

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 013**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11712939 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2542688**

54 Título: **Procedimiento rápido de detección de enzimas y de microorganismos**

30 Prioridad:

01.03.2010 FR 1051441

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**BIO-RAD INNOVATIONS (100.0%)
3, Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-La-Coquette, FR**

72 Inventor/es:

**DALLENNE, CAROLINE y
FAVIER, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 582 013 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

Procedimiento rápido de detección de enzimas y de microorganismos

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento rápido de detección de enzimas y de microorganismos.

[0002] Los procedimientos de detección de microorganismos en una muestra clínica comprenden en general las etapas siguientes:

10

1) Tratamiento opcional de la muestra de manera que favorezca el crecimiento bacteriano, variando la duración de esta etapa en función de la naturaleza de la muestra (sangre, orina, pus, heces, líquido cefalorraquídeo, otros líquidos de punciones) y en función de la carga bacteriana;

2) Siembra de uno o de varios medios de crecimiento de gelosa selectivos o no;

15 3) Incubación durante 18 a 48 h a 37°C;

4) Observación de los diferentes tipos de colonias obtenidas (tamaño, aspecto, color...)

5) Recuperación de uno o varios aislados de cada tipo de colonias;

6) Identificación propiamente dicha, si es necesario con el uso de un autómata o de una galería de identificación;

20 7) Realización de un antibiograma en paralelo que induce un retraso mínimo de 16 h o realización consecutiva de un antibiograma que induce un retraso suplementario de 18 h para determinar el perfil del microorganismo con respecto a los antibióticos y/o antifúngicos.

[0003] El diagnóstico de una infección por microorganismos es así generalmente largo, dependiendo la duración sobre todo de la naturaleza de la muestra para analizar. Este retraso de espera es especialmente problemático cuando la muestra para analizar es una muestra de sangre. De hecho, cuando se busca la presencia de microorganismos en la sangre, la primera etapa de tratamiento de la muestra en hemocultivo, que permite alcanzar el umbral de detección del microorganismo, puede durar hasta 7 días. La duración de esta primera etapa de tratamiento no puede reducirse, ya que depende de los autómatas. Al menor signo de positividad del cultivo, se efectúa una coloración de Gram en una muestra obtenida por punción aséptica del opérculo con ayuda de una jeringa estéril. Este examen directo permitirá reconocer la morfología del agente bacteriano presente en el frasco lo que puede orientar la identificación del germen. La información se transmite entonces de inmediato al clínico, ya que puede permitirle instituir un tratamiento antibiótico todavía no iniciado o incluso rectificar una antibioterapia probabilista. No obstante, en este nivel no es posible ninguna caracterización precisa del microorganismo en cuestión y menos aún de un perfil de resistencia concreto. Así pues es especialmente útil poder identificar a continuación rápidamente los microorganismos presentes en la muestra biológica así como sus posibles fenotipos de resistencia con el fin de iniciar o rectificar un tratamiento antibiótico.

[0004] En los hemocultivos positivos pueden estar presentes diferentes tipos de microorganismos. Es cierto que los estafilococos (no sólo *Staphylococcus aureus* sino también los estafilococos de coagulasa negativa) se encuentran regularmente. Por ejemplo, se han detectado bacilos gramnegativos, sobre todo *Escherichia coli* (y más en general enterobacterias), bacterias anaerobias del colon, miembros del grupo *Klebsiella/Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp, y *Providencia* spp, después de un traumatismo o con posterioridad a una intervención quirúrgica realizada en un lugar ya contaminado del cuerpo. La detección de salmonelas en la sangre de individuos que tienen una salmonelosis sistémica no es rara. Se han encontrado otros muchos géneros microbianos a partir de un cultivo de muestras de sangre tales como estreptococos, enterococos, *Brucella*, *Pasteurella*, neumococos, *Neisseria*, *Listeria*, *Clostridium*, corinebacterias, *Bacteroides*, bacterias del grupo hacek pero también levaduras y parásitos.

[0005] Se usan diferentes técnicas para identificar con precisión estos microorganismos y sus posibles fenotipos de resistencia, pero los resultados sólo se obtienen en general al final de un periodo relativamente largo.

[0006] Así pues, se escalonan tomas de muestras en medio de sangre fresca y medio de sangre cocida, a las que pueden añadirse otros medios en función de los resultados de los exámenes microscópicos.

55 **[0007]** Para cada frasco positivo, se realiza:

- la determinación de la morfología de las colonias,
- las pruebas de oxidasa y de catalasa,
- una identificación bioquímica y antigénica para identificar el microorganismo,

- pruebas de sensibilidad, evaluación de las Concentraciones Mínimas Inhibidoras (CMI).

[0008] Se ha demostrado que era posible efectuar un antibiograma directamente a partir de un hemocultivo positivo realizando un inóculo equivalente a 0,5 McF a partir del caldo de hemocultivo. Se inocula una gelosa 5 Mueller-Hinton por técnica "de inundación". La correlación con el antibiograma normalizado se encontrará en el 95% de los casos. El resultado aparece entonces antes de 16 h tras la puesta en evidencia del hemocultivo positivo (Antibiotics In Laboratory Medicine, Victor Lorian, M.D. Editor, 5ª edición; Doern y col., 1981, Antimicrob Agents Chemother. 20(5): 696-698. Antimicrobial Agents).

10 **[0009]** Existe así una necesidad importante de nuevos procedimientos más rápidos de detección de microorganismos, y/o de sus posibles resistencias asociadas, en una muestra biológica, debiendo estos procedimientos conservar una sensibilidad y una especificidad satisfactorias.

15 **[0010]** Las β -lactaminas representan la familia de antibióticos más importante debido al gran número de moléculas que la conforman y por sus propiedades farmacológicas y espectros asociados que permiten combatir la mayor parte de las especies bacterianas. Las β -lactaminas son por mérito propio los antibióticos más prescritos en medicina general. Su espectro de actividad es variable en función de su clase (penicilinas o cefalosporinas) y a veces en función de las moléculas en cada clase. Así, las penicilinas G y V son más activas en los cocos grampositivos y las bacterias anaerobias, mientras que el espectro de las aminopenicilinas se extiende a algunos 20 bacilos gramnegativos. La incorporación de un inhibidor de β -lactamasas permite además observar una actividad en determinadas bacterias que producen estas β -lactamasas. Las cefalosporinas extienden aún más el espectro de actividad hacia los bacilos gramnegativos pero son algo menos activas en los cocos grampositivos.

25 **[0011]** Entre las β -lactaminas, las cefalosporinas representan la categoría de antibióticos prescrita con más frecuencia. El uso habitual de las cefalosporinas ha conllevado la difusión de cepas resistentes con respecto a estas moléculas. Estas cepas llegan a sobrevivir todo a la presión de la selección de las cefalosporinas por parte de una actividad β -lactamasa. La detección de resistencias combinadas con respecto a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación (C3G) en las enterobacterias ha adquirido una importancia terapéutica de primer 30 orden. De hecho, la resistencia de las enterobacterias a los antibióticos experimenta una evolución mundial preocupante con un impacto creciente de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que se difunden sobre todo en el sector comunitario. En 2002, menos del 1% de las cepas de enterobacterias tenían una BLEE. En 2006, representaban del 1 al 5% de las cepas.

