 'SYBR Gold'. Observa-se uma formação secundária microgranular ou fibrilar correspondente aos fragmentos de ADN em graus diferentes de aumento de tamanho.

Descrição minuciosa da invenção

[039] Com base nos resultados revelados na secção que diz respeito à descrição da invenção, os inventores desenvolveram um conjunto de aspectos inventivos que irão ser explicitados adiante, de uma forma pormenorizada.

Métodos da invenção. para avaliar a integridade das paredes celulares bacterianas

[040] De acordo com um dos seus aspectos, a invenção diz respeito a um método para avaliar a integridade da parede celular de uma bactéria numa cultura pura na presença de um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana (doravante designado por "primeiro método da invenção"), o qual compreende os passos seguintes:

- i) acrescentar à referida cultura pura da referida bactéria um antibiótico

que atue sobre a parede celular bacteriana e

ii) determinar a presença de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura,

em que a presença de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura é um indicador do facto de a integridade da parede celular da bactéria ter sido danificada.

[041] No contexto da presente invenção, o termo "parede celular" designa a parede celular que envolve uma célula bacteriana e que é constituída pelo peptidoglicano mureína que é formado por uma sequência alternada de moléculas de N-acetilglucosamina (NAG) e de ácido N-acetilmurâmico (NAM), ligadas entre si por ligações β -1,4. Os termos "parede celular" e "parede celular bacteriana" são equivalentes e são utilizados indiferentemente ao longo da presente memória descritiva.

[042] Na presente invenção, subentende-se que expressão "avaliar a integridade da parede celular de uma bactéria" designa a ação que consiste em determinar se os componentes originais ou a estrutura da célula bacteriana foram danificados ou, pelo contrário, se tais componentes e estrutura permanecem intactos após a exposição a um agente exógeno.

[043] No contexto da presente invenção, o agente exógeno é um antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana, isto é, um antibiótico que bloqueia a síntese de peptidoglicanos, por forma a que a parede celular da bactéria seja danificada.

[044] Na presente invenção, subentende-se que a expressão "cultura pura" designa qualquer cultura que contenha um tipo singular de microrganismo. Os diferentes meios de cultura, técnicas e métodos para a obtenção de culturas puras são profusamente conhecidos na especialidade e são uma prática corrente para os especialistas na matéria (Rotger, R. (editor), 1997, Microbiología Sanitaria y Clínica, Editorial Síntesis, Madrid).

[045] O primeiro passo do primeiro método da invenção [passo i)] consiste em

adicionar à referida cultura pura da referida bactéria um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana.

[046] O termo "antibiótico" designa todos os compostos químicos que eliminem ou inibam o desenvolvimento de organismos infecciosos; tal como aqui utilizado, o referido termo designa todos os compostos químicos produzidos por um ser vivo, ou um seu derivado sintético, que eliminem ou inibam o desenvolvimento de organismos infecciosos, em concentrações pequenas. Uma propriedade comum a todos os antibióticos é a sua toxicidade seletiva: a toxicidade é maior para os organismos invasores do que para os animais ou seres humanos onde aqueles estejam alojados. Os antibióticos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura, de acordo com o microrganismo que devam atacar, em conformidade com o seu mecanismo de ação, com o seu alvo terapêutico, etc.. Na presente invenção subentende-se que um "antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana" é um antibiótico que interfere em todos os passos de síntese da parede bacteriana. Um teste para se determinar se um antibiótico atua sobre a parede celular é, por exemplo, qualquer dos testes descritos nos exemplos do presente pedido de patente de invenção.

[047] De acordo com uma forma de realização particular, o antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana é selecionado entre o conjunto constituído por um antibiótico β -lactama, uma isoniazida, uma etionamida, um etambutol, uma ciclosserina e um antibiótico glicopeptídico.

[048] De acordo com uma outra forma de realização particular, o antibiótico β -lactama é seleccionado entre o conjunto constituído por penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbacefem, carbapenem, monobactamas e inibidores de β -lactamase.

[049] De acordo com uma outra forma de realização particular, os inibidores de β -lactamase são seleccionados entre o conjunto constituído por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.

[050] De acordo com uma outra forma de realização particular, o antibiótico glicopeptídico é vancomicina ou teicoplanina.

[051] Conforme é sabido pelos especialistas na matéria, o período de incubação da cultura conjuntamente com o antibiótico pode variar num intervalo bastante amplo, dependendo disso do facto de a cultura se encontrar numa fase de crescimento estacionário ou exponencial, do facto de a cultura ser realizada sobre um prato ou em meio líquido, da dose de antibiótico que se acrescenta à cultura, etc.. De um modo geral, o período de incubação com o antibiótico pode estar compreendido entre 5 minutos e 90 minutos e de preferência entre 20 e 60 minutos. De acordo com uma forma de realização particular, o período de incubação é de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ou 80 minutos. Além disso, a quantidade de antibiótico que irá ser acrescentada ao meio de cultura também pode variar dentro de limites amplos; no entanto, de acordo com uma forma de realização particular, a quantidade de antibiótico que irá ser acrescentado ao meio de cultura está compreendida entre 5 e 2 570 µg/mL, embora a quantidade de antibiótico que irá ser acrescentado seja, preferencialmente, a que corresponde à concentração inibidora mínima (CIM) para uma bactéria específica. Conforme é sabido pelos especialistas na matéria, nesta especialidade já tabelas normalizadas e genericamente aceites onde estão enumerados os valores das CIM necessárias para inibir um microrganismo específico. De acordo com uma forma de realização particular, a quantidade de antibiótico que é possível acrescentar ao meio de cultura é de 0,06, 0,038, 0,38, 4, 8, 16, 20, 32, 160, 256 ou 2 560 µg/mL. Finalmente, a temperatura de incubação da cultura com o antibiótico pode variar entre 36°C e 38°C, sendo preferencialmente 37°C.

[052] O segundo passo do primeiro método da invenção [passo ii)] consiste em observar a presença de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura.

[053] Conforme é sabido pelos especialistas na matéria, a presença de fragmentos de ADN no meio de cultura pode ser determinada por microscopia ou por quaisquer outros métodos alternativos, físicos ou químicos, para a detecção de ADN libertado no meio de cultura pelos microrganismos, incluindo, mas sem qualquer limitação, eletroforese, anticorpos, espectrometria, reação em cadeia com polimerase,

técnicas de hibridação, micromatrizes analíticas, práticas da microfluídica, nanopartículas, nanocristais, etc.. Estes métodos são amplamente conhecidos na especialidade e o recurso a tais métodos é uma prática vulgar a que recorrem os especialistas na matéria.

[054] No entanto, devido ao tamanho relativamente pequeno dos fragmentos de ADN, de acordo com uma forma de realização particular, a microscopia é a técnica preferível para a determinação da presença de fragmentos de ADN devido à sua maior sensibilidade. Para tal, é conveniente imobilizar numa lamela uma amostra retirada da cultura resultante do primeiro passo [passo i)]. Assim sendo, de acordo com uma forma de realização particular, o primeiro método da invenção consiste em executar, entre os passos i) e ii), o passo que consiste em imobilizar sobre um suporte uma amostra retirada da cultura do passo i).

[055] Tal suporte pode ser uma lamela. De acordo com uma forma de realização particular, a referida lamela é uma lamela de vidro, total ou parcialmente revestida com uma película convencional de agarose. Para tal, prepara-se num vaso de Coplin, ou semelhante, uma solução convencional de agarose diluída entre 0,2 e 1% em água; cobre-se com uma folha de plástico perfurada e deposita-se num forno de micro-ondas; ajusta-se a potência do forno de micro-ondas para um valor compreendido entre 300 W e 1000 W, de preferência 500 W, agitando-se ocasionalmente o reservatório para se conseguir uma melhor dissolução da agarose, durante o tempo necessário para ferver. Este método também pode ser efetuado em banho termostático. No momento em que a solução de agarose fica totalmente transparente, considera-se que está pronta para ser depositada em vasos verticais com um conteúdo compreendido entre 10 e 250 mL. Tais vasos devem ser previamente aquecidos num banho a uma temperatura entre 60 e 100°C, de preferência a 70°C, para se manter a solução de agarose no estado líquido. As lamelas limpas são depois submersas verticalmente, suportadas por pinças aplicadas na área neutra, durante um período entre 1 e 60 segundos, sendo removidas e submersas novamente entre 1

e 10 vezes, até se formar uma película homogénea sobre a lamela. Em alternativa, em vez de se mergulhar a lamela na solução de agarose, é possível utilizar um micronizador para dispersar a agarose sobre a lamela. É assim possível recobrir uma grande quantidade de lamelas num curto intervalo de tempo. Independentemente do método utilizado, as lamelas recobertas com uma película de agarose são depositadas horizontalmente sobre uma superfície lisa e fria, a uma temperatura entre 1 e 15°C, de preferência a 4°C, feita, por exemplo, de vidro ou metal. Esta placa com as lamelas é introduzida no frigorífico a 4°C durante pelo menos 30 minutos, até se verificar que a solução de agarose solidificou sobre a superfície da lamela. Efetua-se a remoção dos tabuleiros para fora do frigorífico e a superfície das lamelas que esteve em contacto com o prato é limpa com papel mata-borrão. As lamelas são depois introduzidas horizontalmente numa estufa a uma temperatura compreendida entre 37°C e 100°C, até que a agarose fique completamente seca e forme uma película fina aderente ao vidro. As lamelas assim tratadas podem ser utilizadas imediatamente ou guardadas num compartimento perfeitamente estanque à temperatura ambiente durante vários meses.

[056] A imobilização de uma amostra proveniente da cultura do passo i) sobre uma lamela preparada conforme descrito *supra* implica a preparação prévia da referida amostra. Por meio dos métodos convencionais conhecidos neste domínio, obtém-se e verifica-se a concentração dos microrganismos numa amostra líquida. A concentração adequada para a análise varia entre 0,1 e 20 milhões de microrganismos por mililitro. Se a amostra estiver excessivamente concentrada, ajusta-se para o valor adequado da concentração, mediante diluição com o meio de cultura ou com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou semelhante, convenientemente de acordo com o microrganismo e de acordo com a estabilidade do antibiótico que se pretende experimentar.

[057] Para facilitar o processamento da amostra que contém os microrganismos, esta é integrada num meio com características semelhantes às de uma suspensão,

por exemplo, um microgel de agarose. Neste caso, prepara-se uma solução de agarose com baixo ponto de fusão/baixo ponto de solidificação, com uma concentração compreendida entre 0,5 e 3% em água destilada ou em soluto salino tamponado com fosfato (PBS). Esta agarose é fundida recorrendo a um forno de micro-ondas ou em banho controlado por via termostática e depois mantém-se a sua temperatura num valor entre 30 e 37°C, num tubo introduzido num banho controlado por via termostática ou num forno de micro-ondas. Efetua-se uma mistura cuidadosa da amostra, proveniente da cultura, e da solução de agarose num tubo de Eppendorf, ou semelhante, de tal modo que esta última solução se encontre numa concentração compreendida entre 0,3 e 2%, por exemplo, 70 µL de solução de agarose + 30 µL de amostra. É importante que a temperatura da agarose não exceda 37°C para evitar a danificação dos microrganismos.

[058] Finalmente, para se obter a amostra sobre o suporte, as lamelas recobertas com a agarose são colocadas sobre uma superfície lisa e fria, de vidro ou metal, a uma temperatura compreendida entre 1 e 15°C, para impedir a formação de bolhas de ar. Recomenda-se que seja feita a deposição de uma gota (entre 2 e 200 microlitros (µL)) da mistura (amostra preparada a partir da cultura + agarose) com uma micropipeta, colocando-se uma pequena peça de cobertura por cima da gota. É possível pipetar sobre cada lamela várias gotas, isto é, amostras da cultura bacteriana do passo i). Como precaução, recomenda-se que cada amostra seja objecto de um método em duplicado e que se utilize uma amostra de contraprova de cada vez que a técnica é aplicada. Introdz-se no frigorífico a 4°C o prato com as lamelas, durante um intervalo de tempo compreendido entre 2 e 30 minutos, até ocorrer uma solidificação adequada da agarose. Depois de a agarose ter solidificado, remove-se as pequenas peças de cobertura das gotas, suavemente, dentro do mesmo frigorífico, evitando danificar o microgel.

[059] A seguir, para se observar os fragmentos de ADN por microscopia, é conveniente estabilizar e fixar firmemente os fragmentos de ADN sobre a lamela, uma

vez que podem descolar-se. Para tal, coloca-se as lamelas secas a incubar num forno de micro-ondas com uma potência compreendida entre 300 W e 1000 W, de preferência a 500 W, durante o intervalo de tempo compreendido entre 1 e 10 minutos. Uma alternativa, embora menos recomendável devido à sua duração, consiste em manter as lamelas a incubar numa estufa ou num forno de micro-ondas a uma temperatura elevada durante um intervalo de tempo compreendido entre 1 e várias horas. Depois de estarem totalmente secas, as lamelas que já foram objecto de processamento e que contêm a amostra podem ser guardadas em cofres estanques de armazenamento à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante meses. Isto facilita que seja feita a separação entre o método de tratamento da amostra e o passo subsequente de avaliação da integridade da parede celular dos microrganismos. O armazenamento permite a avaliação repetida, com diferentes intervalos, de várias amostras de um e do mesmo microrganismo.

[060] Logo que as amostras estejam tratadas e depois de os fragmentos de ADN estarem estabilizados e firmemente fixados às lamelas, as amostras podem ser coloradas e é possível avaliar a integridade da parede celular dos microrganismos. Assim sendo, de acordo com uma forma de realização particular do método da presente invenção, a presença de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura é efectuada por meio de coloração. É possível conseguir obter uma elevada qualidade de imagem e uma elevada consistência do resultado de avaliação escolhendo convenientemente as condições de coloração.

[061] A contrastação ou coloração é uma técnica auxiliar em microscopia para melhorar o contraste da imagem vista ao microscópio. Em bioquímica, isto significa que se adiciona um corante específico para a molécula que se pretende colorar (ADN no contexto da presente invenção) a um substrato para qualificar ou quantificar a presença de um composto específico. Os agentes de contraste podem ser utilizados, entre outros fins, para definir e examinar organelas em células individuais ou para marcar e identificar ácidos nucleicos na eletroforese em gel.

[062] A maior parte dos corantes são compostos orgânicos que possuem alguma afinidade específica para os materiais celulares. Muitos corantes frequentemente utilizados são moléculas com carga eléctrica positiva (catiões) que se combinam, de forma intensa com constituintes celulares com carga eléctrica negativa, tais como os ácidos nucleicos e os polissacarídeos acídicos. Como exemplos ilustrativos e não limitativos de corantes catiônicos refere-se o azul de metileno, o violeta de cristal e a safranina. O azul de metileno é um bom corante singular que atua rapidamente em todas as células bacterianas e que não produz uma cor tão intensa que obscureça os pormenores celulares, sendo por isso particularmente útil. Ocasionalmente, alguns corantes produzem uma melhor coloração apenas depois de as células terem sido tratadas com uma outra substância química conhecida pela designação de mordente, que não é um corante *per se*. O ácido tânico é um mordente vulgar que se combina com um constituinte celular e o altera, de tal modo que pode então atacar o corante. Conforme é sabido pelos especialistas na matéria, há técnicas na especialidade que são específicas para colorar ADN, por exemplo, a coloração de Feulgen que consiste em submeter o material a uma hidrólise com ácido clorídrico 1 N a 60°C ou com ácido clorídrico 5 N à temperatura ambiente e em adicionar depois o reagente de Schiff. É possível colorar os núcleos das células bacterianas por meio desta técnica.

[063] Conforme se disse antes, devido ao tamanho relativamente pequeno dos fragmentos de ADN, de acordo com uma forma de realização particular, a microscopia de fluorescência é a técnica preferível para a observação dos fragmentos de ADN, tendo em conta a sua elevada sensibilidade, devendo para isso as bactérias ser coloradas com compostos químicos específicos designados por fluoróforos ou fluorocromos. Tais compostos são capazes de emitir fluorescência ao serem excitados com uma luz com um comprimento de onda conveniente. Existe presentemente uma grande variedade de fluorocromos que não só fornecem informação sobre a viabilidade das células como também mostram claramente determinadas características fisiológicas e em alguns casos características estruturais das bactérias.

A título ilustrativo, há fluoróforos que detectam a atividade respiratória (v.g., derivados de tetrazólio, etc.), atividade de esterase (v.g., calceína-AM, carboxifluoresceína, etc.), o potencial das membranas (v.g., rodamina 123, oxonol VI, carbocianinas, etc.), a integridade das membranas (v.g., SYTO-9, SYTO-13, fluoróforo verde Sytox, iodeto de propídio, etc.), etc.

[064] Assim sendo, de acordo com uma forma de realização particular, efetua-se a coloração utilizando um ou vários fluorocromos. Posto isto, consoante a disponibilidade de filtros de fluorescência, assim as amostras podem ser coloradas com fluorocromos específicos do ADN, do tipo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), de tipo Hoechst 33258, de tipo Hoechst 33342, de tipo brometo de etídio, de tipo iodeto de propídio, etc. No entanto, são preferíveis os fluorocromos que tenham uma sensibilidade muito elevada, tais como GelRed, EvaGreen e outros derivados de cianina, tais como SYBR®, PicoGreen® (Invitrogen - Molecular Probes™), as variantes de TOTO, YOYO, BOBO, POPO, JOJO, LOLO, SYTOX, PO-PRO, BO-PRO, YO-PRO, TO-PRO, JO-PRO, PO-PRO, LO-PRO, etc.. Outros tipos de fluorocromos compreendem, mas sem qualquer limitação, o fluorocromo azul SYTOX, cromomicina A3, mitramicina, fluorocromo laranja de acridina, fluorocromo verde SYTOX, fluorocromo laranja de tiazol, LDS 751, 7-AAD, fluorocromo laranja SYTOX e DRAQ5.

