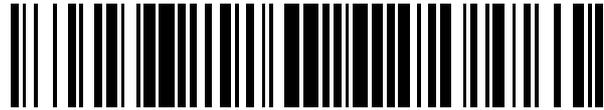


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 915**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2010 E 10759682 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2483420**

54 Título: **Método de detección de microorganismos**

30 Prioridad:

30.09.2009 FR 0904677

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2014

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS (33.3%)
3 Avenue Victoria
75004 Paris, FR;
INSTITUT PASTEUR (33.3%) y
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (33.3%)**

72 Inventor/es:

**RUPPE, ETIENNE;
ANDREMONT, ANTOINE;
RUIMY, RAYMOND;
COURVALIN, PATRICE y
BREMONT, SYLVIE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 493 915 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de detección de microorganismos

5 La invención se refiere al ámbito del diagnóstico y a la detección de bacterias resistentes a los antibióticos en una muestra.

10 La actividad de los antibióticos tiende a reducirse a lo largo del tiempo debido a la aparición y a difusión de mecanismos de resistencia bacteriana. Actualmente la comercialización de nuevas moléculas antibacterianas eficaces se ha ralentizado en gran medida, mientras que el uso extensivo en medicina humana y veterinaria de los antibióticos ha conducido a la difusión masiva y globalizada de los determinantes de la resistencia bacteriana.

15 Las β -lactaminas constituyen la familia de antibióticos más consumida en el mundo debido a su espectro de actividad antibacteriana amplio, su eficacia y su casi ausencia de efectos indeseables. Por consiguiente, los mecanismos de resistencia a estos antibióticos están ampliamente extendidos en el mundo bacteriano, especialmente entre las bacterias patógenas que son las enterobacterias.

20 El mecanismo de resistencia a las β -lactaminas más extendido entre las mismas es la producción de enzimas hidrolizantes denominadas β -lactamasas. Estas enzimas constituyen una familia muy heterogénea en términos de espectro de hidrólisis y de secuencia nucleotídica. Los genes que codifican estas enzimas están situados en el cromosoma de las bacterias o en elementos móviles como los plásmidos. Este soporte transmisible de bacteria a bacteria asegura al gen de resistencia una difusión importante. Si el origen de la mayoría de las β -lactamasas sigue siendo desconocido actualmente, se ha podido observar recientemente la movilización de genes de origen cromosómico sobre elementos móviles, entre ellos las cefalosporinasas plasmídicas.

25 Las cefalosporinasas tienen un espectro de hidrólisis amplio y el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias productoras de tales enzimas se limita a algunas moléculas (carbapenemas), cuya actividad puede verse comprometida en caso de existencia de otros mecanismos de resistencia.

30 La difusión de los genes de cefalosporinasas en las bacterias patógenas como *Escherichia coli* es un problema importante de Salud Pública, al mismo título que la difusión de las β -lactamasas de espectro ensanchado (BLSE). El único medio eficaz de luchar contra esta difusión en el seno de estructuras de salud es detectar los pacientes portadores de bacterias productoras de tales enzimas y tomar las medidas de higiene y de confinamiento necesarias para limitar las transmisiones de paciente a paciente. La detección de bacterias multiresistentes en la flora nasal (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, o SARM) o digestiva (enterobacterias productoras de BLSE, enterococo resistente a la vancomicina, o ERV) es hoy en día una práctica rutinaria en numerosas estructuras de cuidados. Sin embargo, la mayoría de las bacterias productoras de cefalosporinasas plasmídicas no son reconocidas por estos métodos, dando lugar a la difusión invisible de estos genes.

40 Numerosos autores han propuesto diversos métodos fenotípicos para poner de manifiesto la producción de cefalosporinasas en el seno de cepas bacterianas (1, 3-11). Sin embargo, la posición cromosómica o plasmídica del gen de resistencia (capital en términos de impacto de difusión y por lo tanto en términos de medidas de higiene a aplicar) solo se puede determinar por métodos moleculares para las bacterias susceptibles de producir su propia cefalosporinasa cromosómica. En efecto las secuencias nucleotídicas son virtualmente idénticas entre los genes en posiciones plasmídicas y los genes cromosómicos. Así pues, si la bacteria «parental» se encuentra frecuentemente en la flora de los pacientes, el riesgo es de desembocar en un gran número de falsos positivos en cuanto a la detección de las cefalosporinasas plasmídicas.