35 **[0012]** La resistencia a las C3G, ya se deba a las BLEE o a otras β -lactamasas (cefalosporinasa o carbapenemasa) se encuentra así en aumento y se ha vuelto significativa, sobre todo para *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La emergencia de estas enzimas se ha comunicado recientemente en bacilos gramnegativos no fermentantes tales como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Así pues es cada vez más importante poder detectar estas BLEE.

40 **[0013]** La detección de BLEE en las enterobacterias es sencilla de aplicar en la mayor parte de los casos: se objetiva por una sinergia entre la mezcla [amoxicilina + ácido clavulánico (AMC)] y una C3G (la ceftazidima es la más sensible) o aztreonam. No obstante, la obtención de un resultado requiere mucho tiempo. La prueba de sinergia se realiza disponiendo los discos de AMC y de la C3G escogida (o de aztreonam) a 30 mm de distancia, centro con 45 centro. La detección de las BLEE es en cambio más difícil en cepas igualmente hiperproductoras de cefalosporinasa (AmpC) como *Enterobacter*. En este último caso, es más sencillo visualizar la sinergia entre AMC y cefepima o cefpiroma. Finalmente, en determinadas especies como *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* y *Providencia rettgeri*, las BLEE tienen una expresión débil y, por tanto, son más difíciles de detectar. En estos casos, la prueba de sinergia se optimiza colocando los discos a una distancia de 40-45 mm, en lugar de 30 mm, según las recomendaciones de CA-SFM (Comité de Antibiograma de la Sociedad 50 Francesa de Microbiología) en 2007. Los autómatas de bacteriología para la identificación y el antibiograma son cada vez más usados (Mini-Api® comercializado por bioMérieux Clinical Diagnostics, Phoenix® comercializado por BD Diagnostics, MicroScan® comercializado por Siemens, Vitek®, Vitek-2® y Vitek Compact® comercializados por bioMérieux). De forma general, estos autómatas detectan relativamente bien las BLEE en las cepas que no hiperproducen normalmente cefalosporinasas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*). Para las demás especies 55 (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, etc.), su sensibilidad y sobre todo su especificidad son algo peores que las de los procedimientos manuales. En tal caso se consideran necesarias pruebas complementarias.

[0014] La detección de cepas resistentes a las C3G puede facilitarse así para determinadas resistencias

relacionadas con ciertas especies pero, de una forma general, ningún procedimiento posee el 100% de sensibilidad ni permite obtener un resultado rápido.

5 **[0015]** Se han propuesto numerosas mejoras para acelerar el proceso de la detección y de la identificación de los microorganismos presentes en particular en los hemocultivos. En primer lugar, las mejoras de los medios de cultivo y de las técnicas de crecimiento han reducido los retrasos de cultivo. La última generación de autómatas puede detectar incluso un bajo crecimiento bacteriano. Con independencia de las técnicas clásicas, cuando el crecimiento es detectado por el autómata, es posible igualmente efectuar una identificación directa de las bacterias por biología molecular (amplificación y secuenciación, FISH, chips de ADN o sondas específicas,...). No obstante, en su mayor parte estos sistemas no suelen ser abiertos y permiten sólo la detección de un único o de un número bajo de microorganismos específicos. Además, no pueden suministrar información sobre la susceptibilidad o la resistencia presunta frente a un antibiótico. Además, estos procedimientos son eficaces pero caros y/o exigen cualificaciones elevadas de los técnicos de laboratorio.

15 **[0016]** Se han descrito tentativas para acelerar la detección más específica de los microorganismos resistentes a una familia de antibióticos. Así, Weinbren y Borthwick (Weinbren y Borthwick, 2005, J. Antimicrob. Chemother. 55:131-132) han descrito un procedimiento de detección no cromógena de microorganismos que producen BLEE, en un hemocultivo, en el que se toma una muestra del hemocultivo y se introduce en un medio de gelosa, a continuación de lo cual se aplican en el medio discos de cefpodoxima y cefpodoxima-clavulanato. No obstante, esta etapa de cultivo en medio de gelosa necesita una espera adicional mínima de 3,5 h a 6 h antes de poder obtener un primer resultado después del fin del tratamiento en hemocultivo.

25 **[0017]** Navon-Venezia y col. (Navon-Venezia y col., 2005, J. Clin. Microb. 43:439-441) han descrito un procedimiento de detección de bacterias que producen BLEE a partir de hemocultivos positivos consistente en tomar una muestra del caldo de hemocultivo y sembrarla directamente en un medio de Mueller-Hinton que contiene discos de cefpodoxima y cefpodoxima + clavulanato, sin pasar por una etapa de aislamiento en medio de gelosa. En este procedimiento no se aplica ningún agente cromógeno, que necesita una etapa de cultivo de 16 h a 18 h de acuerdo con las recomendaciones recogidas en la referencia estadounidense CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee on Clinical Laboratory Standards).

30 **[0018]** Chapin y Musgnug (2003) (Chapin y Musgnug, 2003, J. Clin Microb. 41:4751-4754) han descrito un procedimiento directo de prueba de la sensibilidad en antimicrobianos a partir de hemocultivos positivos, consistente en centrifugar 10 ml del hemocultivo inoculado en un tubo separador de suero que contiene un gel. Los microorganismos que permanecen en la superficie del gel son recuperados a continuación y puestos de nuevo en suspensión con el fin de inocular microplacas que comprenden diferentes diluciones de antibióticos específicas. Sin embargo, el resultado sólo se obtiene 18 a 24 h después de la inoculación.

35 **[0019]** Chen y col. (2008) (Chen y col., 2008, J. Microbiol. Immunol. Infect. 41:259-264) han descrito un procedimiento de identificación de la sensibilidad de microorganismos para un grupo de antibióticos a partir de hemocultivos positivos, consistente en tomar un hemocultivo positivo, eliminar los hematíes por lisis y centrifugado, poner en suspensión el depósito bacteriano en una solución salina y probarlo en el sistema Vitek-2® o AST (antimicrobial susceptibility testing). No obstante, es necesario esperar entre 2 h 30' y 16 h 15' después de la carga en el sistema Vitek-2® o AST antes de poder observar los primeros resultados.

45 **[0020]** El equipo de Jain y col. (Jain y col., 2007, J. Antimicrob. Chemother. 60:652-654) ha descrito igualmente un procedimiento relativamente rápido de detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante coloración del sobrenadante de caldo de hemocultivo después del centrifugado. Debido a los problemas de hemólisis que interfieren con el cambio de color del agente cromógeno, los autores han propuesto efectuar previamente a la prueba un subcultivo en un medio nuevo, con lo que se prolonga la duración del procedimiento.

50 **[0021]** Estas técnicas que detectan los microorganismos resistentes a continuación de una etapa de subcultivo siguen siendo así relativamente largas.

[0022] La solicitud internacional WO-2009/051.838 describe además un procedimiento de detección de β -lactamasas que comprende etapas de puesta en contacto de una muestra biológica con un sustrato cromóforo que puede ser el compuesto HMRZ-86, y diferentes inhibidores, lo que permite la discriminación de diferentes β -lactamasas, pero no incluye etapa de concentración de los microorganismos presentes en la muestra y de nueva suspensión de los microorganismos en una solución que comprende el compuesto HMRZ-86.

[0023] Los autores de la invención han puesto a punto un procedimiento de detección más rápido, que permite detectar fenotipos de resistencias precisas tales como las conferidas a las bacterias gramnegativas con respecto a las cefalosporinas de tercera generación, directamente a partir de la muestra clínica, o después de una etapa de subcultivo, pero sin pasar por una etapa de selección de aislado en medio de gelosa, y usando un sustrato cromógeno o fluorógeno.