[065] De acordo com uma forma de realização particular, os fluorocromos são selecionados entre o conjunto constituído por Hoechst 33342, Hoechst 33258, DAPI, cromomicina A3, mitramicina, brometo de etídio, fluorocromo laranja de acridina, fluorocromo laranja de tiazol, 7-AAD, derivados de cianina e as variantes dos fluorocromos TOTO, YOYO, BOBO, POPO, JOJO, LOLO, SYTOX, PO-PRO, BO-PRO, YO-PRO, TO-PRO, JO-PRO, PO-PRO e LO-PRO.

[066] Presentemente está a aumentar a quantidade e a qualidade dos fluorocromos. Para se evitar a perda de fluorescência, é possível incorporar um meio contra a evanescência (por exemplo, Vectashield-Vector H-1000, DABCO; etc.). No entanto, estes meios provocam, normalmente, uma fluorescência difusa e geram um

fundo luminoso que dificulta o contraste da imagem. Assim sendo, é preferível, geralmente, utilizar um fluorocromo bastante sensível e relativamente fotoestável instalado numa solução aquosa tamponada e fazer a avaliação da amostra de uma forma relativamente rápida, antes de secar. Se necessário, a lamela pode ser lavada e colorada outra vez.

[067] As imagens obtidas podem ser estudadas por análise visual direta ou então, de preferência, mediante o recurso a aplicações informáticas adequadas para analisar imagens digitalizadas obtidas por meio de câmaras analógicas ou digitais montadas nas plataformas do microscópio.

[068] Finalmente, avalia-se a integridade da parede dos microrganismos determinado a presença de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura, sendo a presença dos fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura um indicador do facto de a integridade da parede celular da bactéria ter sido danificada.

[069] No entanto, conforme se disse *supra* (descrição da invenção), quando a cultura bacteriana é uma cultura mista ou contaminada, isto é, há uma mistura de células que são sensíveis ou resistentes aos antibióticos que atuam sobre a parede celular bacteriana, o primeiro método da invenção pode eventualmente não ser muito conveniente enquanto critério estrito de discriminação, uma vez que tanto as bactérias sensíveis como as bactérias resistentes ao antibiótico apresentam uma parede celular aparentemente intacta. Para a resolução deste problema, os inventores conceberam uma solução de lise que apenas afeta as bactérias cujas paredes celulares tenham sido previamente danificadas pela ação do antibiótico que atua sobre a parede celular. Esta solução de lise pode ser acrescentada à cultura bacteriana que tenha sido previamente exposta à ação do referido antibiótico, sendo o nucleóide bacteriano libertado e observando-se então uma bactéria com a parede celular danificada (exemples 1 a 5). Posto isto, a presença de nucleóides bacterianos após a aplicação da solução de lise é um indicador da presença de bactérias sensíveis ao referido antibiótico que actua sobre a parede celular.

[070] Assim sendo, de acordo com um outro dos seus aspectos, a invenção diz respeito a um método para avaliar a integridade da parede celular das bactérias existentes numa cultura na presença de um antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana (doravante designado por "segundo métodos da invenção"), o qual compreende os passos seguintes:

i) acrescentar à referida cultura um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana,

ii) acrescentar a solução de lise à cultura resultante do passo i), em que a referida solução de lise é uma solução de lise específica para as bactérias cujas paredes celulares tenham sido danificadas pelo antibiótico que atua sobre as paredes das células bacterianas, e a qual compreende um tampão com um pH compreendido entre 3 e 11,5 e

iii) determinar a presença do nucleóide bacteriano, em que a presença do nucleóide bacteriano no meio é um indicador do facto de a integridade da parede celular da bactéria ter sido danificada.

[071] Os termos e expressões "avaliar a integridade da parede celular das bactérias", "parede celular" e "antibiótico que atua sobre a parede celular" foram já definidos antes no primeiro método da invenção, sendo aplicáveis ao presente aspecto da invenção.

[072] Além disso, embora o segundo método da invenção tenha sido concebido para a avaliação da integridade da parede celular de bactérias numa cultura mista ou contaminada, um especialista na matéria compreende que o referido segundo método da invenção também pode ser aplicado a culturas puras.

[073] O termo "cultura pura" foi já definido antes na presente memória descritiva. Na presente invenção, subentende-se que uma "cultura mista" é uma cultura bacteriana que contém duas ou mais espécies diferentes de bactérias. Na maior parte dos casos, a presença de duas ou mais espécies diferentes de bactérias numa cultura resulta da contaminação da cultura devido ao manuseamento incorreto da amostra,

pelo que no contexto da presente invenção os termos "cultura mista" e "cultura contaminada" são equivalentes e podem ser utilizados indiferentemente ao longo da memória descritiva. Assim sendo, de acordo com a uma forma de realização particular do segundo método da invenção, as bactérias presentes na cultura pertencem à mesma espécie ou a espécies diferentes.

[074] Conforme pode ser verificado por um especialista na matéria, os passos i) e iii) do segundo método da invenção são comuns ao primeiro método da invenção [passos i) e ii), respectivamente]. Assim sendo, todas as explicações e formas de realização particulares mencionadas anteriormente, a propósito dos referidos passos, são também aplicáveis ao segundo método da invenção.

[075] O segundo método da invenção compreende, para além dos passos i) e iii) [idênticos ao passos i) e ii) do primeiro método da invenção], um passo ii) que não existe no primeiro método da invenção, o qual consiste em adicionar uma solução de lise à cultura resultante do passo i), em que a referida solução de lise é uma solução de lise específica para as bactérias cujas paredes celulares tenham sido danificadas pelo antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana, e a qual compreende um tampão com um valor de pH compreendido entre 3 e 11,5.

[076] A solução de lise que afeta especificamente as bactérias que têm uma parede celular afetada pelo antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana é constituída, basicamente, por uma solução tampão que tem um valor de pH entre 3 e 11,5, mas que pode conter também outros componentes, incluindo, mas sem qualquer limitação, detergentes iónicos, detergentes não iónicos, sais, etc., em diversas proporções.

[077] Assim sendo, de acordo com uma forma de realização particular, o tampão que faz parte da solução de lise é tris(hidroximetil)aminometano (Tris) com a fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, podendo ser utilizado também para a preparação de outras soluções tampão incluindo, mas sem qualquer limitação, tampão Tris-HCl, tampão Tris-Gly, tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) e tampão TBE (Tris-borato-EDTA). O tampão Tris

tem um índice pKa igual a 8,06 que lhe confere uma capacidade de tamponamento eficaz num intervalo de valores de pH compreendido entre 7,0 e 9,2. A forma mais frequentemente utilizada é designada por base Tris (a forma básica de amina não ionizada); por vezes também se utiliza a forma ácida ou cloridrato (Tris-HCl). Outras soluções tampão compreendem, mas sem qualquer limitação, Hepes, Mops, Pipes, etc. Para se obter um valor de pH estável próximo de 11,5 utiliza-se fosfato de sódio dibásico, também conhecido pela designação de hidrogenofosfato de dissódio (Na_2HPO_4), ácido bórico-borato, trietilamina e ácido 4-[ciclo-hexilamino]-1-butano-sulfónico (CABS).

[078] De acordo com uma outra forma de realização particular, a solução de lise compreende, para além da solução tampão, até 3% de um detergente iónico ou de um detergente não iónico.

[079] Tal como aqui utilizado, o termo "detergente iónico" designa um composto que possui um radical hidrofóbico e um radical hidrofílico, o qual forma na solução iões com carga eléctrica positiva (detergente catiónico) ou iões com carga eléctrica negativa (detergente aniónico) e que permite obter uma emulsão. Faz-se observar aos especialistas na matéria que os termos "detergente", "surfactante" e "agente tensoativos" são sinónimos, pelo que podem ser utilizados indiferentemente ao longo da presente memória descritiva.

[080] Como exemplos de detergentes catiónicos refere-se, mas sem qualquer limitação, os sais de amónio primário, secundário, terciário e quaternário com uma estrutura linear ou cíclica, as suas misturas, tais como, por exemplo, os sais de piridina, os sais de piperazina e os derivados dos referidos sais de amónio. O termo "derivados de sais de amónio" abrange os sais que incorporam na mesma estrutura pelo menos dois grupos amino primário, secundário, terciário e/ou quaternário, tais como, por exemplo, os sais de guanidina, piperazina e imidazol. Esta definição também poderia abranger os sais de aminoácidos tais como, por exemplo, os sais de lisina, arginina, ornitina ou triptofano. De igual modo, esta definição poderia abranger

os sais de amónio nos quais a carga positiva, em vez de ser um átomo de azoto, é um átomo de fósforo, tais como, por exemplo, iodeto de metilfosfonato de ditetradecil(trimetiletilfosfónio), iodeto de metilfosfonato de ditetradecil(butildimetilfosfónio), iodeto de metilfosfonato de ditetradecil(dimetilisopropilfosfónio) ou iodeto de metilfosfonato arsénico de ditetradecil(trimetilarsónio) e iodeto de metilfosfonato de dioleíl(trimetilfosfónio). Como exemplos de sais de amónio refere-se, mas sem qualquer limitação, os sais de tetralquilamónio, os sais de alquilbenzildimetilamónio ou os sais de amónio heterocíclico, tais como o brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB).

[081] Como exemplos ilustrativos e não limitativos de detergentes iónicos refere-se os seleccionados entre aminoácidos acíclicos, tais como os ácidos acilglutâmicos, os peptídeos acíclicos, sarcosinatos, tauratos, etc., os ácidos carboxílicos, tais como os ácidos com cadeias saturadas, os ésteres de ácidos carboxílicos, os éteres de ácidos carboxílicos, os ésteres do ácido fosfórico, os ácidos sulfônicos, tais como os acilisotianatos, os sulfonatos de alquilarilo, os sulfonatos de alquilo, os sulfosucinatos, etc., e os ésteres do ácido sulfúrico, tais como os sulfatos dos éteres alquílicos e os sulfatos de alquilo.

[082] De acordo com uma forma de realização particular, um detergente iónico é um detergente seleccionado entre o conjunto constituído por dodecilsulfato de sódio (SDS), sulfonato de alquibenzeno, laurissarcosina, hidratos dos sais do ácido glicocólico e os sais de tais compostos.

[083] Como exemplos de detergentes não iónicos refere-se, mas sem qualquer limitação, os seleccionados entre polissorbatos, copolímeros de polietilenoglicol, e copolímeros de polipropilenoglicol, tais como, por exemplo, Tween, Span e Poloxamer.

[084] De acordo com uma outra forma de realização particular, o detergente não iónico é seleccionado entre o conjunto constituído por t-octilfenoxipolietoxietanol, N,N-Bis(3-D-gluconamidopropil)colamida, Brij(r) 35 P, N-decanoíl-N-metilglutamina,

digitonina, dodecanoíl-N-metilglucamida, heptanoíl-N-metilglutamida, octilfenoxipoli(etilenoxi)etanol ramificado, N-nonanoíl-N-metilglucamina, Nonidet P 40, N-octanoíl-N-metilglutamina, solução de Span 20 e polissorbato 20.

[085] De acordo com uma outra forma de realização particular, a solução de lise compreende também um sal com uma concentração até 3 M. Como exemplos de sais que podem fazer parte da solução de lise da presente invenção refere-se, mas sem qualquer limitação, carbonatos, cloretos, fosfatos, nitratos, nitritos, sulfatos, citratos, carboxilatos (acetatos, formiatos, salicilatos, etc.). De acordo com outra forma de realização particular, a solução de lise contém cloreto de sódio (NaCl).

[086] De acordo com uma forma de realização particular, a solução de lise prevista na presente invenção contém Tris numa concentração entre 0,001 M e 2 M, até 3% de SDS e NaCl numa concentração até 3 M, com um valor de pH compreendido entre 3 e 11,5. No entanto, um especialista na matéria sabe que estes compostos podem ser substituídos por outros compostos equivalentes; por exemplo, o SDS pode ser substituído por Triton X-100 numa concentração até a 10%.

[087] De acordo com uma outra forma de realização particular, a solução de lise prevista na presente invenção contém (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) numa concentração até cerca de 0,2 M, cerca de 0,025% de SDS, cloreto de sódio com uma concentração de cerca 0,5 M ou 0,05 M e um pH igual a 10; neste caso, o SDS pode ser substituído por Triton X-100 numa concentração de cerca de 5%.

[088] De acordo com uma outra forma de realização particular, a solução de lise prevista na presente invenção contém (hidroximetil)-1,3-propanodiol com uma concentração de cerca de 0,2 M, Triton X-100 com uma concentração de cerca de 5%, e cloreto de sódio com uma concentração de cerca de 1 M e um valor de pH igual a 10.

[089] De acordo com uma outra forma de realização particular, a solução de lise prevista na presente invenção contém fosfato de sódio dibásico com uma concentração de cerca de 0,3 M, cerca de 2% de SDS, ácido etilenodiamina-

tetracético (EDTA) com uma concentração de cerca de 0,05 M e um valor de pH igual 11,45.

[090] De acordo com a solução utilizada e com o tipo de amostra, as preparações ficam a incubar na solução de lise entre 0,5 e 120 minutos, de preferência entre 1 e 35 minutos e mais preferencialmente durante cerca de 5 minutos; a temperatura está compreendida entre 1°C e 45°C, de preferência entre 15°C e 40°C e mais preferencialmente entre 22°C e 37°C. De acordo com uma forma de realização particular, a incubação decorre a uma temperatura de 22°C. De acordo com uma outra forma de realização particular, a incubação decorre a uma temperatura de 37°C.

[091] Logo que a solução de lise tenha sido acrescentada à cultura bacteriana que esteve previamente a incubar na presença de um antibiótico que atua sobre a parede celular, detecta-se a presença do nucleóide bacteriano no meio de cultura [passo iii)]. Conforme descrito para o primeiro método da invenção, a avaliação da presença do nucleóide bacteriano no meio de cultura pode ser feita por microscopia ou por outro método físico ou químico alternativo que sirva para detectar o ADN libertado pelo microrganismo no meio de cultura, incluindo, sem qualquer limitação, os métodos de eletroforese, anticorpos, espectrometria, reação em cadeia com polimerase, técnicas de hibridação, micromatrizes, microfluídica, nanopartículas, nanocristais, etc.. Estes métodos são perfeitamente conhecidos na especialidade e a sua execução prática é um conhecimento vulgar detido pelos especialistas na matéria.

[092] No entanto, de acordo com uma forma de realização particular, a detecção do nucleóide bacteriano efetua-se por microscopia, sendo para isso necessário imobilizar uma amostra retirada da cultura resultante do passo i) [isto é, após a exposição da cultura bacteriana à ação do antibiótico], por exemplo, sobre um suporte, tal como uma lamela, Neste caso, o passo ii) do segundo método da invenção, isto é, a adição da solução de lise, que apenas vai afetar as bactérias cujas paredes celulares tenham sido afetadas pelo antibiótico, pode ser realizada antes ou depois da imobilização das bactérias sobre o referido suporte. Assim sendo, de acordo com uma

forma de realização particular, o segundo método da invenção compreende também o passo que consiste em imobilizar uma amostra retirada da cultura sobre um suporte antes ou depois do passo (ii). Os métodos e as técnicas existentes na especialidade para imobilizar amostras em suporte, e também para a sua preparação, foram já descritos anteriormente a propósito do primeiro método da invenção e são aplicáveis ao segundo método da invenção.

[093] Se o tratamento com a solução lise for feito após a imobilização de uma amostra retirada da cultura resultante do passo i), sobre o suporte, tal como uma lamela, mergulha-se a referida lamela numa posição horizontal num recipiente que contenha a solução de lise. Após o tratamento com a solução de lise (descrito *supra*) as preparações podem ser lavadas para remoção dos resíduos desta solução. Para tal, os suportes são introduzidos numa solução de lavagem que é tão suave quanto possível, evitando-se agentes quelantes ou detergentes; a título ilustrativo, os suportes podem ser mergulhados numa posição horizontal num reservatório que contenha uma determinada quantidade de água destilada ou de uma solução tampão ou de soro fisiológico, durante um intervalo de tempo compreendido entre 1 e 60 minutos.

[094] Depois disso, a amostra é desidratada. Para tal, é possível utilizar soluções alcoólicas com concentrações crescentes. A título de exemplo, as lamelas são retiradas e depois mergulhadas em reservatórios contendo soluções etanólicas com concentrações crescentes, entre 5% e 100%, durante um período compreendido entre 30 segundos e 60 minutos de cada vez, ficando depois as preparações a secar ao ar. A temperatura das soluções alcoólicas pode estar compreendida entre -20°C e a temperatura ambiente. Pode ser preferível utilizar soluções alcoólicas a -20°C para melhorar a precipitação do ADN, durante 5 minutos de cada vez. Como alternativas às incubações em soluções etanólicas com uma série de concentrações, as preparações podem ser desidratadas por incubação em soluções alcoólicas diferentes, por exemplo de metanol, ou podem apenas secar ao ar ou secar numa

estufa.

[095] Finalmente, no passo iii) do segundo método da invenção determina-se a presença do nucleóide bacteriano no meio de cultura, ou sobre o suporte, se a amostra tiver sido imobilizada.