50 Perez-Perez y Hanson (J Clin Microbiol. Junio de 2002; 40(6): 2153-62) describen un procedimiento de determinación del origen plasmídico de un gen CMY-2 llevado por una bacteria que comprende una etapa de amplificación por PCR. Este procedimiento no permite distinguir entre el origen cromosómico o plasmídico del gen en presencia de una bacteria "parental" que tiene el mismo gen cromosómico (*Citrobacter freundii*).

55 La presente invención proporciona un método que permite detectar la presencia, en una muestra, de una bacteria que lleva un gen de cefalosporinasa de tipo CMY-2, en presencia o no de la bacteria «parental» *Citrobacter freundii*.

60 Esta detección es ahora posible por la puesta de manifiesto por los autores de la invención que el gen CMY-2 de origen plasmídico presenta una citosina (resp una guanina) en posición 373 (resp 437), el gen de origen cromosómico que presenta una adenosina (resp. una citosina).

El método de la invención permite de este modo diferenciar y caracterizar la localización (plasmídica o cromosómica) del gen CMY-2: el análisis específico de ambos nucleótidos mencionados anteriormente permite discriminar las cepas que llevan el gen concreto en posición plasmídica de las que lo llevan en posición cromosómica.

65 La invención se refiere de este modo a un método de detección de la presencia de al menos una bacteria resistente

5 a las β -lactaminas en una muestra y portadora de un gen CMY-2 plasmídico, caracterizado porque comprende la etapa de detección de la presencia de una molécula de ADN en dicha muestra, cuya secuencia presenta al menos el 90% de identidad, preferiblemente al menos el 95%, de manera más preferida al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99% de identidad con SEC ID N.º: 1 y cuyos nucleótidos 373 y 437 son respectivamente una citosina y una guanina.

10 SEC ID N.º: 1 representa de este modo un alelo plasmídico del gen CMY-2. Su secuencia puede variar debido a la diversidad genética. SEC ID N.º: 1 corresponde al acceso GenBank AM779745, correspondiente al gen blaCMY-2 para la beta-lactamasa CMY-2, aislado del plásmido pta de *Escherichia coli*.

Otros genes plasmídicos CMY-2 están asimismo disponibles en las bases de datos, con diversos números de acceso.

15 La presencia de estos dos nucleótidos (C373 y G437) en el gen CMY-2 es indicativa de la naturaleza plasmídica del gen. En efecto, los genes de origen cromosómico presentan respectivamente una adenosina y una citosina.

20 La consecuencia de estas mutaciones es la presencia de una arginina en posición 125 o 146 en las proteínas expresadas por el gen plasmídico, expresando los genes de origen cromosómico una proteína que comprende una serina en posición 125 y una treonina en posición 146.

Cabe señalar que el método según la invención permite teóricamente detectar la presencia de una única bacteria que contiene un CMY-2 plasmídico en la muestra (con condiciones de amplificación satisfactorias).

25 Ahora bien, el método según la invención no permite determinar si las bacterias portadoras del gen CMY-2 plasmídico son todas del mismo género o si existen diferentes géneros de bacterias que contienen el plásmido en la muestra. Son necesarias pruebas complementarias para precisar este punto y caracterizar la naturaleza de la bacteria portadora de la resistencia.

30 La muestra puede ser de cualquier tipo. Puede tratarse de una muestra biológica que ha sido extraída previamente de un paciente. Tal muestra puede ser, sin que esta lista sea exhaustiva, una muestra de saliva, una muestra de orina, fecal, sanguínea, o procedente de una biopsia, especialmente de una biopsia intestinal.

35 El método puede asimismo ser aplicado sobre una extracción realizada en una muestra alimentaria, en una superficie o en un utensilio, especialmente utilizable en medio hospitalario (verificación de la asepsia de la superficie o del utensilio).

El método según la invención permite de este modo determinar la presencia de bacterias que contienen un gen CMY-2 de origen plasmídico, incluso cuando la muestra contiene bacterias del género *Citrobacter freundii*.

40 En efecto, es efectivamente probable que el gen CMY-2 plasmídico sea derivado del gen cromosómico AmpC de *C. freundii* (2). Este gen AmpC presenta una secuencia cercana a SEC ID N.º: 1 (identidad superior al 80 % con SEC ID N.º: 1 y que puede ser superior al 90 % para ciertos alelos), pero cuyos nucleótidos 373 y 437 son respectivamente una adenosina y una citosina. Cabe señalar que la variabilidad existente entre los diferentes genes cromosómicos es más importante que la existente entre los diferentes genes plasmídicos.