[0024] La presente invención se refiere a un procedimiento de detección *in vitro* de una enzima de un microorganismo resistente a las cefalosporinas de tercera generación a partir de una muestra biológica, estando dicha enzima para detección seleccionada entre el grupo constituido por β -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

a1) concentrar los microorganismos presentes en la muestra biológica, opcionalmente después de una etapa a0) de cultivo de los microorganismos;

b1) poner en suspensión los microorganismos concentrados en la etapa a1) en una solución que comprende al menos un sustrato cromógeno susceptible de liberar un cromóforo después de hidrólisis por la enzima para detección, siendo dicho sustrato cromógeno el compuesto trifluoroacetato de ácido HMRZ-86 ((7R)-7-[2-(aminotiazol-4-il)-(z)-2-(1-carboxi-1-metilotoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, isómero E) o una sal del mismo;

c1) detectar la posible liberación del cromóforo obtenida en la etapa b1);

siendo la liberación del cromóforo detectada en la etapa c1) indicativa de la presencia de la enzima para detección y

comprendiendo además dicho procedimiento, cuando la muestra biológica es una muestra que contiene sangre o hematíes:

- una etapa de lisis de los hematíes presentes en la muestra biológica antes de la etapa b1) de puesta en suspensión o antes de la etapa a1) de concentración, y/o

- una etapa a') de preparación de la muestra biológica antes de la etapa a1) de concentración de microorganismos, comprendiendo la etapa a');

(i) la aglutinación de los hematíes, y

(ii) la separación de los hematíes aglutinados de los microorganismos presentes en la muestra.

[0025] La presente solicitud describe un procedimiento de detección *in vitro* de una enzima de un microorganismo a partir de una muestra biológica que comprende las etapas que consisten en:

a1) concentrar los microorganismos presentes en la muestra biológica, opcionalmente después de una etapa a0) de cultivo de los microorganismos;

b1) poner en suspensión los microorganismos concentrados en la etapa a1) en una solución que comprende al menos un sustrato cromógeno o fluorógeno susceptible de liberar un cromóforo o un fluoróforo después de hidrólisis por la enzima para detección;

c1) detectar la posible liberación del cromóforo o del fluoróforo obtenida en la etapa b1);

siendo la liberación del cromóforo o del fluoróforo detectada en la etapa c1) indicativa de la presencia de la enzima para detección.

[0026] La presente solicitud describe igualmente un procedimiento de preparación *in vitro* de una muestra de hemocultivo que contiene microorganismos, que comprende las etapas que consisten en:

A) lisar o aglutinar los hematíes presentes en la muestra de hemocultivo sin lisar los microorganismos presentes en la muestra de hemocultivo,

B) separar los microorganismos presentes en la muestra de hemocultivo de los hematíes lisados o aglutinados en la etapa A), y

C) opcionalmente lavar los microorganismos de la muestra de hemocultivo separados en la etapa B).

[0027] La presente solicitud describe además un procedimiento de detección *in vitro* de microorganismos a partir de una muestra biológica que aplica el procedimiento de detección de enzima anterior.

Descripción detallada de la invención

[0028] En el contexto de la invención, una "muestra biológica" hace referencia a una sustancia de origen biológico. Preferentemente, la muestra biológica es una muestra de un fluido biológico. Los ejemplos de muestras biológicas comprenden, pero no se limitan a, la sangre y sus componentes, la orina, las heces, el líquido cefalorraquídeo u otros líquidos de punción. Preferentemente, la muestra biológica según la invención se selecciona entre el grupo constituido por una muestra de sangre y una muestra de orina.

Enzimas

10 **[0029]** En el contexto de la invención, la expresión "enzima de un microorganismo" hace referencia a una macromolécula de naturaleza proteica expresada por un microorganismo, y que se caracteriza por su actividad catalítica que rige reacciones bioquímicas específicas en el microorganismo o en el exterior del microorganismo cuando esta enzima es secretada por el microorganismo.

15 **[0030]** Preferentemente, la enzima descrita en el presente documento se selecciona entre el grupo constituido por glucosidasas, esterases, fosfatasas, β -lactamasas, en particular penicilinasas, cefalosporinasas, carbapenemasas, oxacilinasas, metalo- β -lactamasas y β -lactamasas de espectro extendido. De forma especialmente preferida, la enzima descrita en el presente documento se selecciona entre el grupo constituido por β -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas, carbapenemasas, glucosidasas y esterases. La enzima
20 según la invención se selecciona entre el grupo constituido por β -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas. Preferentemente, la enzima es una enzima capaz de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación.

[0031] Por "glucosidasa" u "osidasa", se entiende en este caso una enzima del grupo de las hidrolasas que
25 actúa en el enlace glucosídico de oligósidos y glucósidos. Como es bien conocido por el experto en la materia, la especificidad de una glucosidasa depende de la naturaleza del azúcar unido por enlace glucosídico. En la nomenclatura de las enzimas, las glucosidasas pertenecen a la clase 3 (que corresponde a las hidrolasas), subclase 2 (código EC3.2). Las glucosidasas comprenden en particular glucosidasas, xilanasas, galactosidasas, lactasas, amilasas, quitinasas, fructosidasas, maltasas, neuraminidasas, invertasas, hialuronidasas y lisozimas. Más en
30 particular, las glucosidasas se seleccionan entre el grupo constituido por N-acetil- β -galactosaminidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -amilasa, α -arabinofuranosidasa, α -arabinosidasa, β -celobiosidasa, β -quitobiosidasa, α -fucosidasa, β -fucosidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, α -maltosidasa, β -maltosidasa, α -mannosidasa, β -mannosidasa y β -xilosidasa.

35 **[0032]** Por "esterasa", se entiende en este caso una enzima del grupo de las hidrolasas que divide los ésteres en ácido y alcohol. Como es bien conocido por el experto en la materia, las esterases difieren según su especificidad al sustrato, su estructura proteica y su función biológica. En la nomenclatura de las enzimas, las esterases pertenecen a la clase 3 (correspondiente a las hidrolasas), subclase 1 (código EC3.1). Las esterases comprenden en particular las hidrolasas de monoéster trifosfórico, las sulfatasas, las hidrolasas de monoéster
40 difosfórico, las hidrolasas de triéster fosfórico, las exodesoxirribonucleasas, las exorribonucleasas, las exonucleasas, las desoxirribonucleasas, las ribonucleasas, las endodesoxirribonucleasas y las endorribonucleasas.

[0033] Por "fosfatasa", se entiende en este caso una enzima que elimina un grupo fosfato de una molécula simple o de una macromolécula biológica, hidrolizando los monoésteres de ácido fosfórico en un ion fosfato y una
45 molécula con un grupo hidroxilo libre. En la nomenclatura de las enzimas, las fosfatasas pertenecen a la clase 3 (correspondiente a las hidrolasas), subclase 1.3 (código EC3.1.3). Como es bien conocido por el experto en la materia, las fosfatasas difieren según su especificidad al sustrato. Las fosfatasas comprenden en particular las tirosina-fosfatasas, las serina/treonina-fosfatasas, las fosfatasas de doble especificidad, las histidina-fosfatasas y las lípido-fosfatasas.