[096] Na presente invenção, subentende-se que o termo "nuclóide bacteriano" designa a região que contém o ADN no citoplasma das células bacterianas. Os dados experimentais sugerem que esse nucleóide é feito essencialmente de ADN (60%), com proporções pequenas de ARN e proteínas. Estes dois últimos componentes atuam como ARN mensageiro e como proteínas reguladoras do genoma. No domínio da especialidade, o nucleóide bacteriano é conhecido também pela designação de "região nuclear" ou "corpo nuclear". As técnicas para observar a presença de fragmentos de ADN extracelular no meio de cultura, descritas *supra*, também podem ser utilizadas para observar o nucleóide bacteriano, conforme previsto no segundo método da invenção

[097] Se a técnica escolhida para a determinação da presença do nucleóide bacteriano for a microscopia, então é conveniente, conforme descrito antes no primeiro método da invenção, estabilizar e fixar firmemente os fragmentos de ADN às lamelas, uma vez que podem desprender-se.

[098] Logo que as amostras tenham sido tratadas e depois de os fragmentos de ADN terem sido estabilizados e perfeitamente fixados às lamelas, as amostras podem ser coloradas e é possível avaliar a integridade da parede celular dos microrganismos. Assim sendo, de acordo com uma forma de realização particular do segundo método da invenção, a observação da presença do nucleóide bacteriano no meio de cultura é feita por meio de coloração. É possível obter uma imagem de elevada qualidade e com uma elevada consistência na avaliação de resultados, escolhendo convenientemente as condições de coloração. As diferentes técnicas de coloração e também os corantes que é possível utilizar para observar o ADN por microscopia foram já descritos antes na presente memória descritiva a propósito do primeiro

método da invenção e são aplicáveis ao segundo método da invenção.

[099] Assim sendo, de acordo com uma forma de realização particular, efetua-se a observação da presença do nucleóide bacteriano no meio de cultura por coloração que é feita, de acordo com uma forma de realização mais particular, recorrendo a fluorocromos que são selecionados, de acordo com uma outra forma de realização ainda mais particular, entre o conjunto constituído por Hoechst 33342, Hoechst 33258, DAPI, cromomicina A3, mitramicina, brometo de etídio, fluorocromo laranja de acridina, fluorocromo laranja de tiazol, 7-AAD (7-aminoactinomicina D), derivados de cianina e as variantes dos fluorocromos TOTO, YOYO, BOBO, POPO, JOJO, LOLO, SYTOX, PO-PRO, BO-PRO, YO-PRO, TO-PRO, JO-PRO, PO-PRO e LO-PRO, etc.

[0100] A execução prática do segundo método da invenção implica, num primeiro passo, acrescentar à cultura bacteriana um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana. No segundo método da invenção, é possível utilizar todos os antibióticos descritos antes no primeiro método da invenção. Assim sendo de acordo com uma forma de realização particular, o antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana é selecionado entre o conjunto constituído por um antibiótico β -lactama (incluindo, mas sem qualquer limitação, penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbacefem, carbapenem, monobactamas e inibidores de β -lactamase, tais como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, etc.), uma isoniazida, uma etionamida, um etambutol, uma ciclosserina e um antibiótico glicopeptídico (incluindo, mas sem qualquer limitação, vancomicina ou teicoplanina).

Aplicações dos métodos da invenção

[0101] Conforme descrito *supra*, a aplicação prática do primeiro e do segundo métodos da invenção consiste em determinar, de uma maneira rápida e fiável, se uma bactéria é sensível ou resistente a um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana. A avaliação da integridade da parede bacteriana por meio de quaisquer dos métodos da invenção descritos *supra* na presente memória descritiva é suficiente para tal fim.

[0102] Assim sendo, de acordo com um outro dos seus aspectos, a presente invenção diz respeito a um método para determinar a sensibilidade de uma bactéria a um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana, o qual consiste em avaliar a integridade da parede celular da referida bactéria por meio de qualquer dos métodos da invenção, considerando-se então, no caso de a integridade da parede celular da bactéria ter sido danificada, que a bactéria é sensível ao antibiótico, Pelo contrário, conforme é sabido por um especialista na matéria, se a integridade da parede celular não tiver sido danificada e se tiver permanecido intacta (não há libertação de fragmentos de ADN extracelular ou de nucleóides para o meio de cultura), então a bactéria não é sensível ao antibiótico, a bactéria pode ser uma bactéria resistente ou uma bactéria considerada dormente ou tolerante. Nenhum destes dois tipos de bactérias é afetado pelo antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana, mas diferem na medida em que as bactérias resistentes têm mutações de ADN que fazem com que a sua resistência aos antibióticos seja permanente, ao passo que as bactérias dormentes não sofrem mutações do ADN que lhes confirmam resistência, ficando então num estado funcional reversível. Assim sendo, outras aplicações dos métodos da invenção consistem em detectar bactérias resistentes ou bactérias dormentes na amostra.

[0103] Assim sendo, de acordo com um outro dos seus aspectos, a invenção diz respeito a um método para identificar uma bactéria dormente ou uma bactéria tolerante a um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana na cultura que contém as bactérias sensíveis, o qual consiste em avaliar a integridade da parede celular das bactérias presentes na referida cultura por meio do segundo método da invenção, sendo a bactéria cuja integridade da parede celular tenha sido danificada identificada como uma bactéria dormente ou uma bactéria tolerante.

[0104] Outra aplicação prática dos métodos da invenção diz respeito à prescrição de uma terapia com antibióticos, personalizada para um indivíduo que padeça de uma doença bacteriana, uma vez que os métodos da presente invenção permitem

determinar se a bactéria causadora da doença bacteriana é sensível ou resistente a um antibiótico específico. Se após a aplicação de qualquer dos métodos da invenção a bactéria causadora da doença bacteriana se concluir que esta é sensível ao antibiótico experimentado, o médico pode tomar a decisão de administrar uma terapia à base do referido antibiótico ao indivíduo que padeça da referida doença bacteriana. Pelo contrário, se a bactéria causadora da doença bacteriana for resistente a antibiótico experimentado, então o médico irá escolher um tratamento que não tenha por base o referido antibiótico.

[0105] Assim sendo, de acordo com um outro dos seus aspectos, a presente invenção diz respeito a um método para prescrever uma terapia com antibióticos, personalizada para um indivíduo que padeça de uma doença bacteriana, o qual compreende os passos seguintes:

- i) isolar a bactéria causadora da doença bacteriana a partir de uma amostra retirada do referido indivíduo e
- ii) avaliar a integridade da parede celular da referida bactéria por meio de qualquer dos métodos da invenção,

concluindo-se que no caso de a integridade da parede celular da referida bactéria ter sido danificada, então o referido indivíduo pode receber uma terapia à base de antibióticos que atuem sobre a parede celular.

[0106] Na presente invenção o termo "indivíduo" serve para designar um membro de qualquer espécie animal, incluindo, mas sem nenhuma limitação, mamíferos, em particular bovinos (vacas, toiros, bois, iaques, etc.), ovinos (ovelhas, etc.), porcos (porcos, javalis, etc.), caprinos (cabras, etc.), equinos e gado cavalar (cavalos, éguas, zebras, etc.), camelídeos (camelos, lamas, alpacas, etc.), coelhos, lebres, bisontes, búfalos, veados, renas, caribus, cães, gatos, ratos, primatas não humanos (chimpanzés, gorilas, orangotangos, macacos, babuínos, etc.). Em particular, um mamífero é preferencialmente um ser humano de qualquer género, idade ou raça. Os termos "indivíduo" ou "sujeito" são sinónimos e podem ser utilizados indiferentemente

ao longo da presente memória descritiva.

[0107] Na presente invenção, subentende-se que uma "doença bacteriana" é qualquer doença resultante de uma infecção bacteriana num indivíduo. Como exemplos de doenças bacterianas refere-se, sem nenhuma limitação, as doenças provocadas pela infecção de bactérias dos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Aerobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Serratia*, *Providencia*, *Chromobacterium*, *Brucella*, *Yersinia*, *Hemophilus* e *Bordetella*.

[0108] O primeiro passo do método para prescrever uma terapia com antibióticos, personalizada para um indivíduo que padeça de uma doença bacteriana, consiste em isolar a bactéria causadora da referida doença bacteriana a partir de uma amostra retirada do referido indivíduo

[0109] Conforme é sabido pelos especialistas na matéria, uma boa seleção, colheita e transporte da amostra e também um bom processamento da amostra para o correto isolamento dos microrganismos são essenciais para se garantir bons resultados. Por exemplo, a amostra tem de ser representativa do processo infeccioso e tem de ser retirada do local anatómico correto, tem de ser colhida em quantidade suficiente para permitir uma análise adequada, durante a colheita têm de ser utilizados dispositivos esterilizados, etc.. É possível encontrar mais informação sobre métodos e materiais utilizados na colheita de amostras na obra de Rotger, R. (editor), 1997 (mencionada *supra*).

[0110] Além disso, os antibióticos que atuam sobre a parede celular e podem ser administrados ao indivíduo, em função das conclusões obtidas, foram já descritos antes na presente memória descritiva.

[0111] Um especialista na matéria sabe que os métodos da invenção também podem ser utilizados para identificar compostos antibióticos que atuem sobre a parede

celular. Assim sendo, de acordo com um outros dos seus aspectos, a invenção diz respeito a um método para identificar um composto que atue sobre a parede celular bacteriana, o qual compreende os passos seguintes:

- i) colocar em contato com o composto candidato uma cultura que contenha uma bactéria sensível a um antibiótico que atue sobre a parede celular e
- ii) avaliar a integridade da parede celular da referida bactéria por meio de qualquer um dos métodos da invenção,

em que no caso de a integridade da parede celular da referida bactéria ter sido danificada, então o composto candidato é um composto que atua sobre a parede celular bacteriana.

[0112] Na presente invenção subentende-se que um "composto que atua sobre a parede celular bacteriana" é um composto que interfere em qualquer dos passos de síntese da parede celular bacteriana ou que afeta a sua estrutura.

[0113] O primeiro passo do método para identificar os compostos que atuam sobre a parede bacteriana consiste em colocar o composto candidato em contato com uma cultura da bactéria sensível aos antibióticos que atuam sobre a parede celular. Como exemplos de bactérias sensíveis aos antibióticos que atuam sobre a parede celular refere-se, mas sem qualquer limitação, a estirpe de *E. coli* sensível à amoxicilina, a estirpe de *Enterococcus faecalis* sensível à ampicilina, a estirpe de *Acinetobacter baumannii* sensível ao iminepen, a estirpe de *E.coli* sensível à ceftazidima, etc. Nas publicações da especialidade é possível encontrar mais informação respeitante à sensibilidade de bactérias aos antibióticos β -lactamas (June 2010 CLSI Guidelines).

Solução de lise da invenção

[0114] A presente invenção tem por base o facto de uma das consequências da atividade que têm sobre as bactérias os antibióticos que atuam sobre a parede celular ser a libertação de fragmentos e ADN extracelular no meio de cultura. Além disso, quando a cultura bacteriana é uma cultura mista ou contaminada, isto é, existe uma mistura de células sensíveis ou resistentes, a observação dos fragmentos de ADN

extracelular não pode ser considerada muito conveniente como critério estrito de discriminação, uma vez que a morfologia das bactérias, apesar da libertação dos fragmentos de ADN extracelular, não é alterada pela ação do antibiótico, isto é, tanto as bactérias sensíveis como as bactérias resistentes ao antibiótico apresentam uma parede celular aparentemente intacta. Para a resolução deste problema, os inventores conceberam uma solução de lise que apenas afeta as bactérias cujas paredes celulares tenham sido previamente danificadas pela ação de um antibiótico que atue sobre a parede celular.

[0115] Posto isto, de acordo com um outro dos seus aspectos, a invenção diz respeito a uma solução de lise, doravante designada por solução de lise da invenção, caracterizada pelo facto de afetar apenas as bactérias que tenham a parede bacteriana danificada pela ação de um antibiótico, sendo constituída por um tampão e tendo um valor de pH compreendido entre 3 e 11,5.

[0116] A solução de lise que afeta especificamente bactérias que tenham a parede celular danificada pelo antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana é constituída basicamente por uma solução tampão que tem um valor de pH entre 3 e 11,5, mas que pode compreender também, conforme descrito nos aspectos da invenção precedentes, outros componentes, incluindo, mas sem qualquer limitação, detergentes iónicos, detergentes não iónicos, sais, etc., em diferentes proporções.

[0117] Deste modo, de acordo com uma forma de realização particular, a solução de lise da invenção compreende também até 3% de um detergente iónico ou de um detergente não iónico. De acordo com uma forma de realização concreta, o referido detergente iónico é um detergente selecionado entre o conjunto constituído por dodecilsulfato de sódio, sulfonato de alquilbenzeno, laurisarcosina, hidratos de sais do ácido glicólico e suas misturas. De acordo com uma outra forma de realização concreta, o referido detergente não iónico é selecionado entre o conjunto constituído por t-octilfenoxipolietoxietanol, N,N-Bis(3-D-gluconamidopropil)colamida, Brij(r) 35 P, N-decanoíl-N-metilglutamina, digitonina, dodecanoíl-N-metilglutamida, heptanoíl-N-

metilglutamida, octilfenoxipoli(etilenoxi)etanol ramificado, N-nonanoíl-N-metilglucamina, Nonidet P 40, N-octanoíl-N-metilglutamina, solução de Span 20 e polissorbato 20. De acordo com uma outra forma de realização concreta, a solução de lise compreende também um sal com uma concentração até 3M, por exemplo, carbonatos, cloretos, fosfatos, nitratos, nitritos, sulfatos, citratos, carboxilatos (acetatos, formiatos, salicilatos, etc.); de acordo com uma forma de realização particular, a solução de lise contém cloreto de sódio (NaCl).

[0118] De acordo com uma forma de realização particular, a solução de lise prevista pela presente invenção contém Tris numa concentração entre 0,001 M e 2 M, até 3% de SDS e uma concentração de NaCl até 3 M, com um valor de pH compreendido entre 3 e 11,5. No entanto, um especialista na matéria sabe que estes compostos podem ser substituídos por outros compostos equivalentes; por exemplo, o SDS pode ser substituído por Triton X-100 numa concentração até 10%.

[0119] De acordo com uma outra forma de realização particular, a solução de lise prevista pela presente invenção compreende (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) com uma concentração até cerca de 0,2 M, cerca de 0,025% de SDS, cloreto de sódio numa concentração de cerca de 0,5 M ou 0,05 M, com um valor de pH igual a 10; neste caso, o SDS pode ser substituído por Triton X-100 numa concentração de cerca de 5%.

[0120] De acordo com uma outra forma de realização particular, a solução de lise prevista na presente invenção compreende (hidroximetil)-1,3-propanodiol numa concentração de cerca de 0,2 M, Triton X-100 numa concentração de cerca de 5%, cloreto de sódio numa concentração de cerca de 1 M e um valor de pH igual a 10.

[0121] De acordo com uma outra forma de realização particular, a solução de lise prevista na presente invenção compreende fosfato de sódio dibásico aproximadamente 0,3 M, cerca de 2% de SDS, e ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) aproximadamente 0,05 M e com um valor de pH igual a 11,45.

[0122] É possível encontrar mais pormenores e explicações respeitantes às

diferentes formas de realização particulares da solução de lise da invenção no texto descritivo do segundo método da invenção.

[0123] De acordo com um outro aspecto, a invenção diz respeito à utilização da solução de lise da invenção para avaliar a parede celular bacteriana. A informação respeitante ao modo como pode ser utilizada a solução de lise da invenção para avaliar a parede celular bacteriana pode ser encontrada no texto descritivo do primeiro e segundo métodos da invenção.

Estojo da invenção

[0124] A execução prática dos métodos da invenção exige diversos componentes que podem ser fornecidos em conjunto, sob a forma de uma embalagem ou estojo, doravante estojo da invenção. Os componentes úteis para a execução prática dos métodos da invenção são, mas sem qualquer limitação, a solução tampão, a solução de lise, corantes, materiais estéreis para a colheita de amostras (mechas absorventes, esfregaços, pinças, etc.), lamelas e coberturas para lamelas, água destilada, alcoóis (etanol), etc.. Além disso, o estojo da invenção pode conter instruções ou indicações que indiquem ao especialista na matéria como executar os métodos da invenção.

[0125] Assim sendo, de acordo com um outro dos seus aspectos, a invenção diz respeito a um estojo que compreende a solução de lise da invenção.

[0126] Os exemplos seguintes servem apenas para ilustrar a invenção e não são limitativos.

Exemplos

Materiais e Métodos

Materiais e equipamentos necessários

Microscópio de fluorescência (é recomendada uma objetiva de imersão)

Frigorífico a 4°C

Estufa a 37°C

Estufa ou placa a 80°C (facultativo)

Banho de incubação a 37°C

Luvras de plástico

Tampa de vidro para cobrir lamelas (18x18 mm, 22x22 mm ou 24x60 mm)

Micropipetas

4 caixas para incubações horizontais

Água destilada

Etanol a 70%, 90%, 100%

Preparação de uma amostra por lamela

1) Colocar a solução de lise num recipiente tapado de incubação horizontal numa estufa a 37°C.

2) Diluir a amostra dos microrganismos num meio de cultura ou em PBS até um valor de concentração entre 5-10 milhões por mililitro.