45 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina comparando las dos secuencias alineadas de manera óptima, en una ventana de comparación.

50 En este marco de la presente invención, se alinean de este modo las dos secuencias en el conjunto de los 1143 nucleótidos que corresponden a la secuencia que codifica la proteína de resistencia a las β -lactaminas (1146 contando el codón de parada final). El porcentaje de identidad se calcula de este modo por la siguiente fórmula: porcentaje de identidad = (número de diferencias entre las dos secuencias) / 1143 x 100.

55 Algoritmos conocidos pueden permitir detectar las diferencias entre dos secuencias de manera automatizada y medir de este modo el porcentaje de identidad.

60 En una realización preferida, dicha etapa de detección de los polimorfismos comprende una etapa de amplificación del ADN presente en dicha muestra. Esto permite en efecto detectar la presencia de un número muy bajo de bacterias.

Esta amplificación se realiza por reacción de polimerización en cadena PCR utilizando cualquier iniciador que puede diseñarse por el experto en la técnica.

65 Se utilizan preferiblemente los iniciadores Citro_strt_F (5'-ATGATGAAAAAATCGATATGCTGCG-3', posiciones 1-25, SEC ID N.º: 2) y Citro_strt_R (5'-CAAACAGACCAATGCTGGAGTTAGC-3', posiciones 511-535, SEC ID N.º: 3) que amplifican un fragmento de 535 pb.

Se pueden asimismo utilizar los iniciadores Citro_F (5'-TGCTGCTGACAGCCTCTTTCTCC-3', posiciones 29-51, SEC ID N.º: 4) y Citro_R (5'- GGCGGGTTTACCTCAACGGC-3', posiciones 952-971, SEC ID N.º: 5), que amplifican un fragmento de 942 pb.

5 Se puede asimismo utilizar el par de iniciadores SEC ID N.º: 2 - SEC ID N.º: 5.

El experto en la técnica es capaz de diseñar otros tipos de iniciadores para amplificar el gen CMY-2. Sin embargo, los autores de la invención han mostrado que los iniciadores anteriores presentan una buena eficacia.

10 Se puede efectuar una amplificación con un solo par de iniciadores, o efectuar dos series de PCR, siendo realizada la segunda amplificación con iniciadores situados en el interior del primer fragmento amplificado.

15 Se utiliza preferiblemente una ADN-polimerasa de alta o muy alta fidelidad. En efecto, como se busca la presencia específica de nucleótidos definidos, es importante que la polimerasa no induzca mutaciones en el fragmento amplificado. Tales enzimas están disponibles comercialmente. Se pueden así citar las enzimas ADN-polimerasas de Phusion™ (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) que presentan una tasa de error del orden de $4,4 \times 10^{-7}$.

20 Durante la aplicación de la reacción de amplificación, se puede elegir amplificar solo el gen CMY-2, utilizando un corte de iniciadores apropiado, o amplificar, en la misma reacción, diferentes genes potencialmente presentes en la muestra (especialmente otros genes de resistencia a diversos antibióticos), utilizando una pluralidad de iniciadores diferentes. Se introducen de este modo en el tubo de reacción varios pares de iniciadores, siendo cada uno específico de un gen que se desea amplificar.

25 La detección de los nucleótidos polimorfos, indicadores de la presencia del gen CMY-2 plasmídico se efectúa de cualquier manera conocida en la técnica. El experto en la técnica conoce en efecto múltiples protocolos apropiados que pueden ser identificados en motores de búsqueda en Internet. Se puede especialmente mencionar www.ipbs.fr/formation/biotech/mutations.pdf.

30 De este modo se puede secuenciar el fragmento de ADN, en particular por el método de secuenciación de Sanger utilizando únicamente tres desoxinucleótidos y un didesoxinucleótido y un iniciador (especialmente un iniciador tal como el mencionado anteriormente). Los productos de secuencia se separan a continuación sobre gel de poliacrilamida y la presencia de la mutación se confirma por observación de la dimensión de los productos.

35 Asimismo se puede hacer una reacción de extensión de iniciador. En este caso, el iniciador utilizado se define de tal manera que el primer nucleótido a incorporar después de este iniciador corresponda al nucleótido polimorfo.