50 **[0034]** Por " β -lactamasa", se entiende en este caso una enzima que hidroliza las β -lactaminas con apertura del núcleo β -lactama y producción de derivados inactivos. Las β -lactamasas son secretadas generalmente en el medio exterior en bacterias grampositivas, y en el espacio periplásmico en bacterias gramnegativas. Entre otros, agrupan las cefalosporinasas, las β -lactamasas de espectro extendido y las carbapenemasas. Las β -lactamasas se
55 agrupan según dos clasificaciones principales:

- la clasificación de Bush, elaborada en 1989 y reactualizada en 1995 y después en 2009, clasifica las β -lactamasas en función de su sustrato preferente entre penicilina, oxacilina, carbapenemina, cefaloridina, cefotaxima e imipenem, y

en función de su sensibilidad en ácido clavulánico, un inhibidor de las β-lactamasas;

- la clasificación de Ambler, propuesta en 1980, se basa la secuencia proteica de las β-lactamasas. Se compone de cuatro clases de enzimas: A, B, C y D. Las β-lactamasas de las clases A, C y D incluyen una serina en el sitio activo, que forma un enlace covalente transitorio con la β-lactamina, conllevando la abertura del núcleo β-lactama. Estas β-lactamasas se denominan también serina β-lactamasas. La clase B agrupa de por sí metaloenzimas que necesitan ion cinc para hidrolizar el núcleo β-lactama.

[0035] Las β-lactamasas son numerosas y están diversificadas, en función de sus propiedades. Son responsables de la resistencia a las β-lactaminas como penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, cefamicinas y carbapenemes. Inactivan estos antibióticos por hidrólisis del núcleo β-lactama. Entre las β-lactamasas, la β-lactamasa TEM-1 está muy extendida en las diferentes especies bacterianas. Hidroliza con mucha eficacia las penicilinas, pero no las cefalosporinas de tercera generación, y es sensible a la inhibición por el ácido clavulánico. Las bacterias que producen β-lactamasas de esta categoría son así tratadas fácilmente por las cefalosporinas de tercera generación (C3G). En cambio, las BLEE, algunas cefalosporinas y las carbapenemasas, cuando son producidas por bacterias, las hacen resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (C3GR).

[0036] Las secuencias de aminoácidos de las β-lactamasas son muy cercanas entre sí dentro de una misma familia. Basta así con sustituir un pequeño número de aminoácidos para permitir que las β-lactamasas de tipo TEM-1, inicialmente inactivas, hidrolicen las cefalosporinas β-lactamasas de tipo BLEE, por ejemplo, o se vuelvan resistentes a los inhibidores.

[0037] El **tabla 1** ofrecida a continuación describe las propiedades de los diferentes tipos de β-lactamasas, en particular las cefalosporinasas, las β-lactamasas de espectro extendido y las carbapenemasas.

Tabla 1: Tabla resumen y no exhaustiva que describe las propiedades de las β-lactamasas principales que confieren (C3GR) o no resistencia a las C3G.

| | Ejemplos | Inhibido por el clavulanato | Clase molecular (Ambler) | C3GR |
|--|---|-----------------------------|--------------------------|------|
| β-lactamasa de gran espectro (penicilinasas) | TEM-1, TEM-2, SHV-1 | +++ | A | No |
| | Familia OXA (OXA-1) | + | D | No |
| β-lactamasa de espectro extendido (BLEE) | Familias TEM, SHV, CTX-M | ++++ | A | Sí |
| | Familia OXA (OXA-11,-14,-15,-16,-17) | + | D | Sí |
| Cefalosporinasas o AmpC | Cromosómicas | 0 | C | No |
| | Hiperproductos plasmídicos: ACC-1, familia CMY, DHA-1 | 0 | C | Sí |
| Carbapenemasas | Familias IMP, VIM (metalo-β-lactamasas) | 0 | B | Sí |
| | Familia KPC | +++ | A | Sí |
| | Familia OXA (OXA 23-27, OXA-40, OXA-48) | + | D | Sí |

Microorganismos

[0038] Por "microorganismo", se entiende en este caso un organismo vivo que presenta una estructura celular eucariota o procariota, o que es acariota, y que se caracteriza por la unicelularidad, un tamaño microscópico o ultramicroscópico y un potencial metabólico y de reproducción. Los microorganismos según la invención comprenden en particular bacterias, sobre todo bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas, y hongos, sobre todo levaduras (por ejemplo, del género *Candida*). Más específicamente, puede tratarse de una bacteria seleccionada entre el grupo constituido por:

- Enterobacteriaceae tales como las cepas del género *Klebsiella*, en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*; las cepas del género *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*; las cepas del género *Enterobacter*, en particular *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* y *Enterobacter aerogenes*; las cepas del género *Citrobacter*, en particular *Citrobacter freundii* y *Citrobacter koseri*; las cepas del género *Proteus*, en particular *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Proteus rettgeri*; las cepas del género *Serratia*, en particular *Serratia marcescens*; las cepas del

género *Salmonella*, las cepas del género *Providencia*, las cepas del género *Shigella* y las cepas del género *Kluyvera*, *Morganella morganii* y *Hafnia alvei*;

- bacilos gramnegativos no fermentantes tales como las cepas del género *Acinetobacter*, en particular *Acinetobacter baumannii*; las cepas del género *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas aeruginosa*, las cepas del género

5 *Stenotrophomonas*, y las cepas del género *Burkholderia*;

- bacterias gramnegativas anaerobias tales como *Bacteroides fragilis*;

- cocobacilos o cocos gramnegativos tales como *Haemophilus influenzae*, *Bordetella* y *Neisseria spp.*;

- bacilos o cocos grampositivos tales como las cepas del género *Lactobacillus*; las cepas del género *Enterococcus*; las cepas del género *Streptococcus*; las cepas del género *Staphylococcus*, en particular las cepas de

10 *Staphylococcus aureus* resistentes o no a la meticilina; las cepas del género *Listeria*; y las cepas del género *Clostridium*.

[0039] De forma preferida, los microorganismos descritos en el presente documento se seleccionan entre el grupo constituido por los microorganismos portadores o que pueden adquirir una resistencia a las cefalosporinas de

15 tercera generación. En particular, los microorganismos según la invención se seleccionan entre el grupo constituido por *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Morganella morganii* y *Providencia sp.*

20

[0040] Los microorganismos según la invención son microorganismos resistentes a las cefalosporinas de tercera generación.

[0041] Cuando el microorganismo según la invención es resistente a las cefalosporinas de tercera generación, y es así en general igualmente resistente a las cefalosporinas de generaciones primera y segunda y a las penicilinas, la enzima tal como se define anteriormente se selecciona entre el grupo constituido por las β -lactamasas de espectro extendido, las cefalosporinasas y las carbapenemasas.

25

[0042] Preferentemente, cuando el microorganismo según la invención es resistente a las cefalosporinas de tercera generación, la enzima es una enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación. De forma preferida entre todas, cuando el microorganismo según la invención es resistente a las cefalosporinas de tercera generación, la enzima según la invención es una β -lactamasa de espectro extendido.

30

[0043] En el contexto de la invención, la expresión "microorganismo resistente a las cefalosporinas de tercera generación" hace referencia a microorganismos que, como parte de la actividad específica de su o sus β -lactamasas, siguen multiplicándose y/o que no mueren cuando se cultivan en presencia de una concentración clásicamente inhibidora de las cefalosporinas de tercera generación.