Preparação do microgel de agarose

3) Introduzir o tubo de Eppendorf, com a agarose solidificada, na massa flutuante, deixando-o ficar ao nível da tampa de cobertura, e permitindo que fique a flutuar durante 5 minutos em água a 90-100°C até a gelose fundir. Em alternativa, a agarose pode ser fundida num forno de micro-ondas.

4) Transferir o tubo de Eppendorf com a massa flutuante para um banho termostático a 37°C e deixá-lo aí durante 5 minutos, até a temperatura ficar equilibrada.

5) Acrescentar 60 µL da amostra de microrganismos ao conteúdo do tubo de Eppendorf e reconstituir a suspensão com a micropipeta.

6) Colocar uma lamela, previamente tratada, sobre uma superfície fria a 4°C (por exemplo, uma folha de metal ou vidro).

7) Logo que a lamela esteja fria, depositar a suspensão de microrganismos com agarose e colocar uma tampa de vidro de cobertura, evitando a formação de bolhas de ar. Recomenda-se a deposição de uma gota de 12, 20 ou 50 µL para uma tampa de cobertura de 18x18 milímetros, 22x22 milímetros ou 24x60 milímetros, respectivamente.

8) Introduzir a folha fria com a lamela no frigorífico e deixar a amostra solidificar durante 5 minutos.

Processamento das amostras

9) Retirar a tampa de cobertura, fazendo-a deslizar suavemente, utilizando luvas, e introduzir imediatamente a lamela, em posição horizontal, no recipiente que contém a solução de lise, tapando e deixando ficar a incubar durante 5 minutos na estufa ou no banho a 37°C.

10) Levantar a lamela com a ajuda de uma lanceta, utilizando luvas. Levantar a lamela em posição horizontal e depositá-la horizontalmente numa caixa que contenha água destilada ou solução tampão abundante, para lavar a solução de lise. Deixar a incubar durante 5 minutos.

11) Introduzir a lamela horizontalmente numa caixa contendo etanol a 70% (3 minutos), introduzi-la depois numa outra caixa com etanol a 90% (3 minutos) e finalmente numa caixa com etanol a 100% (3 minutos), a -20°C.

12) Deixá-la a secar ao ar e mantê-la a incubar num forno de micro-ondas a 500-1000 W durante 1-10 minutos ou, na ausência deste equipamento, numa estufa a 80°C durante pelo menos 1 hora, ou de um dia para o outro. Depois de secas, as lamelas assim preparadas podem ser guardadas em caixas de conservação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante meses.

Coloração de amostras para observação em microscópio de fluorescência

[0127] Se houver disponibilidade de filtros de fluorescência, as amostras podem ser coloradas com fluorocromos específicos do ADN dos tipos EvaGreen (verde) ou GelRed (vermelho). Os fluorocromos da família SYBR, concretamente o fluorocromo 'SYBR Gold', permitem uma boa resolução com alguma fotoestabilidade.

Armazenagem e estabilidade

[0128] Armazenar a temperatura ambiente.

[0129] Prazo de validade: os reagentes e materiais são estáveis durante um período pelo menos igual há 6 meses. Recomenda-se que a solução de lise seja

guardada numa posição vertical e bem fechada.

Determinação da integridade da parede celular

[0130] Diluiu-se uma alíquota de cada amostra até se obter uma concentração de 5-10 milhões de microrganismos /mL em meio líquido de Mueller-Hinton, tendo ficado a incubar depois com o antibiótico no meio líquido de Mueller-Hinton. Por outro lado, foram colocados tubos de ensaio de microcentrifugação de 0,5 mL, contendo alíquotas solidificadas de agarose de baixo ponto de fusão, num banho-maria a uma temperatura de 90°C-100°C durante cerca de 5 minutos para fundir totalmente a agarose, tendo sido colocados depois num banho-maria a 37°C. A seguir, acrescentou-se 25 µL da amostra diluída aos referidos tubos de ensaio e misturou-se com a agarose fundida. Com uma pipeta aplicou-se uma alíquota de 20 µL da mistura de amostra e agarose sobre uma lamela que havia sido previamente recoberta (*v.g.*, com uma película de agarote) e tapou-se a amostra com uma tampa de cobertura de lamela de 22x22 mm Colocou-se a lamela, sobre um prato frio, num frigorífico (4°C) durante 5 minutos para permitir que a agarose formasse um microgel com as células intactas nele aprisionadas. Retirou-se cuidadosamente a tampa de cobertura da lamela e mergulhou-se imediatamente a lamela, numa posição horizontal, numa solução de lise durante 5 minutos a 37°C para as bactérias Gram+ (gram. positivas) e a 22°C para as bactérias Gram- (gram. negativas). Lavou-se a lamela horizontalmente num tabuleiro com água destilada abundante durante 3 minutos, desidratou-se por incubação, em posição horizontal, em etanol frio (-20°C) em concentrações crescentes (70%, 90% e 100%) durante 3 minutos para cada concentração e depois se deixou secar ao ar numa estufa. Manteve-se a lamela seca a incubar num forno de micro-ondas a 750 W durante 4 minutos e colorou-se o ADN com 25 µL de 'SYBR Gold' (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluído a 1:400 em tampão TBE (Tris-borato 0,09 M, EDTA 0,002 M, pH 7,5) durante 2 minutos ao abrigo da luz, com uma tampa de cobertura de vidro para a lamela. Após uma lavagem rápida em tampão fosfato a pH 6,88 (Merck, Darmstadt, Alemanha) aplicou-se uma tampa de cobertura

de lamela de 24x60 mm, tendo sido depois as lamelas observadas por microscopia de fluorescência.

Microscopia de fluorescência e análise das imagens digitais

[0131] As imagens foram observadas num microscópio de epifluorescência (Nikon E800), com uma objetiva 100x e com filtros de fluorescência adequados para 'FITC-SYBR Gold' (excitação a 465 nm, emissão a 515-555 nm), 'PI-Cy3' (excitação a 540/25 nm, emissão a 605/55 nm) e 'DAPI' (excitação a 340-380 nm, emissão a 435-485 nm). Na falta de resposta à experiência com ampicilina, as imagens foram capturadas com uma câmara CCD de elevada sensibilidade (KX32ME, Apogee Instruments, Roseville, CA, EUA). Foram obtidos grupos de imagens digitais de 16 bit que foram guardadas como ficheiros .tiff. Para a análise das imagens recorreu-se a um procedimento de comando macro no programa informático Visilog 5.1 (Noesis, Gif sur Yvette, França). Isto permitiu determinar o limite crítico, subtraindo o sinal espontâneo e medindo o tamanho da largura média do halo dos nucleóides em μm , demarcado entre o contorno periférico do nucleóide e o limite exterior do corpo celular. No caso dos corpos celulares não reconhecidos, considerou-se o centróide do nucleóide como sendo o ponto de referência interno para a medição da largura do halo do nucleóide difuso.

Exemplo 1

Confirmação de que a técnica funciona: libertação do nucleóide bacteriano e de resíduos da parede difusa e/ou produtos bacterianos em bactérias sensíveis a um antibiótico que atue sobre a parede bacteriana

[0132] Foram expostas três estirpes diferentes de *Escherichia coli* ao antibiótico β -lactama, a amoxicilina, em conjunto com o inibidor de β -lactamase, o ácido clavulânico, tendo sido depois tratadas por meio da técnica que permite avaliar a integridade da parede celular, de acordo com a presente invenção. As bactérias que estiveram a desenvolver-se em meio líquido de Mueller-Hinton ficaram a incubar com o antibiótico em meio líquido de Mueller-Hinton até à fase de crescimento exponencial a 37°C, sob agitação, durante 40 minutos. As doses do antibiótico foram escolhidas

em conformidade com os pontos críticos indicados por 'Clinical and Laboratory Standards Institute' (CLSI). De acordo com as suas recomendações, considera-se que uma estirpe é sensível quando a correspondente concentração inibidora mínima (CIM) é $\leq 8/4$ (amoxicilina: 8 µg/mL e ácido clavulânico: 4 µg/mL), e é considerada resistente quando o valor da CIM é $\geq 32/16$ (amoxicilina: 32 µg/mL e ácido clavulânico: 16 µg/mL). De acordo com os dados de difusão no disco, uma das estirpes é uma estirpe sensível, uma outra estirpe é uma estirpe com uma sensibilidade intermédia e a estirpe restante é uma estirpe resistente.

[0133] Os resultados estão ilustrados na figura 1. Após a aplicação de uma dose de 8/4, apenas as bactérias da estirpe sensível foram destruídas por lise, mostrando os nucleóides (a'). Após a aplicação de uma dose de 32/16, a estirpe sensível e a estirpe com uma sensibilidade intermédia foram destruídas por lise (a'' e b''), ao passo que a estirpe resistente não foi destruída por lise (c''). No entanto, são visíveis alguns danos na parede celular em algumas células isoladas. Quando o antibiótico é eficaz, para além da libertação e da difusão dos nucleóides, observa-se também uma formação secundária microgranular e fibrilar, homogénea e difusa, de fragmentos de ADN extracelular provenientes das células.

Exemplo 2

Avaliação da sensibilidade ou da resistência ao antibiótico β -lactama em diversas estirpes de *E. coli* isoladas e provenientes de um hospital

[0134] Após a observação dos resultados da experiência anterior (exemplo 1), efetuou-se o estudo de 11 estirpes diferentes de *E. coli* isoladas no serviço de microbiologia. Após o seu crescimento num prato com meio de Mueller-Hinton durante 24 horas, foram expostas ao antibiótico amoxicilina em conjunto com ácido clavulânico em meio líquido de Mueller-Hinton durante 1 hora, após o que foram tratadas por meio da técnica para a avaliação da integridade da parede celular, em conformidade com a presente invenção. Tal como no exemplo 1, as doses foram de 0, 8/4 e 32/16 (amoxicilina/ácido clavulânico).

De acordo com o protocolo da invenção, verifica-se o seguinte:

- houve 3 estirpes que apresentaram uma total destruição por lise da parede e uma intensa formação secundária de fragmentos de ADN extracelular, mesmo com uma dose pequena (8/4), tendo estas estirpes sido classificadas como estirpes sensíveis.
- houve 5 estirpes que apenas apresentaram uma total destruição por lise da parede e uma intensa formação secundária de fragmentos de ADN extracelular com uma dose elevada (32/16), tendo estas estirpes sido consideradas como estirpes com uma sensibilidade intermédia.
- houve 2 estirpes que apresentaram células não destruídas por lise, conjuntamente com outras células moderadamente destruídas por lise, com uma formação secundária bastante tênue ou até mesmo uma ausência de formação secundária de fragmentos de ADN extracelular, com uma dose elevada. Estas estirpes foram classificadas como estirpes resistentes.

[0135] Os resultados da técnica foram consistentes com os proporcionados pelo Laboratório de Microbiologia.

[0136] A conclusão prática da experiência é a de que as estirpes sensíveis podem ser claramente distinguidas das restantes utilizando uma dose única, concretamente uma dose pequena (8/4). Isto pode simplificar imenso o estudo exaustivo de diversas estirpes, uma vez que, sob o ponto de vista clínico, o que é importante para se tomar uma decisão terapêutica é a distinção entre estirpes "sensíveis" e estirpes "não sensíveis". No caso de uma estirpe com sensibilidade intermédia a um antibiótico específico, tal antibiótico não deve ser administrado e deverão ser utilizados outros antibióticos alternativos aos quais a estirpe seja totalmente sensível.

Exemplo 3

Determinação do período mínimo de incubação com um antibiótico β -lactama que permita detectar um efeito sobre a parede da estirpe *E. coli* sensível e da que tem uma sensibilidade intermédia. Estudo de bactérias provenientes de uma cultura em

disco ou de uma cultura em meio líquido

[0137] Uma estirpe sensível, uma estirpe com sensibilidade intermédia e uma outra estirpe resistente de *E. coli* foram expostas ao antibiótico amoxicilina conjuntamente com ácido clavulânico em meio líquido de Mueller-Hinton, tendo sido depois tratadas por meio da técnica para avaliar a integridade da parede celular, de acordo com a presente invenção. As doses (amoxicilina/ácido clavulânico) foram: 8/4 (fraca) e 32/16 (elevada). Os períodos de incubação com o antibiótico foram de 5, 10, 20, 30, 40, 60 e 75 minutos.

A) Foram observados os efeitos seguintes, no caso em que as bactérias provieram de uma cultura em prato durante 24 horas:

- no caso da estirpe sensível, começou a ser observado ao fim de 20 minutos um efeito bastante ténue para a dose elevada (32/16) com alguma formação secundária de fragmentos de ADN extracelular e uma ténue lise. Este efeito ténue foi observado 40 minutos após a aplicação da dose fraca (8/4), tendo no entanto sido ligeiramente superior com a dose elevada. O efeito torna-se máximo com uma formação secundária ténue de fragmentos de ADN extracelular e ocorre a destruição por lise de praticamente todas as células decorridos 60 minutos após a aplicação da dose fraca, havendo uma formação secundária e uma lise intensas após a aplicação da dose elevada;

- a estirpe com sensibilidade intermédia começou a apresentar um efeito nítido muito mais tarde, 60 minutos, do que a estirpe sensível e apenas depois da aplicação da dose elevada (32/16). Este efeito foi mais evidente ao fim de 75 minutos;

- a estirpe resistente não revelou mesmo nenhum efeito, embora ao fim de 75 minutos após a aplicação da dose elevada (32/16) algumas células isoladas se apresentassem moderadamente destruídas por lise, tal como ilustrado na figura 1c''.

B) Foram observados os efeitos seguintes, no caso em que as bactérias provieram de uma cultura em meio líquido, em fase de crescimento exponencial:

- com a estirpe sensível começou a ser observado um efeito ao fim de 10 minutos. Este efeito foi bastante ténue com a dose fraca (8/4) e mais notório com a dose elevada (32/16). A intensidade do efeito aumentou progressivamente, sendo o efeito ao fim de 30 minutos bastante semelhante ao observado ao fim de 30 minutos com as bactérias provenientes de uma cultura em prato;

- a estirpe com sensibilidade intermédia começou a apresentar um efeito nítido muito mais tarde do que a estirpe sensível, decorridos 30-40 minutos e apenas depois da aplicação da dose elevada (32/16). Este efeito foi mais evidente ao fim de 60 minutos;

- a estirpe resistente não apresentou mesmo nenhum efeito, embora decorridos 60 minutos após a aplicação da dose elevada dose (32/16), algumas células isoladas se apresentassem moderadamente destruídas por lise, tal como ilustrado na figura 1c”.

[0138] Em conclusão:

- 1) o estado de desenvolvimento das bactérias influencia a sensibilidade ao antibiótico. É perfeitamente sabido que em células que não estejam em crescimento, que se encontrem em fase estacionária, há uma redução considerável da sua sensibilidade aos antibióticos β -lactama;

- 2) sob o ponto de vista prático, com a finalidade de permitir distinguir com segurança entre estirpes de *E. coli* sensíveis e de outro tipo, é suficiente mantê-las a incubar com o antibiótico durante 30 minutos, no caso de se encontrarem em fase de crescimento exponencial (cultura em meio líquido recente), ou durante 40-60 minutos, no caso de serem provenientes de uma cultura em prato durante 24 horas. Se o prato for antigo ou se a cultura em meio líquido tiver alcançado a fase exponencial, o período de incubação da amostra de bactérias com o antibiótico num meio líquido pode ser prolongado durante várias horas. Ao fazer-se o estudo de amostras clínicas, é recomendável testar simultaneamente uma estirpe sensível, uma estirpe com uma sensibilidade intermédia e uma estirpe resistente, como contraprova da atividade do

antibiótico e da eficiência da técnica.

Exemplo 4

Determinação da sensibilidade ou da resistência de diferentes germes Gram+ e Gram- a diferentes antibióticos β -lactama (penicilinas, cefalosporina e carbapenem)

[0139] Diferentes estirpes bacterianas que se desenvolveram num prato contendo meio de Mueller-Hinton durante 24 horas foram depois expostas a um antibiótico β -lactama durante 60 minutos em meio líquido de Mueller-Hinton a 37°C, sob agitação, e finalmente foram tratadas por meio da técnica para avaliar a integridade da parede celular, de acordo com a presente invenção.

As estirpes e os antibióticos utilizados foram:

Gram+

Enterococcus faecalis. Estirpe resistente à ampicilina (CIM = 4) e resistente à benzilpenicilina (CIM > 32).

Enterococcus faecium. Estirpe resistente à ampicilina (CIM > 32) e resistente à benzilpenicilina (CIM > 32).

Gram-

Acinetobacter baumannii. Estirpe resistente ao imipenem (CIM > 32) e resistente à ceftazidima (CIM > 32).

Acinetobacter baumannii. Estirpe sensível ao imipenem (CIM = 0,38) e com uma sensibilidade intermédia à ceftazidima (CIM = 12).

Escherichia coli. Estirpe sensível à ceftazidima (CIM = 1) com uma sensibilidade intermédia à ampicilina (CIM = 16).

Escherichia coli. Estirpe resistente à ampicilina (CIM > 256) e resistente à ceftazidima (CIM = 32).

[0140] As doses de antibiótico aplicadas foram de 0, os valores de CIM foram determinados no Laboratório de Microbiologia por meio da técnica de microdiluição e/ou do teste E e os valores correspondentes aos pontos críticos de sensibilidade e resistência foram indicados por 'Clinical and Laboratory Standards Institute' (CLSI),

para cada estirpe. Utilizou-se também uma dose 10 vezes superior à CIM.