40 Sin embargo, de manera preferida, dicha etapa de detección comprende una etapa de hibridación del ADN (preferiblemente amplificado) con una sonda específica de una u otra mutación, o de ambas mutaciones. La hibridación de dos cadenas de ADN es debida al apareamiento de bases complementarias A-T y G-C y se disminuye durante el desapareamiento. La Tm de un oligonucleótido de 10 a 20 bases se reducirá si hay un desapareamiento. Para calcular la Tm de un oligonucleótido menor de 30 nucleótidos, se utiliza la siguiente relación: $Tm = 2(A + T) + 4(G + C)$, en la que A, T, G y C son respectivamente el número de cada una de estas bases en el oligonucleótido.

45 De este modo se puede utilizar el método «transferencia por puntos», fijando un oligonucleótido sonda portador de la mutación en una membrana de nitrocelulosa y aplicando el ADN presente en la muestra (o el ADN amplificado) en condiciones que permiten la hibridación específica del polimorfismo (la TM se calcula según la composición del oligonucleótido sonda elegido).

50 En este caso, la sonda se fija a un soporte sólido.

55 En una realización particular, la hibridación se realiza en un chip de ADN. Un primer punto contiene un oligonucleótido que presenta el polimorfismo del gen AmpC cromosómico de *Citrobacter freundii* y un segundo punto contiene un oligonucleótido que presenta el polimorfismo del gen CMY-2 plasmídico. Se amplifica y marca el ADN con un fluoróforo. A continuación se hibrida en los oligonucleótidos fijados al chip. Se observa una fluorescencia si hay hibridación.

60 Asimismo se puede detectar la presencia de los dos nucleótidos mencionados anteriormente por otros métodos. Después de la amplificación, se puede mezclar el producto de amplificación con ADN que no comprende las mutaciones e hibridar estos dos oligonucleótidos. Los desapareamientos son detectados entonces por corte enzimático (especialmente utilizando *CeII*) o químico. Este método de detección se conoce bien y se describen enzimas apropiadas especialmente en el documento EP 964929.

65 La invención se refiere asimismo a un kit para la detección de la presencia de al menos una bacteria resistente a las β -lactaminas en una muestra, poseyendo dicha bacteria un gen CMY-2 plasmídico.

El kit según la invención comprende iniciadores que permiten amplificar el gen CMY-2. Comprende asimismo una sonda que permite identificar la presencia de una citosina en posición 373 y/o de una guanina en posición 437, estando las posiciones determinadas respecto de SEC ID N.º: 1. Las sondas pueden ser representadas en forma deshidratada. Alternativamente, el kit puede contener un chip de ADN que comprende dichas sondas. El kit puede asimismo contener enzimas que permiten la amplificación del ADN diana, elementos que permiten el marcado del ADN. Preferiblemente, el kit según la invención contiene también instrucciones para la aplicación del método tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se ha buscado la naturaleza de los nucleótidos 373 y 437 del gen cromosómico *ampC* de 83 cepas de *C. freundii* de orígenes variadas: 62 cepas clínicas del hospital Bichat-Claude Bernard (Asistencia Pública de los Hospitales de París) aisladas entre octubre de 2006 y enero de 2009, 18 cepas de la Unidad de los Agentes Antimicrobianos del Instituto Pasteur de París, 4 cepas aisladas de la flora digestiva de Indios WaYampis que viven en La Guayana Francesa (proyecto «ERAES», AFFSET).

Estas cepas han sido identificadas como *C. freundii* por los métodos convencionales.

Se han estudiado también los nucleótidos de los genes *ampC* presentes en las bases de datos (números de acceso GenBank): CFRBL, CFRBLAC, X03866, X51632, Y15129, X76636, AF349569, AF349570, AF746169, AF125469, AF426097.

El gen *ampC* de *C. freundii* cuenta 1143 pares de bases (pb) (sin tener en cuenta el codón de PARADA).

El análisis de estos genes muestra que el nucleótido 373 de cada uno de estos genes es una adenosina. El nucleótido 437 de cada uno de estos genes es una citosina.

Inversamente, todos los genes que presentan una citosina en la posición 373 y de una guanina en posición 437 son de origen plasmídico: véanse especialmente los siguientes genes (números de acceso GenBank) AM779745, AM779746, AM779747, AM779748, AY899923, AY899924, AY899925, AY899926, AY899927, AY899928, AY899929, DQ173299, DQ355981, DQ478718, EF406116, EU113220, EU113221, EU113222.