35

[0044] Preferentemente, los "microorganismos resistentes a las cefalosporinas de tercera generación" según la presente invención se seleccionan entre el grupo constituido por *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Morganella morganii* y *Providencia sp.*

40

45 *Sustrato cromógeno o fluorógeno*

[0045] En el contexto de la invención, la expresión "sustrato cromógeno" hace referencia a una molécula que puede ser dividida o modificada por una enzima y que comprende o está acoplada a un cromóforo.

50

[0046] Por "cromóforo", se entiende en este caso un grupo de átomos en una molécula que es responsable de las propiedades de absorción y/o de emisión de luz en el dominio del ultravioleta, el visible o el infrarrojo de esta molécula. Estas propiedades proceden de una capacidad para absorber la energía de los fotones en una gama del espectro visible mientras que las otras longitudes de onda son transmitidas o difundidas.

55

[0047] El sustrato cromógeno descrito en el presente documento puede ser coloreado o incoloro. Este sustrato cromógeno libera su cromóforo bajo la acción de una enzima específica.

[0048] Tal como se describe en el presente documento, la expresión "sustrato fluorógeno" hace referencia a una molécula que puede ser escindida o modificada por una enzima y que comprende o está acoplada a un

fluoróforo. Este sustrato fluorógeno libera su fluoróforo bajo la acción de una enzima específica.

[0049] Por "fluoróforo", se entiende en este caso un grupo de átomos dentro de una molécula que es responsable de la capacidad de esta molécula de emitir luz de fluorescencia después de una excitación. Se trata en general de sustancias compuestas por varios núcleos aromáticos conjugados o incluso por moléculas planas y cíclicas que poseen uno o varios enlaces π .

[0050] Los cromóforos o fluoróforos son bien conocidos por el experto en la materia y se usan actualmente en el laboratorio desde hace muchos años (véase, por ejemplo, Vinazzer (1975) *Haemostasis* 4:101-9, Manafi (2000) *Int. J. Food Microbiol.* 60:205-218, Orenge y col. (2009) *J. Microbiol. Methods* 79:139-155).

[0051] El cromóforo puede corresponder por ejemplo a un derivado de indoxilo (por ejemplo, 3-indolil-R, 5-bromo-3-indolil-R, 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo, 5-bromo-6-cloro-3-indoxilo o 6-cloro-3-indoxilo), a un derivado de indol (por ejemplo, 7-amido-5-bromoindol), al nitrofenol o uno de sus derivados (por ejemplo, paranitrofenol, ortonitrofenol u ortofluorofenol), al clorofenol o uno de sus derivados (por ejemplo, 4-amino-2,6-diclorofenol), al naftol o uno de sus derivados (por ejemplo, 1-naftol o 2-naftilamida), al 5-(4-hidroxi-3-metoxifenilmetil)-2-tioxotiazolidin-4-ona-3-etanoato, 3,4-ciclohexenoesculetina, 2-alizarina o 7-amido-1-pentil-fenoxazin-3-ona.

[0052] El fluoróforo puede corresponder por ejemplo a cumarina o uno de sus derivados (por ejemplo, hidroxicumarina, aminocumarina, 7-amido-4-metilcumarina, metoxicumarina, ácido 7-nitrocumarina-3-carboxílico), ficoeritrina, fluoresceína o uno de sus derivados (por ejemplo, 5-dodecanoilaminofluoresceína), 4-metil-umbelliferilo, resufurina, rodamina, alofococianina, 2-(5'-cloro-2'-hidroxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona.

[0053] Tal como se describe en el presente documento, la expresión "sustrato cromógeno o fluorógeno susceptible de liberar un cromóforo o fluoróforo después de hidrólisis por la enzima para detección" hace referencia a un sustrato cromógeno o fluorógeno tal como se define anteriormente que, cuando se pone en contacto con la enzima de la que es específico, libera el cromóforo o fluoróforo que comprende o con el que está acoplado.

[0054] La liberación del cromóforo o fluoróforo puede deberse directa o indirectamente a la hidrólisis del sustrato por la enzima para detección. Así, la enzima para detección puede hidrolizar el enlace que acopla el sustrato al cromóforo o fluoróforo, liberando así el cromóforo o fluoróforo del sustrato. Esta acción directa de la enzima se observa normalmente con los sustratos acoplados a un cromóforo o fluoróforo. La enzima para detección puede hidrolizar igualmente un dominio del sustrato que no implica al cromóforo o fluoróforo.

[0055] En consecuencia, la detección de la liberación del cromóforo o del fluoróforo del sustrato cromógeno o fluorógeno descrito en el presente documento indica que este sustrato ha sido hidrolizado por una enzima específica.

[0056] Preferentemente, la liberación del cromóforo o del fluoróforo conlleva un cambio de color del sustrato cromógeno o de emisión de fluorescencia del sustrato fluorógeno. En consecuencia, la detección de la liberación del cromóforo o del fluoróforo puede implementarse en particular observando el cambio de color del sustrato cromógeno o de emisión de fluorescencia del sustrato fluorógeno.

[0057] Preferentemente, el sustrato cromógeno o fluorógeno descrito en el presente documento es un sustrato o un derivado de un sustrato de una enzima tal como se define anteriormente. En particular, un sustrato cromógeno o fluorógeno descrito en el presente documento es un sustrato o un derivado de un sustrato de una enzima seleccionada entre el grupo constituido por glucosidasas, esterasas, fosfatasas, β -lactamasas, en particular penicilinasas, cefalosporinasas, carbenicilinasas, oxacilinasas, carbapenemasas entre ellas metalo- β -lactamasas, y β -lactamasas de espectro extendido. Más en particular, un sustrato cromógeno o fluorógeno descrito en el presente documento es un sustrato o un derivado de un sustrato de una enzima seleccionada entre el grupo constituido por cefalosporinasas, carbapenemasas entre ellas metalo- β -lactamasas, y β -lactamasas de espectro extendido.

[0058] Por "derivado de un sustrato de una enzima", se entiende en este caso un compuesto obtenido de un sustrato de una enzima, susceptible de ser hidrolizado por las mismas enzimas que el sustrato a partir del cual se ha producido. Preferentemente, un derivado de un sustrato de una enzima descrito en el presente documento es un sustrato modificado de forma que contiene o se acopla con un cromóforo o un fluoróforo.

[0059] Los sustratos específicos de enzimas son bien conocidos por el experto en la materia. Los ejemplos de sustratos de glucosidasas comprenden así glucósidos, ácidos urónicos, azúcares aminados y azúcares

acetilados. Los ejemplos de sustratos de esterases comprenden en particular butiratos, palmitatos, estearatos, oleatos, lauratos y caprilatos. Los ejemplos de sustratos de fosfatasa comprenden en particular ésteres de fosfato de alcohol de alquilo, ésteres de fosfato de arilo, ésteres de fosfato de arilalquilo, fosfatos de enol, fosfatos de arilo, fosfatos de diarilo, pirofosfato inorgánico, pirofosfato orgánico, fosfamidas y tioésteres. Los ejemplos de sustratos de penicilinasas comprenden así penicilinas y nitrocefina. Los sustratos de cefalosporinas comprenden por ejemplo nitrocefina, penicilinas, cefalosporinas de primera generación y ciertas cefalosporinas de segunda generación y de tercera generación (tales como las cefalosporinas de tercera generación definidas más adelante). Los ejemplos de sustratos de carbenicilinasas incluyen nitrocefina, carbenicilinas, penicilinas y cloxacilinas. Los ejemplos de sustratos de oxacilinasas incluyen nitrocefina, cloxacilinas, penicilinas y carbenicilinas. Los ejemplos de sustratos de carbapenemasas incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y nitrocefina. Los ejemplos de sustratos de metalo- β -lactamasas comprenden en particular nitrocefina, penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Los ejemplos de sustratos de β -lactamasas de espectro extendido incluyen nitrocefina, penicilinas y cefalosporinas, en particular cefalosporinas de tercera generación tal como se define a continuación.