Os pontos críticos dos antibióticos variam para cada estirpe:

Enterococcus. ampicilina ≤ 8 (sensível) ≥ 16 (resistente)

Acinetobacter. ceftazidima ≤ 8 (sensível) ≥ 32 (resistente)

A) imipenem ≤ 4 (sensível) ≥ 16 (resistente)

E. coli. ampicilina ≤ 8 (sensível) ≥ 32 (resistente)

B) ceftazidima ≤ 8 (sensível) ≥ 32 (resistente)

Resultados

Gram+

Enterococcus faecalis. Estirpe sensível à ampicilina (CIM = 4) e resistente à benzilpenicilina (CIM > 32).

- incubação com ampicilina: 0, 4 (CIM), 8, 12, 16, 40 $\mu\text{g/mL}$. Após a incubação com uma dose de 4 $\mu\text{g/mL}$ (MIC), observou-se um efeito sobre a parede na maior parte das células, tendo as células sido destruídas por lise de uma maneira heterogênea, com uma formação secundária tênue contendo fragmentos de ADN. Fortemente destruídas por lise: 35%; moderadamente destruídas por lise: 25%; destruídas por lise com ADN fragmentado: 12%; não destruídas por lise: 28%. Observou-se um resultado semelhante após incubação com uma dose de 8, 12 e 16 $\mu\text{g/mL}$. Após a aplicação de uma dose de 40 $\mu\text{g/mL}$, a formação secundária torna-se bastante tênue com muito poucas células, 63% de não destruídas por lise, 15% com um pequeno halo indicador de um efeito sobre a parede, 20% com um grande halo de lise e 2% são destruídas por lise, com nucleóides de ADN fragmentado (figura 2);
- incubação com benzilpenicilina: 0, 0,06, 16, 32, 320 $\mu\text{g/mL}$. Após a incubação com uma dose de 16 $\mu\text{g/mL}$, observa-se uma formação secundária que aumenta ligeiramente após a incubação com doses de 32 e 320 $\mu\text{g/mL}$. Após a incubação com uma dose de 16 $\mu\text{g/mL}$, há 4,5% de células destruídas por lise com um halo grande. Há 81% das células que se apresentam não destruídas por lise. Após a incubação com uma dose de 32 $\mu\text{g/mL}$: há 4% com um halo grande e há 4% de

células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado. Há 65% das células que não foram destruídas por lise. Após a incubação com uma dose de 320 µg/mL: há 72,3% de células não destruídas por lise e há 25% com um halo pequeno. Após a incubação com uma dose de 16, 32 e 320 µg/mL são observadas muitas cápsulas vazias esvaídas: 0,5-1,5%.

Enterococcus faecium. Estirpe resistente à ampicilina (CIM > 32) e resistente à benzilpenicilina (CIM > 32).

- incubação com ampicilina: 0, 8, 12, 16, 32 (CIM), 320 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 320 µg/mL observa-se algum efeito com uma formação secundária ténue com 7,5% de células fortemente destruídas por lise, 1% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado, 2% de células com um pequeno halo e 89% de células não destruídas por lise (figura 3);

- incubação com benzilpenicilina: 0, 0,06, 16, 32, 320 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 320 µg/mL, não é observável nenhuma formação secundária, mas são observáveis 5% de células fortemente destruídas por lise. As células restantes não foram destruídas por lise.

Gram-

Acinetobacter baumannii. Estirpe resistente ao imipenem (CIM > 32) e resistente à ceftazidima (CIM > 32). Esta estirpe mostra uma formação secundária referencial bastante ténue.

- incubação com imipenem: 0, 4, 8, 16, 32, 320 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 16 µg/mL, não há nenhuma formação secundária de fragmentos de ADN extracelular e são observadas 1% de células com um halo grande, 1% de células com um halo pequeno e 0,5% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado. Após a incubação com uma dose de 32 µg/mL, observa-se um resultado semelhante ao obtido com a incubação com uma dose de 16 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 320 µg/mL observa-se uma formação secundária ténue de fragmentos de ADN extracelular, mas 92% das células não estão destruídas por lise,

2,5% das células estão destruídas por lise com um pequeno halo, 3,5% das células estão fortemente destruídas por lise e 2% das células estão destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado. As células não destruídas por lise são maiores e mais redondas;

- incubação com ceftazidima: 0, 8, 20, 32, 256, 2 560 µg/mL. Após incubação com uma dose de 8 µg/mL há 22% das células muito alongadas e filamentosas. Para as doses subsequentes há 90% das células que se apresentam filamentosas. Após incubação com uma dose de 20 e de 32 µg/mL: há 84,5% das células que apresentam um halo pequeno, 1,5% das células apresentam um halo grande sem formação secundária de fragmentos de ADN extracelular. Após a incubação com uma dose de 256 µg/mL: há 32,3% das células fortemente destruídas por lise, 63% das células apresentam um halo pequeno e 4,7% não foram destruídas por lise, com uma formação secundária tênue. Após a incubação com uma dose de 2 560 µg/mL, persiste a mesma formação secundária, 5% das células não foram destruídas por lise, 6,5% das células apresentam um halo pequeno, 63,5% apresentam um halo grande e 25% estão destruídas por lise, com os nucleóides com o ADN fragmentado.

Acinetobacter baumannii. Estirpe sensível ao imipenem (CIM = 0,38) com uma sensibilidade intermédia à ceftazidima (CIM = 12). Esta estirpe não tem uma formação secundária referencial:

- incubação com imipenem: 0, 0,038, 0,38 (CIM), 4, 8, 16 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 0,038 µg/mL, há uma formação secundária diminuta. Há 75,7% das células não destruídas por lise e há apenas 1,4% de células com um halo grande e 22,9% das células com um halo pequeno. Após a aplicação de uma dose de 0,38 µg/mL aparece uma formação secundária nítida. Há 75,7% das células fortemente destruídas por lise com um halo grande, há 5,9% das células com um halo pequeno e 7,4% destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado. Após a incubação com uma dose de 4, 8 e 16 µg/mL observa-se uma formação secundária e muitas cápsulas vazias esvaídas (12% para uma dose de 4 µg/mL; 19,5% para uma

dose de 8 µg/mL; 15% para uma dose de 16 µg/mL). Há muitas células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado (66% para uma dose de 4 µg/mL; 69,5% para uma dose de 8 µg/mL; 73,5% para uma dose de 16 µg/mL). Há poucas células com um halo grande (13,5% para uma dose de 4 µg/mL; 6% para uma dose de 8 µg/mL; 5% para uma dose de 16 µg/mL) e há algumas células não destruídas por lise (8,5% para uma dose de 4 µg/mL; 5% para uma dose de 8 µg/mL; 6,5% para uma dose de 16 µg/mL);

- incubação com ceftazidima: 0, 8, 12 (CIM), 20, 32, 120 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 8 µg/mL há 82% de células filamentosas com um total de 40% de células destruídas por lise, com um pequeno halo e 1% de células destruídas por lise, com nucleóides com ADN fragmentado, sem formação secundária. Após a incubação com uma dose de 12 µg/mL (CIM) e de 20 µg/mL há 95% de células filamentosas, com 94,5% e 91,5%, respectivamente, de células destruídas por lise, com um halo pequeno, e 1,5% e 3%, respectivamente, de células destruídas por lise, com um halo grande e 4% e 5,5%, respectivamente, de células não destruídas por lise; com uma dose de 12 µg/mL há uma formação secundária ténue que aumenta após uma dose de 20 µg/mL. Após incubação com uma dose de 32 µg/mL há uma maior formação secundária, 90% de células alongadas e 88% de células destruídas por lise, com um halo pequeno, 6% de células destruídas por lise com um halo grande e 6% de células não destruídas por lise. Após a incubação com uma dose de 120 µg/mL observa-se uma formação secundária extensa e há 91% de células filamentosas e 23% de células destruídas por lise com um halo grande, 67% de células destruídas por lise com um halo pequeno, 36% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado e 7% de células não destruídas por lise.

Escherichia coli. Estirpe sensível à ceftazidima (CIM = 1) com sensibilidade intermédia à ampicilina (CIM = 16).

- incubação com ampicilina: 0, 8, 16 (CIM), 20, 32, 160 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 8 µg/mL observa-se desde logo uma formação

secundária intensa e há 55% das células fortemente destruídas por lise, para além de 9% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado. Após a incubação com uma dose de 16 µg/mL (CIM): há 60,4% de células destruídas por lise com um halo grande, 5,7% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado, 22,6% de cápsulas vazias e 11,3% de células não destruídas por lise. Após a incubação com uma dose de 20 µg/mL: há muito poucas células. Há 47,3% de células com um halo grande, 8,6% são células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado, 31,2% de cápsulas vazias e 12,9% de células não destruídas por lise. Após incubação com uma dose de 32 e de 160 µg/mL há muito poucas células, sendo 54% cápsulas vazias.

- incubação com ceftazidima: 0, 1 (CIM), 8, 10, 20, 32 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 1 µg/mL há 99% de células filamentosas, 97% fortemente destruídas por lise com alguma formação secundária (figura 4). Após a incubação com uma dose de 8 µg/mL o resultado é semelhante ao obtido quando a incubação é feita com uma dose de 1 µg/mL, mas há mais formação secundária. Após a incubação com uma dose de 10 µg/mL obtém-se 76,5% de células bem destruídas por lise, 11% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado e 10,5% de cápsulas vazias, com uma formação secundária intensa. Após a incubação com uma dose de 20 e 32 µg/mL os danos são excessivos com 25,3% de cápsulas vazias e 20% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado, 52,7% de células bem destruídas por lise e 2% de células não destruídas por lise.

[0141] *Escherichia coli*. Estirpe resistente à ampicilina (CIM>256) e resistente à ceftazidima (CIM = 32).

- incubação com ampicilina: 0, 8, 20, 32, 256, 2 560 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 256 µg/mL observa-se apenas 0,5% de células destruídas por lise e 1% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado, sem formação secundária, semelhante ao referencial e às doses precedentes. Após a incubação com uma dose de 2 560 µg/mL, as células ficam mais alongadas, embora

não sejam filamentosas; 13% das células estão fortemente destruídas por lise, 5% moderadamente destruídas por lise, 1,5% destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado e 4% de cápsulas vazias, com uma tênue formação secundária.

- incubação com ceftazidima: 0, 8, 20, 32 (CIM), 320 µg/mL. Após a incubação com uma dose de 8 µg/mL há 13% de células filamentosas e apenas 1% de células bem destruídas por lise. Após a incubação com uma dose de 20 µg/mL há 99% de células filamentosas, 94% não destruídas por lise; 5% de células bem destruídas por lise e sem formação secundária. Após a incubação com uma dose de 32 µg/mL há 98% de células filamentosas, 92% de células não destruídas por lise, 4% de células bem destruídas por lise, 3% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado e 1% de cápsulas vazias, com uma formação secundária tênue. Após a incubação com uma dose de 320 µg/mL observa-se uma formação secundária tênue com 99% de células filamentosas e 95% de células moderadamente destruídas por lise, 3,5% de células fortemente destruídas por lise, 0,5% de células destruídas por lise com nucleóides com ADN fragmentado e 1% de células não destruídas por lise.

Exemplo 5

Detecção *in situ* de células dormentes numa população bacteriana e sua quantificação em frequência

[0142] O fenómeno da persistência após os tratamentos com antibióticos tem uma grande importância clínica. Numa população de estirpes bacterianas, apesar de serem sensíveis ao antibiótico, pode haver algumas células que tolerem o antibiótico sem terem nenhum mecanismo de resistência conhecido, sendo tais células dormentes ou de crescimento lento. Após a supressão do tratamento com o antibiótico, algumas destas células podem voltar a crescer e podem ser responsáveis por infecções recorrentes quando tem lugar um tratamento descontínuo com o antibiótico. Estas células dormentes podem ser encontradas numa pequena proporção quando as bactérias crescem exponencialmente, mas a sua frequência aumenta quando atingem

a fase estacionária e durante a formação de biopelículas (Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol 2007;5:48-56).

[0143] No caso dos antibióticos β -lactama, as células dormentes são consideradas como se tivessem ou lhe faltasse um sistema avariado de autólise da parede, que é ativado após o tratamento com o antibiótico. A metodologia da invenção poderia revelar estas células, dotando-a assim de grande valor. Essas células poderiam ser detectadas em culturas que contivessem células sensíveis a um antibiótico, de uma maneira muito mais simples do que outros métodos existentes presentemente, tais como a monitorização do crescimento celular por meio de técnicas de microscopia com aceleração de imagens ou por citometria de fluxo. Estas metodologias são complexas, laboriosas, dispendiosas e não podem ser utilizadas a nível clínico (Roostalu J, Joers A, Luidalepp H, Kaldalu N, Tenson T. Cell division in *Escherichia coli* cultures monitored at single cell resolution. BMC Microbiol 2008;8:68).

[0144] A figura 5 mostra células de uma estirpe sensível de *E. coli*, provenientes de uma cultura num meio líquido, a crescerem em fase exponencial, sensíveis a amoxicilina/ácido clavulânico, e expostas a uma dose elevada (32/16) durante 90 minutos. Para além das células com paredes afetadas e para além da formação secundária de fragmentos de ADN extracelular, observa-se nitidamente uma célula com uma morfologia intacta que não foi de modo algum afetada pelo antibiótico e que por isso tem de corresponder, logicamente, a uma célula dormente.

[0145] Uma vez que as células dormentes não se desenvolvem, a sua proporção relativa na lamela deve aumentar progressivamente, à medida que aumenta o período de incubação com o antibiótico e à medida que desaparecem gradualmente da cultura as células sensíveis. Este fenómeno também poderia ocorrer quando a estirpe estivesse a incubar com doses progressivamente crescentes de antibiótico, durante um período específico. Na realidade, se os resultados forem ajustados para a quantidade de células presentes após a incubação com o antibiótico, as células sem halo (dormentes) iriam permanecer constantes, independentemente da dose de

antibiótico ou do período de incubação, uma vez que tais células não crescem, ao passo que a parte restante das células sensíveis com halo iria decrescer progressivamente, à medida que desaparecessem da cultura. A possibilidade de as células não destruídas por lise corresponderem a células dormentes pode ser determinada com estes dois tipos de experiências, entre outras.

[0146] Incubação com uma dose crescente de antibiótico. Mantém-se a incubar uma estirpe de *E. coli* sensível à ampicilina com doses crescentes de antibiótico, durante 60 minutos. O quadro 1 mostra que a percentagem de células não destruídas por lise aumenta com a dose de antibiótico, ao passo que a percentagem de células destruídas por lise diminui correspondentemente. Quando atingem um valor de acordo com uma densidade óptica relativa DO_{600} , isto é, com um número relativo de células na cultura após a aplicação de cada dose, verifica-se que a proporção relativa de células não destruídas por lise tende para um valor entre 5-8,5, ao passo que a proporção relativa de células destruídas por lise diminui consideravelmente quando a dose aumenta.

Quadro 1

[0147] Resultados da incubação de uma estirpe sensível de *E. coli* com doses crescentes de ampicilina, durante 60 minutos. A percentagem de células foi normalizada em termos do valor DO_{600} .

DOSES µg/mL	DO_{600} ($DO_{inicial} = 0,1$)	% RELATIVA a DO_{600}	Células não destruídas por lise		Células destruídas por lise	
			%	valor relativo	%	valor relativo
0	0,416	100,0	-	-	2,3	2,3
2	0,323	77,6	9,7	7,5	90,3	70,1
8	0,120	28,8	29,3	8,5	70,6	20,4
16	0,050	12,0	62,5	7,5	37,5	4,5

32	0,027	6,5	77,5	5,0	22,5	1,5
160	0,024	5,8	85,0	4,9	15,0	0,9

[0152] Incubação com o antibiótico durante intervalos de tempo crescentes. Manteve-se a incubar uma estirpe de *E. coli* sensível a amoxicilina/ácido clavulânico, com uma dose de antibiótico de 32/16 durante 24 horas. As alíquotas estudadas foram extraídas da cultura, nos momentos especificados na figura 6. A parte superior da figura 6 mostra que a proporção de células não destruídas por lise aumenta gradualmente na cultura ao longo do tempo, uma vez que o número de células afetadas pelo antibiótico diminui gradualmente. Com efeito, a curva de queda da percentagem de células com halo é semelhante à curva de queda da percentagem de células na cultura, sendo esses números medidos por meio de uma câmara de Neubauer. Se a percentagem de células de cada tipo for normalizada relativamente à percentagem de células restantes na cultura, o número de células sem halo tem tendência para permanecer constante ao longo do tempo, ao passo que o nível de células com paredes danificadas diminui progressivamente, de uma maneira semelhante ao nível de células na cultura (figura 6, parte inferior).

[0153] Em conclusão, os dois tipos de experiências indicam que as células com halo permanecem na cultura com o antibiótico ao longo do tempo e com diferentes doses crescentes de antibiótico. Isto fundamenta o seu estatuto de células dormentes, uma vez que nem crescem nem são afetadas pelo antibiótico, devendo a sua frequência ser independente da dose de antibiótico e do período de incubação com o antibiótico.

Exemplo 6

Determinação de nucleóides com ADN fragmentado exclusivamente em células com a parede celular afetada pelo antibiótico

[0154] Expôs-se uma estirpe de *E. coli* sensível e uma outra estirpe com sensibilidade intermédia, em crescimento exponencial, ao antibiótico amoxicilina conjuntamente com ácido clavulânico em meio líquido de Mueller-Hinton. A dose foi

de 32/16 (amoxicilina/ácido clavulânico). Os períodos de incubação com o antibiótico foram de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 6 horas. Em simultâneo, efetuou-se também um estudo com uma estirpe de contraprova sem antibiótico.