Estos resultados muestran que la presencia de los nucleótidos C373 y G437 en un gen CMY-2 indica que es de origen plasmídico.

Listado de secuencias

<110> Asistencia Pública – Hospitales de París Instituto Pasteur
 <120> Método de detección de microorganismos
 <130> BRV 17 – WO
 <150> FR 09/04677
 <151> 30-9-2009
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1146
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 1

```

atgatgaaaa aatcgttatg ctgcgctctg ctgctgacag cctctttctc cacatttgct      60
gccgcaaaaa cagaacaaca gattgccgat atcgttaatc gcaccatcac cccgttgatg      120
caggagcagg ctattccggg tatggccggt gccgttatct accagggaaa accctattat      180
ttcacctggg gtaaagccga tatcgccaat aaccaccag tcacgcagca aacgctgttt      240
gagctaggat cggttagtaa gacgtttaac ggcgtgttgg gcgcgatgc tategccgcg      300
ggcgaaatta agctcagcga tccggtcacg aaatactggc cagaactgac aggcaaacag      360
tggcagggta tccgcctgct gcacttagcc acctatacgg caggcggcct accgctgcag      420
    
```

ES 2 493 915 T3

```

atccccgatg acgttaggga taaagccgca ttactgcatt tttatcaaaa ctggcagccg 480
caatggactc cggggcgtaa ggcactttac gctaactcca gcattggtct gtttggcgcg 540
ctggcgggtga aaccctcagg aatgagttac gaagaggcaa tgaccagacg cgtcctgcaa 600
ccattaaaac tggcgcatac ctggattacg gttccgcaga acgaacaaaa agattatgcc 660
tggggctatc gcgaagggaa gcccgtaac gtttctccgg gacaacttga cgccgaagcc 720
tatggcgtga aatccagcgt tattgatatg gcccgctggg ttcaggccaa catggatgcc 780
agccacgttc aggagaaaac gctccagcag ggcattgcgc ttgcgcagtc tcgctactgg 840
cgtattggcg atatgtacca gggattaggc tgggagatgc tgaactggcc gctgaaagct 900
gattcgatca tcaacggcag cgacagcaaa gtggcattgg cagcgcttcc cgccgttgag 960
gtaaaccgca cgcgcccgca agtgaaaagcc tcatgggtgc ataaaacggg ctccactggt 1020
ggatttgcca gctacgtagc ctctgttcca gaaaaaaccc ttggcatcgt gatgctggca 1080
aacaaaagct atcctaacc tgtccgtgtc gaggcggcct ggcgattct tgaaaagctg 1140
caataa 1146
<210>2
<211>25
<212>ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> iniciador Citro strt F
<400> 2
atgatgaaaa aatcgatag ctgcg 25
10 <210>3
<211>25
<212>ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> iniciador Citro_strt_R
<400> 3
caaacagacc aatgctggag ttagc 25
<210>4
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador Citro_F
<400> 4
25 tgctgctgac agcctcttc tcc 23
<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
30 <220>
<223> iniciador Citro_R
<400> 5
ggcgggttta cctcaacggc 20

```

REIVINDICACIONES

- 1.- Método de determinación del origen de un gen CMY-2 llevado por una bacteria, en una muestra, caracterizado porque comprende la etapa de búsqueda de la naturaleza de los nucleótidos 373 y 437 en dicho gen CMY-2, un gen CMY-2 de origen plasmídico que presenta una citosina (resp una guanina) en posición 373 (resp 437), un gen CMY-2 de origen cromosómico que presenta una adenosina (resp una citosina), estando las posiciones determinadas respecto de SEC ID N.º: 1.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha muestra contiene bacterias del género *Citrobacter freundii*.
3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque comprende una etapa de amplificación del ADN presente en dicha muestra.
4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende una etapa de hibridación del ADN con una sonda específica de una u otra mutación.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha sonda está fijada a un soporte sólido.
6. Kit para la detección de la presencia de una bacteria resistente a las β -lactaminas y portadora de un gen CMY-2 plasmídico, en una muestra, que comprende instrucciones para la aplicación de un método según una de las reivindicaciones 1 a 5, así como una sonda que permite identificar la presencia de una citosina en posición 373 y/o de una guanina en posición 437, estando las posiciones determinadas respecto de SEC ID N.º: 1, conteniendo dicho kit asimismo iniciadores que permiten amplificar el gen CMY-2.