15 **[0060]** En una forma de realización preferida, cuando la enzima para detección se selecciona entre el grupo constituido por β -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, el sustrato cromógeno o fluorógeno comprende un núcleo β -lactama.

[0061] Por "núcleo β -lactama", se entiende en este caso una estructura cíclica heteroatómica, consistente en tres átomos de carbono y uno de nitrógeno. Preferentemente, el núcleo β -lactama del sustrato cromógeno o fluorógeno descrito en el presente documento es hidrolizado por la enzima para detección.

[0062] De forma especialmente preferida, cuando la enzima para detección se selecciona entre el grupo constituido por β -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, el sustrato cromógeno o fluorógeno descrito en el presente documento es un derivado de β -lactamina.

[0063] Por " β -lactamina", se entiende en este caso un antibiótico que contiene un núcleo β -lactama en su estructura molecular. Como es bien conocido por el experto en la materia, las β -lactaminas engloban por ejemplo los derivados de penicilina, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemes.

[0064] De forma preferida, cuando la enzima para detección se selecciona entre el grupo constituido por β -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, el sustrato cromógeno o fluorógeno descrito en el presente documento es un derivado de cefalosporina.

35 **[0065]** Por "derivado de cefalosporina", se entiende en este caso una molécula compuesta, por una parte, de un grupo obtenido de una cefalosporina, o una parte de cefalosporina, susceptible de ser hidrolizado por una β -lactamasa, y, por otra parte, de un grupo cromóforo o fluoróforo. Preferentemente, el derivado de cefalosporina descrito en el presente documento es una cefalosporina modificada de forma que contenga o esté acoplada a un cromóforo.

40 **[0066]** Las cefalosporinas suelen clasificarse en cefalosporinas de primera, de segunda, de tercera generación o de cuarta generación sobre la base de su espectro de actividad y de su mayor o menor resistencia o estabilidad con respecto a las β -lactamasas. Esta clasificación es muy conocida por el experto en la materia (ver por ejemplo Thompson (1987) Mayo Clin Proc. 62:821-34; Gustaferrero y Steckelberg (1991) Mayo Clin Proc. 66:1064-73; y Barber y col. (2004) Adv Biochem Eng Biotechnol. 88:179-215). Los ejemplos de cefalosporinas de primera generación incluyen en particular cefazolina, cefalotina, cefapirina, cefaloridina, cefalexina Keforal®, cefradina Zeefra® y cefradoxilo Oracefal®. Los ejemplos de cefalosporinas de segunda generación incluyen entre otros cefamandol, cefuroxima Zinnat®, cefonicida, ceforanida, cefatrizina, cefotiam, cefprozilo, loracarbef, cefotetán, cefotixina y cefaclor Alfatil®. Los ejemplos de cefalosporinas de cuarta generación incluyen en particular cefepima y cefpiroma.

[0067] De forma preferida entre todas, el sustrato cromógeno o fluorógeno descrito en el presente documento es un derivado de cefalosporina de tercera generación.

55 **[0068]** Por "derivado de cefalosporina de tercera generación", se entiende en este caso un derivado de cefalosporina tal como se define anteriormente susceptible de ser hidrolizado por las mismas enzimas que las cefalosporinas de tercera generación. Preferentemente, un derivado de cefalosporina de tercera generación descrito en el presente documento es una cefalosporina de tercera generación, o una parte de una cefalosporina de tercera

generación, modificada de forma que contenga o esté acoplada a un cromóforo o un fluoróforo. De forma especialmente preferida, el derivado de cefalosporina de tercera generación descrito en el presente documento es una cefalosporina de tercera generación, o una parte de una cefalosporina de tercera generación, modificada de forma que contenga o esté acoplada a un cromóforo.

5

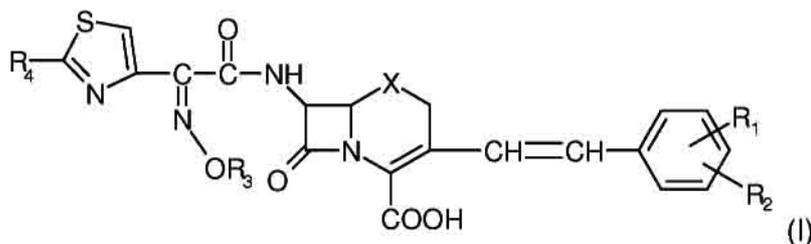
[0069] Las cefalosporinas de tercera generación incluyen sobre todo los compuestos cuyas denominaciones en inglés son las siguientes: Cefcapene (Referencia CAS: 135889-00-8), Cefcapene Pivoxil (Referencia CAS: 105889-45-0), Cefcapene Pivoxil Hydrochloride (Referencia CAS: 147816-23-7), Cefcapene Pivoxil Hydrochloride Monohydrate (Referencia CAS: 147816-24-8), Cefdaloxime (Referencia CAS: 80195-36-4), Cefdaloxime Pivoxil, 10 Cefdinir (Referencia CAS: 91832-40-5), Cefditoren (Referencia CAS: 104146-53-4), Cefditoren Sodium (Referencia CAS: 104146-53-4), Cefditoren Pivoxil (Referencia CAS: 117467-28-4), Cefetamet Pivoxil Hydrochloride, Cefetamet Pivoxyl (Referencia CAS: 65243-33-6), Cefetamet (Referencia CAS: 65052-63-3), Cefixime (Referencia CAS: 79350-37-1), Cefixime Trihydrate, Cefmenoxime Hydrochloride (Referencia CAS: 75738-58-8), Cefmenoxime (Referencia CAS: 65085-01-0), Cefodizime Sodium (Referencia CAS: 86329-79-5), Cefodizime (Referencia CAS: 69739-16-8), 15 Cefoperazone Sodium (Referencia CAS: 62893-20-3), Cefoperazone A, Cefoperazone (Referencia CAS: 62893-19-0), Cefotaxime Sodium (Referencia CAS: 64485-93-4), Cefotaxime S-oxide, Cefotaxime (Referencia CAS: 63527-52-6), Benzathine Cefotaxime, Desacetylcefotaxime, Cefpimizole Sodium, Cefpimizole, Cefpiramide Sodium (Referencia CAS: 74849-93-7), Cefpiramide (Referencia CAS: 70797-11-4), Cefpodoxime Proxetil (Referencia CAS: 87239-81-4), Cefpodoxime (Referencia CAS: 80210-62-4), Cefpodoxime Hydrate, Cefsulodin Sodium, Cefsulodin, Ceftazidime 20 Pentahydrate (Referencia CAS: 78439-06-2), Ceftazidime (Referencia CAS: 72558-82-8), Cefteram, Cefteram Pivaloyloxymethyl Ester, Ceftibuten, Trans-ceftibuten, Ceftiofur, Ceftiofur Sodium (Referencia CAS: 80370-57-6), Ceftiofur Hydrochloride, Ceftiofur Sodium, Desfuroylceftiofur, Ceftiolene, Ceftizoxime Alapivoxil, Ceftizoxime Sodium, Ceftizoxime, Ceftriaxone Disodium (Referencia CAS: 74578-69-1), Ceftriaxone Sodium, Ceftriaxone (Referencia CAS: 73384-59-5) y las sales de estos compuestos. La estructura y la denominación IUPAC de estos compuestos 25 puede encontrarse, por ejemplo, en la página chemicalland21.com.