[0155] A frequência dos nucleóides com ADN fragmentado foi determinada em conformidade com o protocolo descrito por Tamayo *et al.* (Tamayo M, Santiso R, Gosálvez J, Bou G, Fernández JL. Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an in situ DNA fragmentation assay. BMC Microbiology 2009; 9: 69). Este protocolo destrói por lise todas as células, independentemente do estado das suas paredes. Esta técnica é adequada para avaliar o estado do ADN dos nucleóides de todas as células numa população. Por outro lado, tais nucleóides também foram determinados em preparações tratadas para o reconhecimento de um efeito sobre a parede celular, em conformidade com o protocolo da presente invenção. Este método não é adequado porque não permite avaliar o estado do ADN em células não destruídas por lise, cujas paredes celulares não tenham sido afetadas pelo antibiótico. No entanto, tendo em consideração que nesta experiência a maior parte das células são afetadas pelo antibiótico, isto permite avaliar a fragmentação do ADN exclusivamente em células com a parede danificada. Isto é importante uma vez que permite avaliar a teoria que indica que as células com a parede celular afetada pelo antibiótico iriam gerar uma resposta tardia que iria acabar também por afetar o ADN dos nucleóides que iria ser depois fragmentado durante o método da morte celular, possivelmente por redução dos radicais com oxigénio livres (Kohanski, MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell 2007;130:797–810).

[0156] A figura 7 ilustra diversas células tratadas utilizando um método para a determinação de um efeito sobre a parede celular. Um dos nucleóides tem ADN fragmentado. Ao contrário dos nucleóides intactos, este último fica colorado mais ligeiramente, ocupando uma superfície maior devido ao halo de difusão dos

fragmentos de ADN a partir da área bacteriana central ou residual.

Exemplo 7

Determinação da sensibilidade ou da resistência a um antibiótico β -lactama sem, recorrer à lise, avaliando a formação secundária dos fragmentos de ADN extracelular na preparação

[0157] Quando as bactérias são tratadas sem o passo de incubação na solução de lise, tais bactérias ficam todas praticamente intactas, independentemente de terem sido ou não afetadas pelo antibiótico. No entanto, após uma incubação adequada com a dose crítica de antibiótico para estirpes sensíveis, se puder ou não ser vista na preparação uma formação secundária microgranular e fibrilar, homogênea e difusa, é possível saber perfeitamente se a estirpe é sensível ou não. Esta avaliação sobre a formação secundária, sem recurso à lise, para se observar o efeito sobre a parede celular pode ser obtida fazendo a coloração do material incorporado no microgel, ou do material não incorporado no microgel, quer seja consolidado ou recente, com um fluorocromo.

[0158] No caso de uma cultura pura, a avaliação da formação secundária que contém os fragmentos de ADN presentes na preparação obtidas sem recurso à lise pode ser suficiente para se determinar se uma estirpe é sensível ou resistente, após o período adequado de incubação com o antibiótico específico para a parede bacteriana. Isto pode, talvez, acelerar o tempo para a obtenção de resultados sobretudo quando o tempo é importante devido a uma urgência clínica.

A) Material incorporado no microgel

[0159] O líquido com as células está incorporado num microgel de agarose que é desidratado com soluções alcoólicas e/ou seco ao ar ou seco numa estufa e colorado com o fluorocromo. É o mesmo método descrito pormenorizadamente *supra*, mas sem a incubação ou a solução de lise. A formação secundária pode ser avaliada rapidamente nos 15-20 minutos subsequentes que demora a execução desta técnica. As preparações são permanentes. O resultado está ilustrado na figura 8, mostrando

as mesmas estirpes apresentadas na figura 1, com crescimento durante 24 horas num prato e subsequente incubação durante 40 minutos com uma dose de amoxicilina/ácido clavulânico de 0, 8/4 (fraca) e 32/16 (elevada). Este sistema reduzido não permite detectar as células dormentes da estirpe bacteriana, nem permite distinguir entre células sensíveis e células resistentes, no caso de uma cultura mista ou contaminada. Além disso, a intensidade da formação secundária de fragmentos de ADN extracelular depende da concentração das bactérias sensíveis. Se a concentração for pequena, a formação secundária pode ser muito ténue ou quase imperceptível. Assim sendo, uma estirpe de *E. coli* sensível a amoxicilina/ácido clavulânico, a incubar com uma concentração elevada (32/16), apresenta, partindo de um valor de $DO_{600} = 0,07$, uma formação secundária bastante nítida ao fim de 15 minutos de incubação (DO_{600} : 0,071; 42,5 milhões de células por mL, com medição feita em câmara de Neubauer; 5,62% de células viáveis), permanecendo a formação secundária intensa até às 2 horas de incubação (DO_{600} : 0,033; 14,5 milhões de células por mL; 3,77% de células viáveis). A formação secundária torna-se fraca ao fim de 3 e 4 horas (DO_{600} : 0,037 e 0,033 respectivamente; 14 milhões de células por mL tanto ao fim de 3 como de 4 horas; 0,38 % de células viáveis tanto ao fim de 3 como de 4 horas), deixando de ser observada ao fim de 6 horas (DO_{600} : 0,035; 13,5 milhões de células por mL; 0,13 % de células viáveis). Apesar de se manter um valor total de células entre 40-30%, relativamente à quantidade inicial de células, entre os 60 minutos e as 6 horas, a intensidade da formação secundária que contém os fragmentos de ADN diminui gradualmente durante esse período, até deixar de ser detectável, possivelmente devido à sua degradação.

B) Material fixado

[0160] É possível misturar com um agente fixador uma alíquota da cultura sem antibiótico e outras alíquotas com as doses de antibiótico. É possível utilizar agentes fixadores à base de álcool, agentes fixadores à base de aldeídos ou agentes fixadores à base de cetonas, tais como metanol, etanol, acetona, formaldeído, glutaraldeído, e

também ácido acético, ácido pícrico, cloreto de mercúrio, ião dicromato, tetróxido de ósmio, etc., e misturas tais como metanol:ácido acético, por exemplo, na proporção de 3:1, e fluido de Carnoy. No caso do formaldeído, a solução pode ser uma solução aquosa entre 0,1 e 50%, de preferência a 10%. No caso dos outros agentes de fixação, estes podem ser utilizados em proporções diferentes compreendidas entre 0,1 e 100%. Recomenda-se uma proporção entre 5-10% de solução aquosa que contém os microrganismos e entre 95-90% de agente de fixação. A vantagem da fixação sobre um suporte húmido para observação reside no facto de o material poder ser guardado durante um período mais longo e observado sempre que seja conveniente. Espalha-se uma gota (alguns microlitros) sobre a lamela e deixa-se secar. Acrescenta-se depois o fluorocromo 'SYBR Gold' (1:400), aplica-se uma tampa de cobertura de lamela e examina-se a lamela. O formaldeído apenas conserva a formação secundária durante um curto intervalo de tempo, pelo que não é recomendado. Há outros agentes de fixação que têm uma duração mais longa e proporcionam uma imagem nítida da formação secundária.

[0161] É preferível a mistura de metanol:ácido acético. Com a mistura de metanol:ácido acético o material espalha-se mais facilmente na lamela e o material da formação secundária e as bactérias aderem melhor ao vidro, ao passo que com outros agentes de fixação o mais provável é que se descolem durante a coloração, uma vez que não foi feita uma incubação prévia com calor seco. Observa-se a formação secundária de fragmentos de ADN extracelular com o aspecto de um agregado disperso (figura 9). A camada espalhada de material fixado sobre a lamela leva 8-10 minutos a secar, embora seque em 5 minutos quando a lamela é colocada num prato ou numa estufa a 37°C. Se a mistura de metanol:ácido acético (3:1) estiver concentrada a 95%, a secagem após a gota ter sido espalhada é rápida, em menos de 1 minuto. Embora os materiais sejam simples, os fixadores não constituem uma grande vantagem em termos da preparação e tempo de observação relativamente à preparação em microgel que também é permanente. Assim sendo, perante uma

primeira determinação provisória rápida de sensibilidade ou de resistência, a operacionalidade da fixação ou da utilização do microgel é praticamente semelhante.

C) Material recente

[0162] Acrescenta-se o fluorocromo a uma alíquota da cultura, coloca-se uma tampa de cobertura sobre a lamela e examina-se a lamela diretamente num microscópio de fluorescência. Por exemplo, acrescenta-se 2 µL do fluorocromo 'SYBR Gold' (1:400) a cerca de 10 µL de cultura de bactéria em meio líquido. Isto é feito em culturas com o antibiótico que atua sobre a parede celular, incluindo uma cultura de contraprova sem antibiótico. Na cultura com o antibiótico, para além das bactérias flutuantes, observa-se um material microfilamentoso ou granular intercelular difuso em contínuo movimento browniano, correspondente à formação secundária emitida pelas bactérias sensíveis (figura 9). Esta determinação, com a duração de 1 minuto, da sensibilidade ou da resistência ao antibiótico que atua sobre a parede celular é a mais rápida e a mais simples. Em qualquer dos casos, depende da concentração das células, da capacidade das células sensíveis para libertarem o material, da pureza da estirpe, do período de incubação com o antibiótico, da dose de antibiótico, etc.. Por vezes pode ser observada uma bactéria destruída por lise que liberta o nucleóide de ADN, mas a maior parte das bactérias não manifesta tal comportamento. A técnica não permite detectar as células dormentes da própria estirpe bacteriana, nem permite distinguir entre células sensíveis e células resistentes, no caso de uma cultura mista ou contaminada. Finalmente, a qualidade da imagem não é tão nítida e exata como no caso de incorporação em microgel e a preparação não é permanente, pelo que não pode ser guardada e examinada no futuro a não ser que não seja congelada.

[0163] Ao fazer-se a centrifugação de bactérias que se desenvolvem no meio líquido com um antibiótico, específico das paredes, ao qual são sensíveis, acumulam-se formando um granulado, ao passo que os fragmentos de ADN extracelular permanecem na fracção de sobrenadante. É possível corar uma alíquota desta fracção de sobrenadante com o fluorocromo que se pretende avaliar por observação

num suporte húmido, ou fixá-la ou integrá-la num microgel. Assim sendo, obtém-se também uma informação rápida sobre a sensibilidade ou resistência ao antibiótico. A avaliação desta formação secundária de fragmentos de ADN extracelular pode ser feita não só por meio de microscopia mas também por quaisquer outros métodos físicos ou químicos alternativos para a detecção de ADN (eletroforese, anticorpos, espectrofotometria, reação em cadeia com polimerase, técnicas de hibridação, micromatrizes, microfluídica, nanopartículas, nanocristais, etc.).

Exemplo 8

Avaliação da natureza da formação secundária microgranular e fibrilar observada nas preparações de culturas que contêm bactérias sensíveis aos antibióticos específicos da parede celular.

[0164] Para se investigar a natureza da formação secundária microgranular e fibrilar, observada nas preparações de culturas que contêm bactérias sensíveis aos antibióticos específicos da parede celular, efetua-se uma digestão *in situ* com enzimas (proteínase K e DNAase I), uma hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e uma coloração da cultura diluída no microgel.

A) Incubação *in situ* com a proteínase K, que é uma enzima que degrada proteínas e com DNAase I, que é uma enzima que digere o ADN

[0165] A experiência foi efetuada com uma estirpe de *E. coli* sensível à ampicilina e com uma estirpe de *A. baumannii* sensível ao imipenem. A primeira estirpe ficou a incubar com ampicilina na concentração de 32 µg/mL e a segunda estirpe com imipenem na concentração de 0,76 µg/mL durante 60 minutos em meio líquido de Mueller-Hinton a 37°C, sob agitação. Após a incubação, cada cultura com as células foi incorporada em microgeles sobre as lamelas. Em cada lamela colocou-se um microgel contendo a cultura de contraprova sem antibiótico e 2 microgeles contendo a cultura tratada com antibiótico. O tamanho de cada microgel corresponde a uma tampa de cobertura da lamela com 18x18 mm. Os microgeles de algumas lamelas foram lavados com um tampão de proteínase K (1% de SDS, EDTA 2 mM) e os

microgeles das outras lamelas foram lavados com um tampão de DNAase I (Tris-HCl 20 mM a pH 8,3, MgCl₂ 2 mM). Entre os primeiros, um dos microgeles que continha a cultura tratada com ampicilina ficou a incubar apenas com um tampão de proteínase K e o outro microgel que continha a cultura tratada com ampicilina ficou a incubar com 5 µL de proteínase K na concentração de 2 mg/mL no seu tampão. Nas lamelas lavadas com tampão de DNAase I, um dos microgeles que continha a cultura tratada com ampicilina ficou a incubar apenas com um tampão de DNAase I e o outro microgel que continha a cultura tratada com ampicilina ficou a incubar com 5 µL de DNAase I de 2,5 U, no seu tampão. As incubações decorreram durante 30 minutos a 37°C numa câmara húmida. As lamelas foram depois lavadas com água destilada, desidratadas em soluções alcoólicas em concentrações crescentes, secas e coloradas com 'SYBR Gold' (1:400).

Resultado

[0166] As culturas que não foram tratadas com ampicilina ou imipenem não apresentaram formação secundária microgranular e fibrilar na preparação (figura 10a). As culturas tratadas com ampicilina ou imipenem apresentaram a formação secundária que se manteve nos microgeles que estiveram a incubar exclusivamente com os tampões das enzimas (figuras 10b, 10c e 10e). Quando a incubação foi feita com proteínase K, a formação secundária permaneceu inalterada (figura 10f), ao passo que quando a incubação foi feita com DNAase I, a formação secundária desapareceu (figura 10d). O aumento da concentração de proteínase K para 10 mg/mL no mesmo tampão ou em água também não dá origem a qualquer efeito sobre a formação secundária, quer se trate de um microgel ou de uma camada espalhada em solução de Carnoy. Isto indica que a formação secundária observada compreende, principalmente, fragmentos de ADN extracelular proveniente de células afetadas pelo antibiótico. Esta formação secundária não é observável quando são utilizados outros tipos de antibióticos, tais como as quinolonas

B) Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com uma sonda de ADN genômico de *E. coli*

[0167] Manteve-se a incubar uma cultura de *E. coli* sensível à ampicilina com o referido antibiótico numa concentração de 32 µg/mL durante 60 minutos em meio líquido de Mueller-Hinton a 37°C, sob agitação. Misturou-se 50 µL da cultura com 950 µL de metanol:ácido acético (3:1) e espalhou-se sobre as lamelas. Após secagem ao ar, as lamelas foram mergulhadas durante 5 minutos em metanol:ácido acético (3:1) (fluido de Carnoy) e ficaram a secar. A seguir ficaram a incubar em soluções alcoólicas a 70%, 90% e 100% a -20°C durante 5 minutos para cada uma e depois ficaram a secar. Desnaturou-se o ADN presente nas lamelas por incubação em solução de formamida a 75% /SSC2X, a pH 7 e a 67°C durante 90 segundos. Efetuou-se nova passagem das lamelas por soluções alcoólicas a 70%, 90% e 100% a -20°C durante 5 minutos para cada uma, tendo ficado depois a secar. Para cada uma das lamelas, ao nível da área de espalhamento, foram aplicados microlitros de sonda de ADN genômico integral de *E. coli* marcado com biotina (4,3 ng/µL em formamida a 50%, SSC2X, sulfato de dextrano a 10% e fosfato de sódio 100 mM a pH 7), tendo sido aplicada uma tampa de cobertura de lamela com 18x18 mm. Manteve-se a sonda a incubar de um dia para o outro numa câmara húmida. A sonda não hibridada foi lavada em solução de formamida a 50%/SSC2X a pH 7, em duas lavagens de 5 minutos, e depois em SSC2X a pH 7, duas lavagens de 3 minutos cada uma, a 37°C. Para a revelação da sonda hibridada manteve-se as lamelas a incubar numa solução de bloqueio de anticorpos (BSA a 5%, SSC4X e 0,1% de Triton X-100) durante 5 minutos a 37°C e depois em estreptavidina-Cy3 (1:200, em BSA a 1%, SSC4X e 0,1% de Triton X-100) durante 30 minutos. As lamelas foram coloradas com DAPI (1 µg/mL em Vectashield) e examinadas por microscopia de fluorescência.

Resultado

[0168] A contrastação com DAPI mostra que nas preparações fixadas em fluido de Carnoy são visíveis na formação secundária agregados que podem estar a envolver as células bacterianas cujos nucleóides estão colorados com DAPI. O colorante do ADN penetra facilmente devido à ausência de parede nas referidas

células. O DAPI também vai colorar os agregados de formação secundária, mas mais ligeiramente (figura 11a). Examinando o sinal de hibridação da sonda, observa-se que os nucleóides das células, aos quais lhes falta a parede devido ao tratamento com o antibiótico, hibridam com a sonda de ADN genômico integral. A formação secundária agregada apresenta um intenso sinal de hibridação (figura 11b), demonstrando isso, de uma forma conclusiva, que corresponde ao ADN bacteriano.