[0070] Tal como se describe en el presente documento, la cefalosporina de tercera generación puede elegirse entre ceftriaxona (Rhocéphine®), cefotaxima (Claforan®), ceftazidima (Fortum®), cefixima (Oroken®), cefpodoxima proxetilo (Orelox®), cefotiam o cefotiam hexetilo (Takétiam®), cefpiroma (Cefrom®), cefepima 30 (Axévim®), cefsulodina (Pyocefal®), cefatamet, ceftizoxima, cefoperazona, cefsulodina, ceftibuteno y las sales de estos compuestos.

[0071] Los ejemplos de sustratos cromógenos específicos de β -lactamasas son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen en particular nitrocefina (ácido (3-[2,4-dinitroestiril]-7-(2-tienilacetamido)3-cefem-4- 35 carboxílico), PADAC® (piridinio-2-azo-*p*-dimetilnilina cromófora), CENTA™, HMRZ-86 (trifluoroacetato de ácido (7*R*)-7[2-aminotiazol-4-il]-*z*)-2-(1-carboxi-1-metilotoxiimino)acetamido)-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, isómero E) y cefesona o S1 (3-(2,4-dinitroestiril)-(6*R*,7*R*)-7-fenilacetamido-cef-3-em-4-carboxilato).

[0072] Los ejemplos de sustratos fluorógenos específicos de β -lactamasas son bien conocidos por el experto 40 en la materia e incluyen en particular la fluorocilina Green 495/525 y la fluorocilina Green 345/350 Liva Blazer™-FRET B/G.

[0073] Tal como se describe en el presente documento, el derivado de cefalosporina de tercera generación que contiene o está acoplado a un cromóforo puede ser uno de los compuestos descritos en la solicitud de patente 45 europea n° 1.325.923. Estos compuestos están representados por la fórmula (I):



en la que:

50

- R₁ y R₂ pueden ser idénticos o diferentes y representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo nitro o cian;
 - R₃ representa un grupo alquilo en C₁-C₆, sustituido opcionalmente por un grupo carboxilo;
 - R₄ representa un átomo de hidrógeno o un grupo amino;
 - X representa -S- o -SO-; y
- 5 - R₁ y R₂ no pueden representar simultáneamente un átomo de hidrógeno.

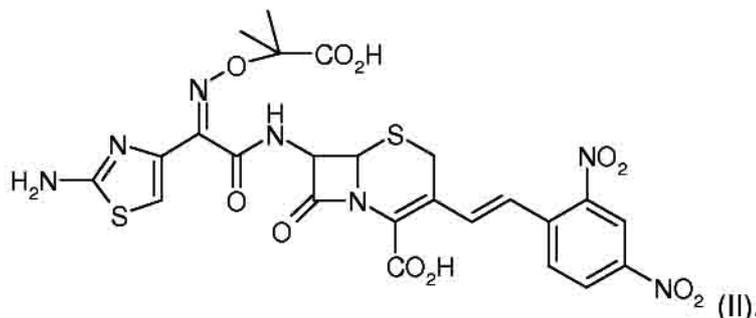
[0074] Así, el derivado de cefalosporina de tercera generación que contiene o está acoplado a un cromóforo puede ser, por ejemplo, el compuesto:

- 10 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metilotoxi-imino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metilotoxi-imino)acetamido]-3-(2,6-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metilotoxi-imino)acetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metilotoxi-imino)acetamido]-3-(2,4-dicianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 15 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metilotoxi-imino)acetamido]-3-(4-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metilotoxi-imino)acetamido]-3-(2-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(1-carboxi-1-metilotoxiimino)-2-(tiazol-4-il)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 1-óxido-7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metilotoxi-imino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 20 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2,4-dicianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2,6-dicianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximatoxiimino-acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 25 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximatoxiimino-acetamido]-3-(2,6-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximatoxiimino-acetamido]-3-(4-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximatoxiimino-acetamido]-3-(2-nitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximatoxiimino-acetamido]-3-(2,4-dicianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximatoxiimino-acetamido]-3-(4-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 30 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximatoxiimino-acetamido]-3-(2-cianoestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido [2-carboximatoxiimino-2-(tiazol-4-il)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,
 - ácido 1-óxido-7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximatoxiimino-acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico,

o una sal de los mismos,

- 35 tales como se describe en la solicitud de patente europea n° 1.325.923.

[0075] En el marco de la invención, el sustrato cromógeno es el compuesto HMRZ-86 (trifluoroacetato de ácido (7R)-7-[2-(aminotiazol-4-il)-(z)-2-(1-carboxi-1-metilotoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, isómero E) (Hanaki y col. (2004) Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53:888-889). Este compuesto se representa por la fórmula (II) siguiente:



45 Etapa de cultivo

[0076] En algunas formas de realización de la invención, el número de microorganismos presentes en la muestra biológica es insuficiente para observar la liberación del cromóforo o del fluoróforo del sustrato cromógeno o

fluorógeno según la invención. En consecuencia, puede ser necesario cultivar la muestra biológica de forma que se permita el crecimiento de los microorganismos, antes de concentrar los microorganismos opcionalmente presentes y obtener un número de microorganismos suficiente para observar la liberación del cromóforo o del fluoróforo del sustrato cromógeno o fluorógeno.

5

[0077] Además, en una forma preferida de la invención, el procedimiento según la invención comprende una etapa previa a0) de cultivo de los microorganismos. Esta etapa previa a0) de cultivo de los microorganismos se hace en condiciones apropiadas para permitir el crecimiento de los microorganismos.

10 **[0078]** Por "condiciones apropiadas para permitir el crecimiento de los microorganismos", se entiende en este caso condiciones de temperatura, de oxigenación y de agitación apropiadas, un medio apropiado y un periodo apropiado para que los microorganismos presentes en la muestra biológica puedan multiplicarse. Las condiciones apropiadas para permitir el crecimiento de los microorganismos dependen de los microorganismos para detección y son bien conocidas por el experto en la materia. Normalmente, la etapa de cultivo tiene lugar en un medio de cultivo
15 no selectivo, preferentemente un medio de cultivo líquido, tal como medio tripto-caseína-soja (TCS), a 37°C, durante un periodo que permite obtener una concentración final que permite la realización de la prueba.

[0079] Preferentemente, cuando la muestra biológica es una muestra de sangre, la etapa a0) de cultivo es una etapa de hemocultivo.