C) Coloração do microgel que contém a cultura diluída de *Acinetobacter baumannii* sensível a imipenem

[0169] Manteve-se a incubar uma cultura de *A. baumannii*, sensível ao imipenem, com o referido antibiótico na concentração de 0,76 µg/mL durante 60 minutos em meio líquido de Mueller-Hinton a 37°C, sob agitação. Diluiu-se uma alíquota da referida cultura 10 vezes e incorporou-se num microgel, sem se utilizar a lise, desidratou-se em soluções alcoólicas de concentração crescente, secou-se e colorou-se com 'SYBR Gold'. A diluição permitiu observar com grande pormenor o aspecto da formação secundária microgranular e fibrilar que corresponde aos fragmentos de ADN em diferentes níveis de aumento de tamanho, desde o aspecto momentâneo na recolha até ao aspecto fibrilar aumentado (figura 12).

Resultado

[0170] A formação secundária microgranular e fibrilar observada no meio de cultura dos microrganismos em que o antibiótico específico da parede celular foi eficaz corresponde aos fragmentos de ADN extracelular libertados pelo microrganismo.

Conclusões

[0171] No seu conjunto, os resultados obtidos nos exemplos 1 a 8 demonstram claramente a eficácia dos métodos da presente invenção para a rápida determinação *in situ* da sensibilidade ou da resistência de bactérias a antibióticos que atuem sobre a parede celular, por exemplo, inibindo a biossíntese de peptidoglicanos. Os referidos resultados foram verificados em experiências efetuadas utilizando diferentes microrganismos (v.g., *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*,

Klebsiella oxytoca, *Klebsiella spp.*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*) provenientes de isolados clínicos colhidos no hospital de A Coruña (Espanha) a partir de diferentes pacientes e com antibióticos inibidores da síntese dos peptidoglicanos (v.g., ampicilina, ceftazidima, imipenem, penicilina e vancomicina), conforme mencionado por Santiso *et al.* (Santiso *et al.*, BMC Microbiology 2011, 11:191), cujo conteúdo se considera aqui incorporado por referência.

[0172] A técnica para a avaliação da integridade da parede celular, proporcionada pela presente invenção, é um método rápido e simples que permite distinguir entre estirpes resistentes e estirpes sensíveis aos antibióticos que atuam sobre a parede celular, por exemplo, por interferirem com a biossíntese dos peptidoglicanos. Esta metodologia pode ser útil não só ao nível clínico mas também para efetuar estudos básicos sobre o mecanismo de ação de antibióticos que atuem sobre a parede celular.

REIVINDICAÇÕES

1. Solução de lise **caracterizada por** lisar apenas as bactérias que tenham paredes bacterianas danificadas pela ação de um antibiótico que compreende Tris 200 mM, um pH 10, 0,05 a 3 M de NaCl e 0,025% de SDS ou 5% de t-octilfenoxipolietoxietanol.

2. Método para avaliar a integridade da parede celular das bactérias presentes em uma cultura na presença de um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana **caracterizado por** compreender:

i) acrescentar à referida cultura um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana,

ii) acrescentar uma solução de lise, de acordo com a reivindicação 1, à cultura resultante do passo i),

iii) determinar a presença de nucleóide bacteriano na cultura, e opcionalmente

iv) antes ou após o passo (ii), imobilizar uma amostra da cultura sobre um suporte,

em que as bactérias presentes na cultura pertencem à mesma espécie ou a espécies diferentes e

em que a presença de nucleóide bacteriano na cultura é um indicador de que a integridade da parede celular das bactérias foi danificada pelo antibiótico.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** a determinação da presença de nucleóide bacteriano no meio de cultura ser efetuada por meio de coloração.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** a coloração ser efetuada por meio do uso de um ou mais fluorocromos.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, **caracterizado por** o antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana ser selecionado do grupo que consiste em um antibiótico de β -lactama, uma isoniazida, uma etionamida, um etambutol, uma ciclosserina e um antibiótico glicopeptídico.

6. Método para a determinação da sensibilidade de uma bactéria a um antibiótico que atue sobre a parede celular bacteriana **caracterizado por** compreender avaliar a integridade da parede celular da referida bactéria por meio de um método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, em que se a integridade da parede celular da bactéria foi danificada, então, a bactéria é sensível ao antibiótico.

7. Método para identificar um composto que atua sobre a parede celular bacteriana **caracterizado por** compreender:

i) colocar uma cultura que contenha uma bactéria sensível a um antibiótico que atua sobre a parede celular bacteriana em contato com o composto candidato, e

ii) avaliar a integridade da parede celular da referida bactéria por meio de um método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5,

em que, se a integridade da parede celular da referida bactéria foi danificada, então, o composto candidato é um composto que atua sobre a parede celular bacteriana.

8. Uso de uma solução de lise, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** avaliar a integridade de parede celular bacteriana.

9. Kit que compreende uma solução de lise, que tem um pH 10, **caracterizado por** compreender:

- Tris 200 mM

- 0,05 a 3 M de NaCl, e

- 0,025% de SDS ou 5% de t-octilfenoxipolietoxietanol,

para colocar os métodos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, em prática.

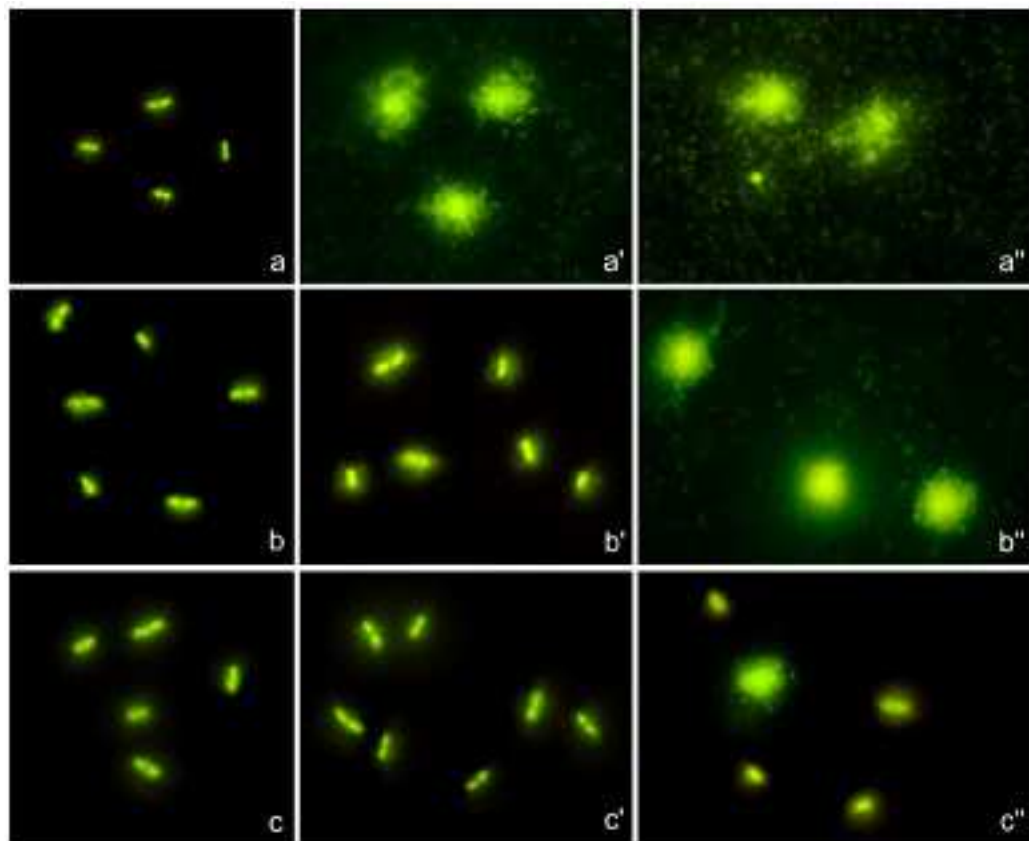


FIG1

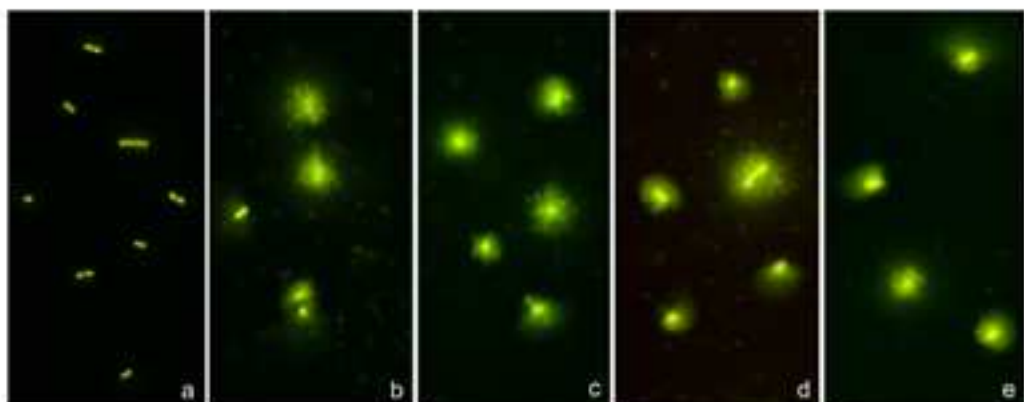


FIG 2

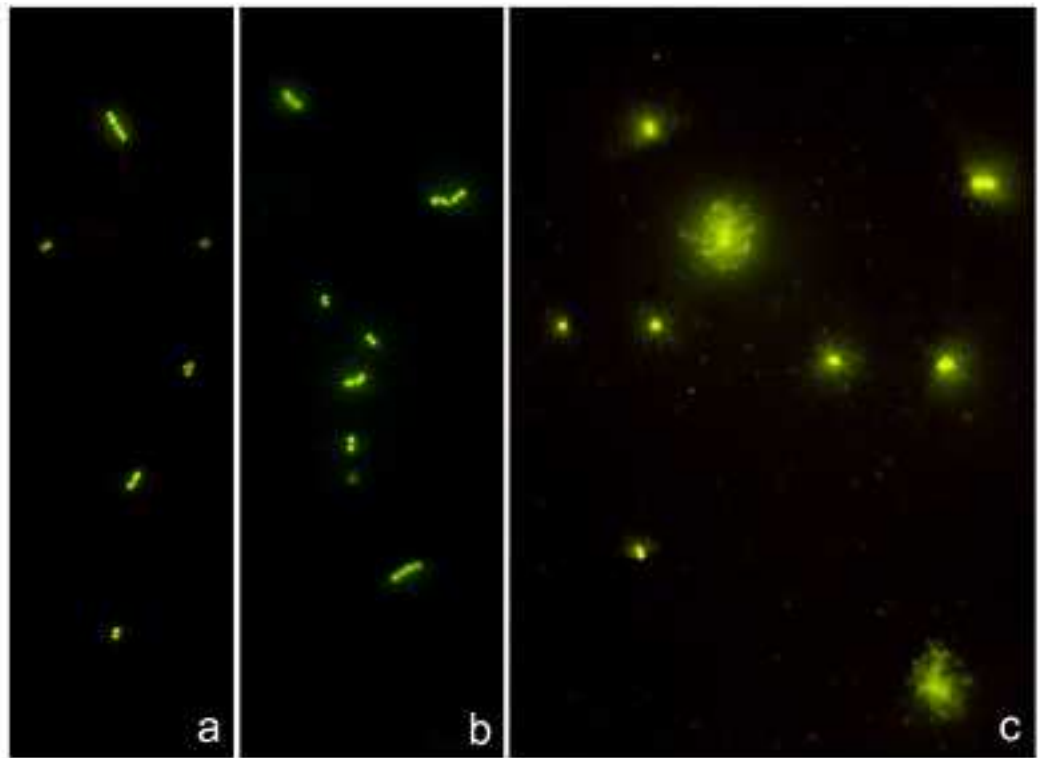


FIG 3

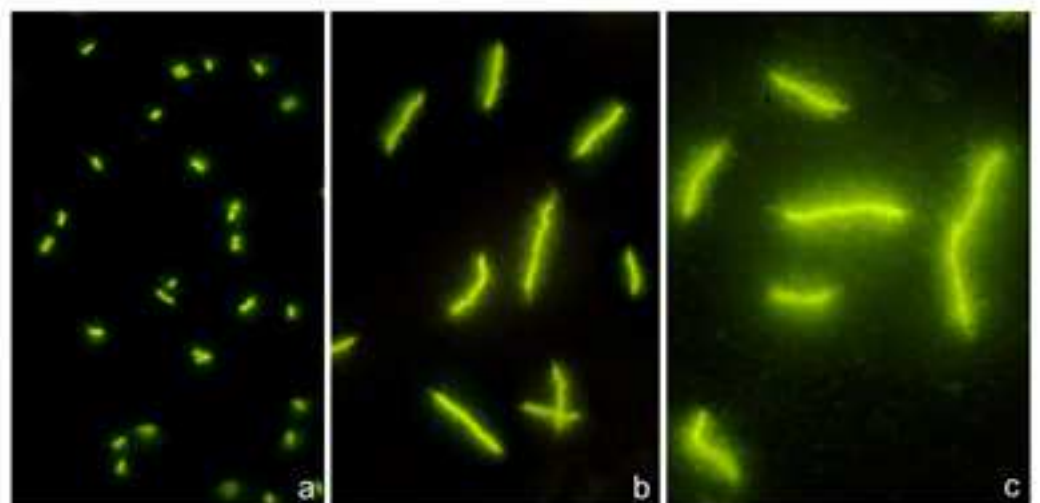


FIG4

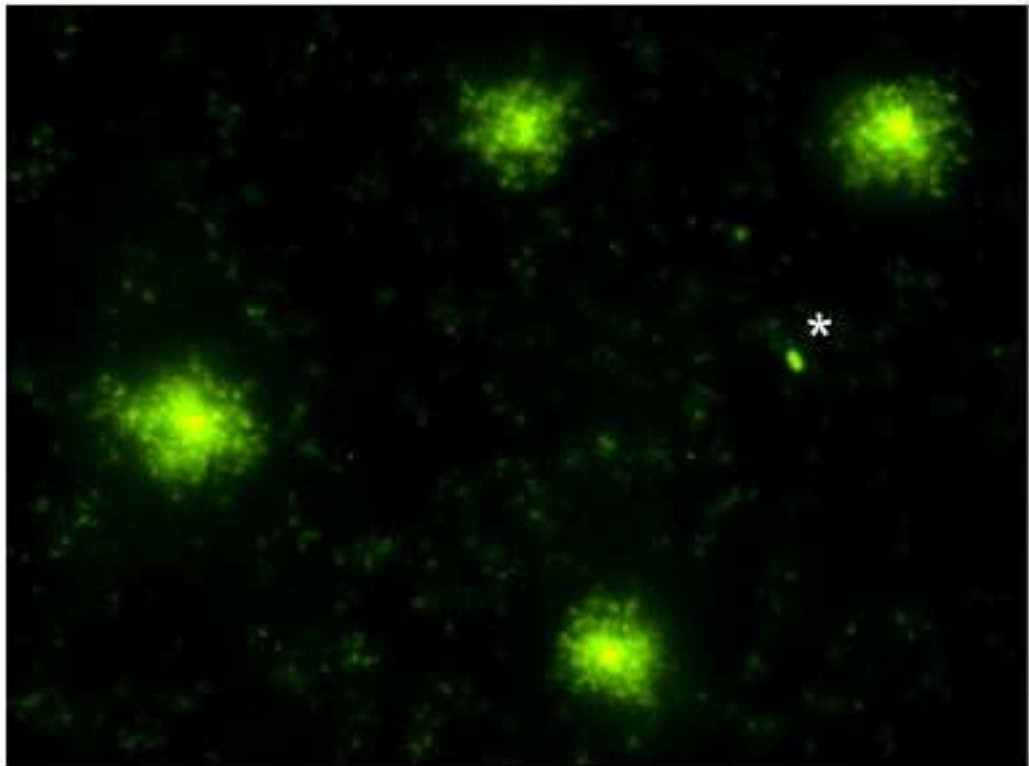


FIG. 5

5

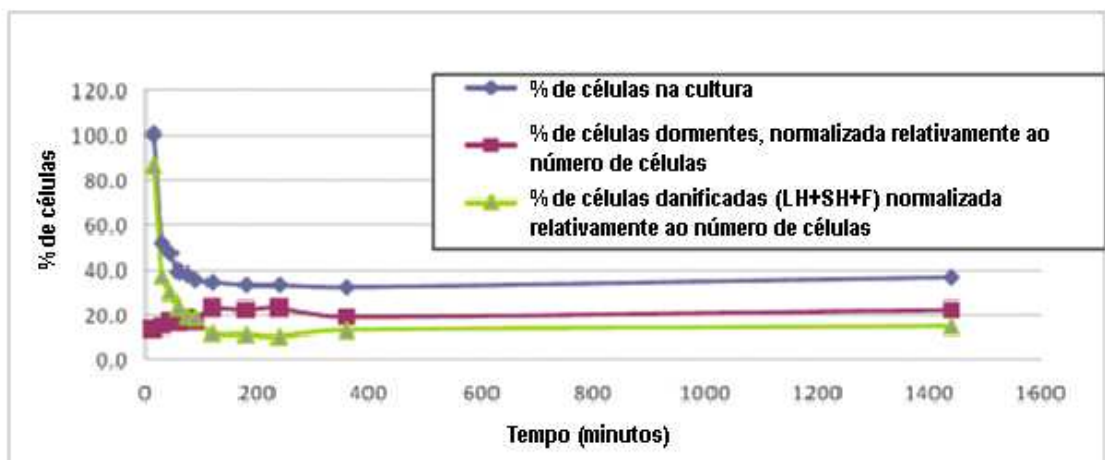


FIG. 6

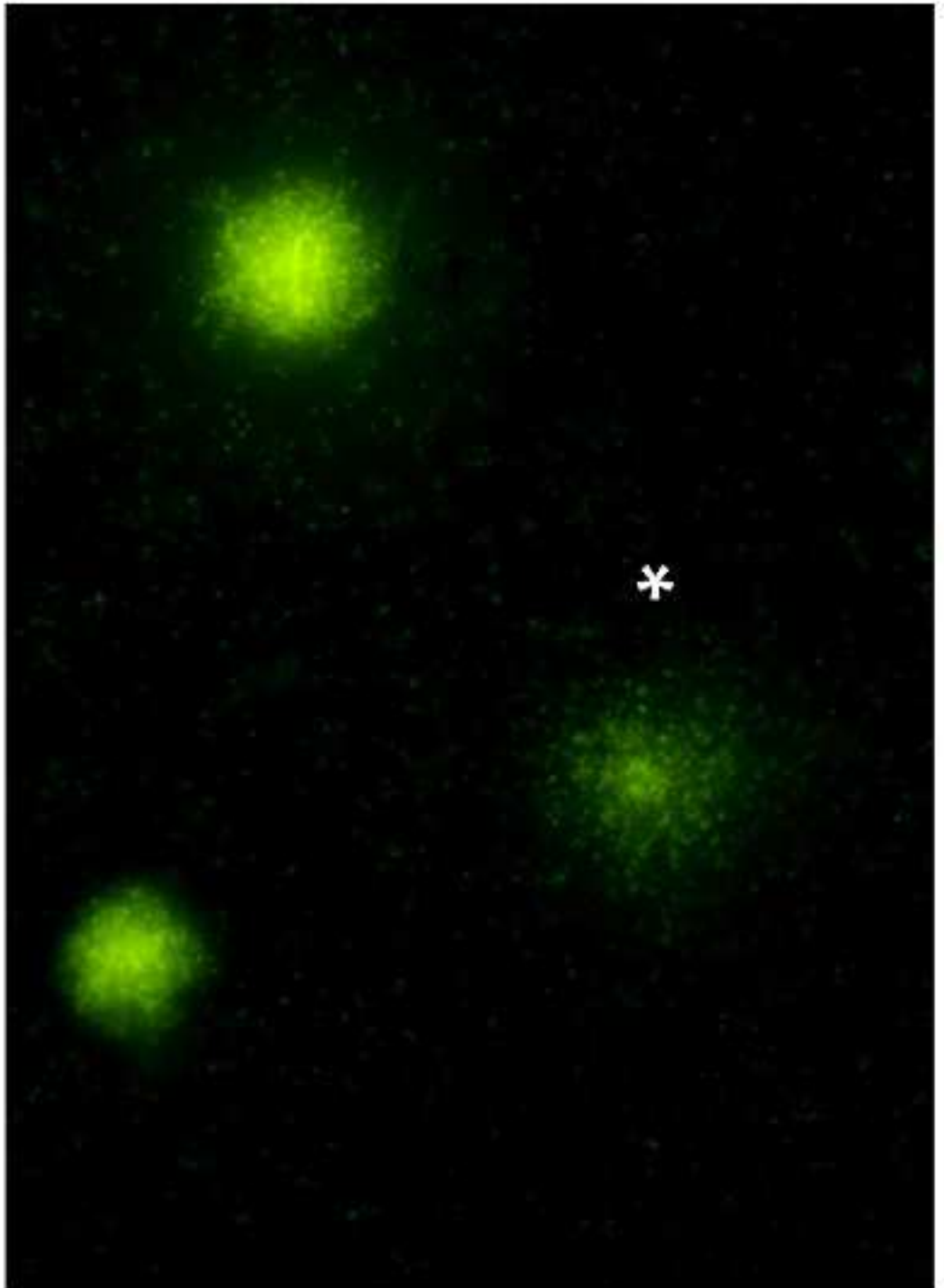


FIG. 7'

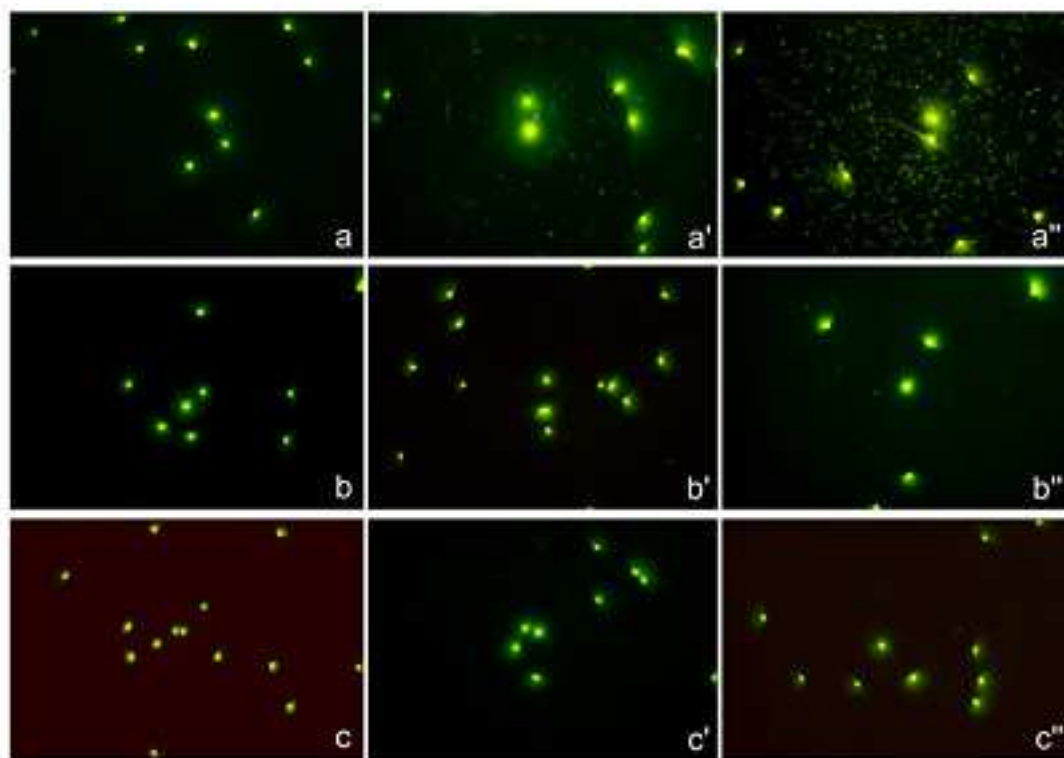


FIG. 8

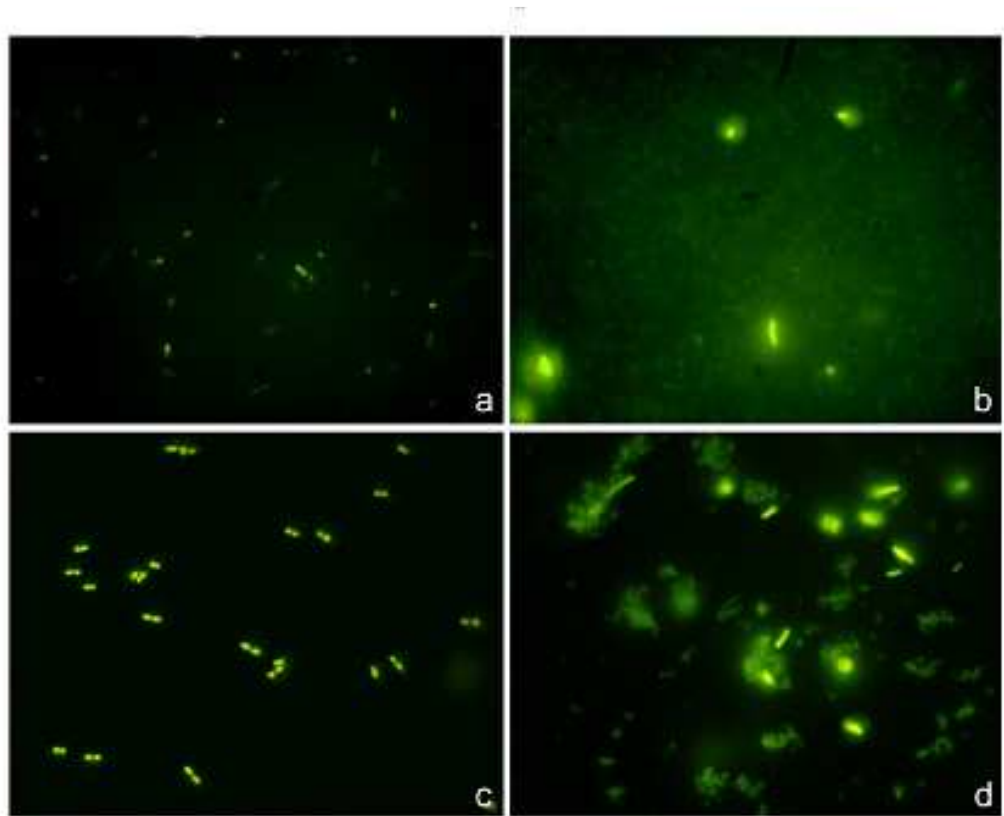


FIG. 9

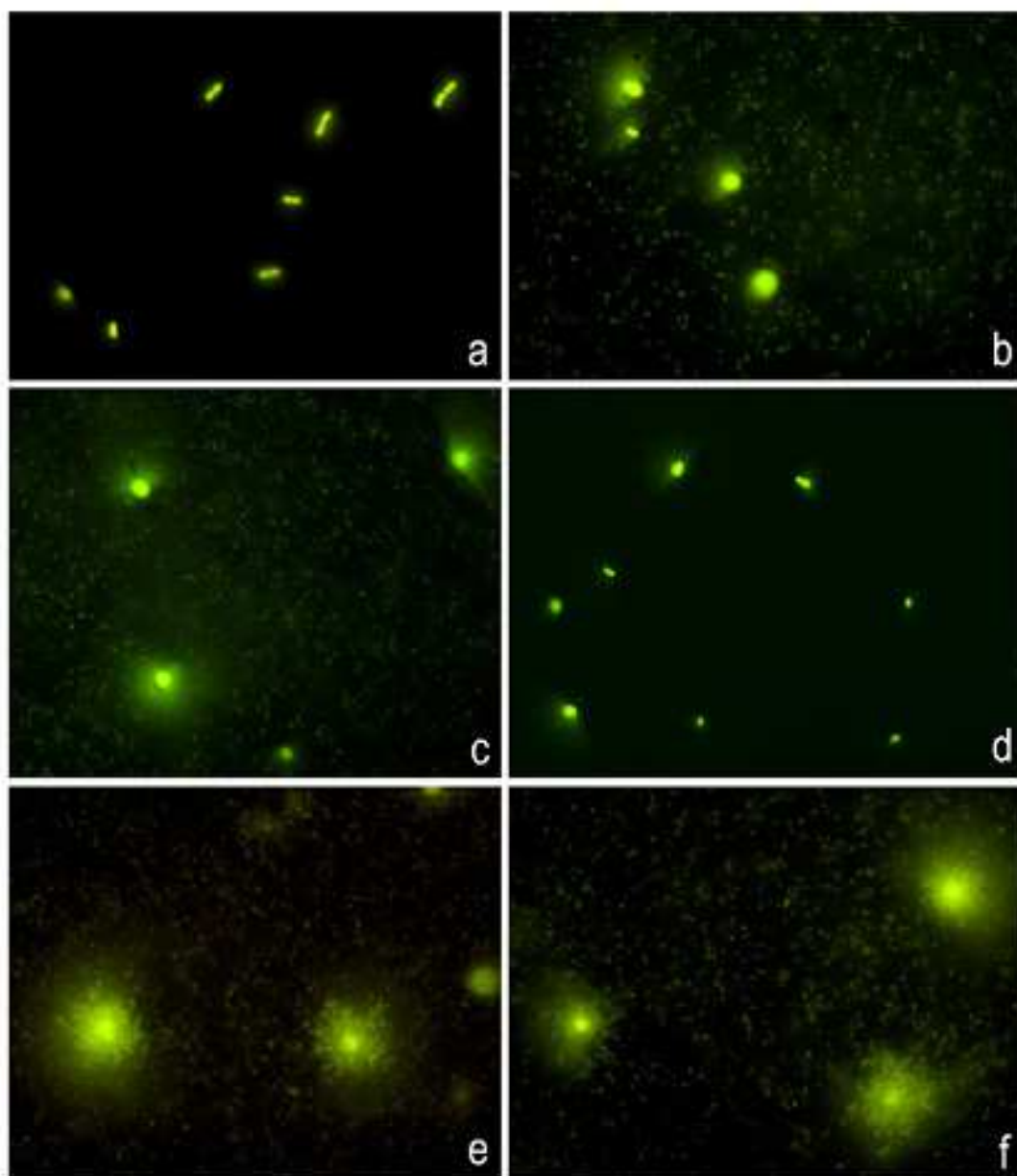


FIG. 10

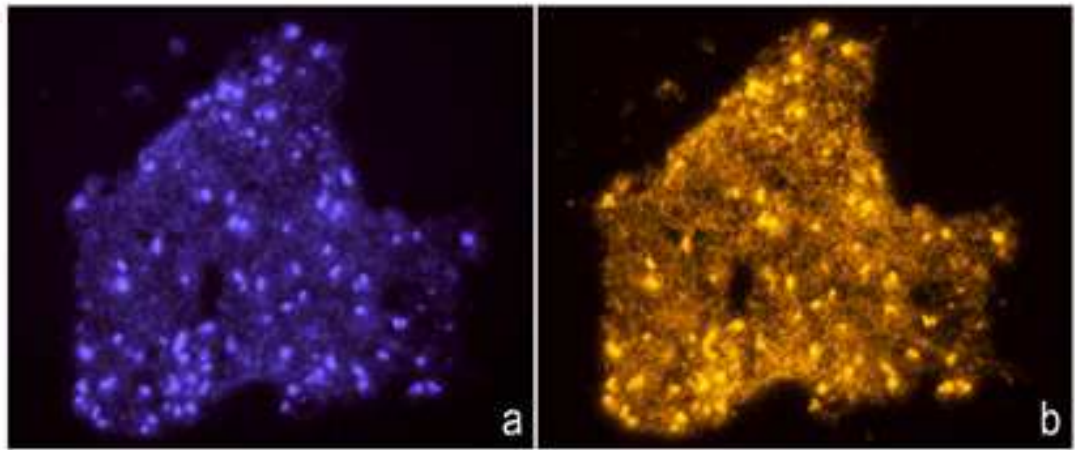


FIG. 11

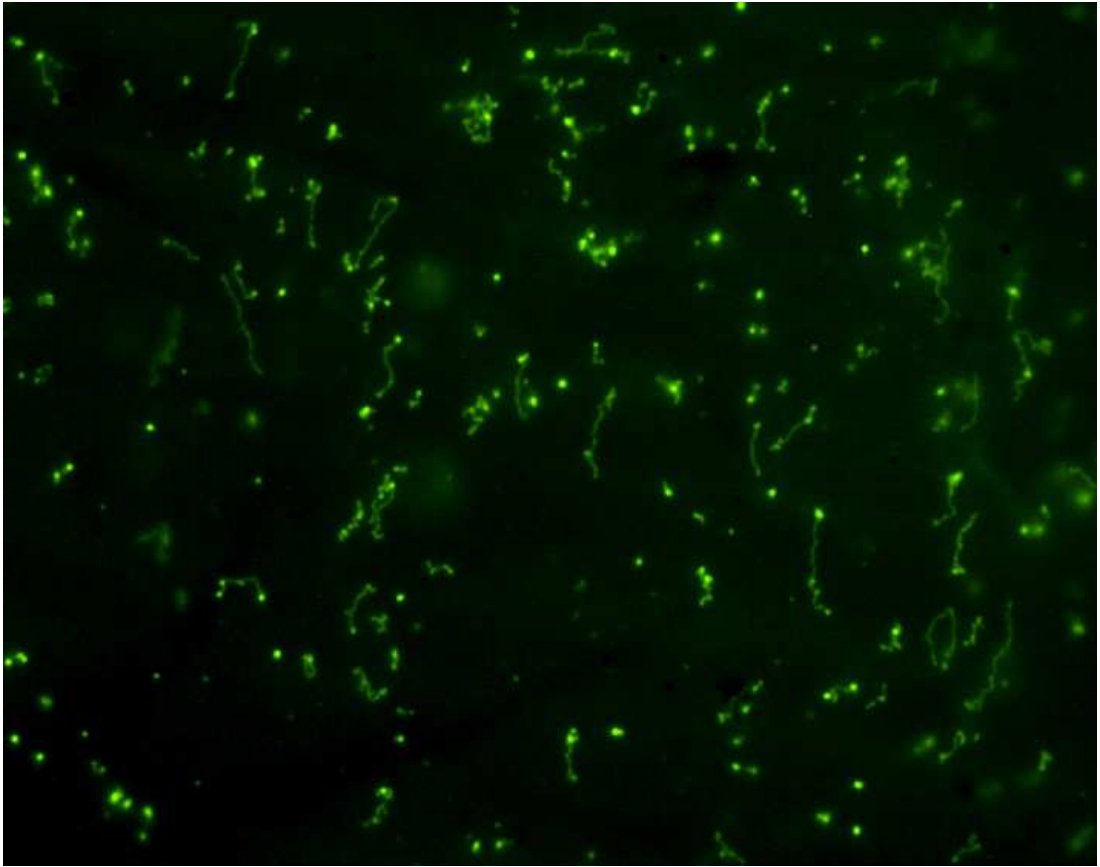


FIG. 12