20

[0080] Por "hemocultivo", se entiende en este caso el cultivo de una muestra de sangre circulante. Las condiciones de cultivos en hemocultivo son bien conocidas por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en "Hémocultures, Garnier F. y Denis F., In: Bactériologie médicale: techniques usuelles (2007) Ed. Masson 11:107-116". Normalmente, la muestra de sangre se pone en cultivo en un medio líquido no selectivo tal como medio
25 corazón-cerebro, del medio tripticasa de soja o del caldo de tipo medio de Wilkins Chalgren, suplementado con nutrientes y factores de crecimiento (por ejemplo, vitaminas, hemina, hidratos de carbono, cisteína, etc.), que comprende opcionalmente un anticoagulante tal como polianetol sulfonato de sodio (SPS) y/o un neutralizador de antibióticos tal como resinas adsorbentes de cationes o carbón activo. De forma preferida, el hemocultivo se realiza en un sistema automatizado. Los sistemas automatizados de hemocultivo son bien conocidos por el experto en la
30 materia y comprenden por ejemplo Bactec® comercializado por Becton-Dickinson y BacT/ALERT® comercializado por bioMérieux. Estos sistemas aseguran de forma continua la vigilancia, la agitación y la incubación de los hemocultivos. Durante su crecimiento, el microorganismo produce CO₂ que induce un descenso del pH, que será detectado por el autómatas con ayuda de un sensor, ya sea por fluorescencia o por reflectometría. El aparato avisa de cualquier resultado positivo merced a una alarma visual y/o sonora, cuando la concentración de microorganismos
35 alcanza una concentración umbral.

[0081] Debe observarse que los procedimientos según la invención son especialmente ventajosos para detectar la presencia de una enzima de un microorganismo en una muestra de sangre después de una etapa de hemocultivo. De hecho, los procedimientos según la invención permiten realizar la detección de una resistencia en
40 sólo 30 min después de la etapa de hemocultivo mientras que los procedimientos del estado de la técnica no permiten obtener un resultado más que de 16 h como mínimo después de la etapa de hemocultivo. Esta reducción del tiempo de espera en los procedimientos según la invención proviene en parte del hecho de que no contiene etapa de cultivo en medio de gelosa.

45 *Etapa de concentración*

[0082] Por "concentrar" o "concentración", se entiende en este caso la operación consistente en reducir el volumen de una solución que contiene microorganismos por eliminación de la parte acuosa, de manera que su
50 riqueza en microorganismos aumenta. Las técnicas de concentración son bien conocidas por el experto en la materia e incluyen por ejemplo el centrifugado y el filtrado. Preferentemente, la etapa de concentración comprende el centrifugado de la muestra biológica y después la eliminación del sobrenadante obtenido. Normalmente, el centrifugado se realiza a una velocidad de aproximadamente 3.000 g durante 2 a 10 min de forma que se obtenga un depósito bacteriano. A continuación se elimina el sobrenadante obtenido del centrifugado. El filtrado se realiza, por ejemplo, a través una membrana cuyo tamaño de poros es inferior a 1 µm (por ejemplo, de 0,45 µm). A
55 continuación se concentran los microorganismos y se recuperan en la membrana. La etapa de concentración puede realizarse igualmente en un tubo con gel separador de suero, tal como el tubo con separador de suero comercializado por Becton Dickinson. Después del centrifugado, normalmente a 1.300 g durante 10 min, los microorganismos se recuperan en la superficie del gel.

[0083] Además, la concentración de los microorganismos puede realizarse mediante centrifugado después de una lisis y/o de una aglutinación de los glóbulos de la sangre y/o un filtrado que permite el paso de los microorganismos.

5 **[0084]** Los microorganismos concentrados pueden ser objeto además de uno o varios lavados en medio tamponado (por ejemplo, en tampón de fosfato).

Etapa de lisis

10 **[0085]** Cuando la muestra biológica es una muestra que contiene sangre o hematíes, la etapa de concentración puede estar precedida de una etapa de lisis de los hematíes presentes en el hemocultivo. Esta etapa de lisis debe permitir eliminar los hematíes sin que los microorganismos se sometan a lisis. Las condiciones apropiadas de lisis de los hematíes son bien conocidas por el experto en la materia y comprenden por ejemplo la puesta en contacto de la muestra biológica con un tampón de lisis de los glóbulos rojos tal como el tampón de lisis
15 RBC (Red Blood Cells lysis buffer: NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,01 mM) durante un periodo apropiado, por ejemplo 10 min, a una temperatura apropiada, por ejemplo entre 15 y 40°C, para permitir la lisis de los glóbulos rojos. Otros tampones de lisis susceptibles de ser usados en el presente documento son conocidos por el experto en la materia (Chen y col., (citado anteriormente); Moreau y col., 2002, J Drug Target. 10(2):161-73).

20 **[0086]** Esta etapa de lisis puede renovarse o seguirse de una etapa de lavado antes de la etapa de concentración.

Etapa de aglutinación

25 **[0087]** Cuando la muestra biológica es una muestra que contiene sangre o hematíes, la etapa de concentración puede estar precedida de una etapa a) de preparación de la muestra biológica que comprende:

(i) la aglutinación de los hematíes, y

(ii) la separación de los hematíes aglutinados de los microorganismos presentes en la muestra.

30

[0088] Por "aglutinar" o "aglutinación", se entiende en este caso la operación consistente en hacer precipitar células, en particular células sanguíneas, y de forma preferida hematíes.

35 **[0089]** Preferentemente, la aglutinación se aplica poniendo la muestra biológica en contacto con al menos un agente de aglutinación.

[0090] Por "agente de aglutinación", se entiende en este caso una molécula que induce la aglutinación de células. El agente de aglutinación según la invención se elige preferentemente en el grupo constituido por lectinas, que incluye concanavalina A, abrina, ricina y aglutininas tales como aglutinina de germen de trigo y aglutininas de
40 soja; aminoácidos poliméricos tales como polilisina y poliarginina; polímeros catiónicos tales como polietilenimina; polímeros hidrosolubles naturales o sintéticos tales como bromuro de hexadimetirina, polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicoles (PEG); policationes tales como sulfato de protamina; gelatinas, dextranos, fibrinógeno, urea, glicerol, cloruro de sodio y anticuerpos.

45 **[0091]** Preferentemente, el agente de aglutinación usado en el marco de la invención es un polietilenglicol (PEG).

[0092] Las técnicas de aglutinación de los hematíes que aplica un agente de aglutinación tal como se define anteriormente son bien conocidas por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en las solicitudes WO-
50 03/025.207 y US-4.753.776. Normalmente, la muestra biológica para preparar se pone en contacto con PEG a una concentración suficiente y durante un periodo suficiente para permitir la aglutinación de los hematíes presentes en la muestra biológica, por ejemplo durante 1 a 30 min, preferentemente entre 5 y 15 min.

[0093] En el contexto de la invención, la etapa de "separación de los hematíes aglutinados de los
55 microorganismos presentes en la muestra" consiste en eliminar los hematíes aglutinados y conservar los microorganismos presentes en la muestra tratada. Estas técnicas de separación son bien conocidas por el experto en la materia y comprenden, por ejemplo, el filtrado, el centrifugado y/o la decantación.

[0094] El filtrado consiste por ejemplo en poner en contacto la muestra biológica y el agente aglutinante en la

superficie del filtro antes del centrifugado con el fin de separar los hematíes aglutinados (que permanecen en el filtro) de los microorganismos que encuentran en el filtrado.

[0095] La decantación consiste por ejemplo en poner en contacto la muestra biológica y el agente aglutinante y en retirar el sobrenadante después de aglutinación y decantación.

[0096] Preferentemente, la separación de los hematíes aglutinados se realiza usando filtros para centrifugar.

[0097] La etapa a') de preparación de la muestra biológica tal como se define anteriormente puede estar precedida o seguida además por una o de varias etapas de lisis de los hematíes tal como se define en el apartado "Etapa de lisis" anterior.

Etapa de puesta en suspensión

[0098] Los protocolos según la presente invención se caracterizan en particular por el hecho de que los microorganismos, después de la concentración, se ponen en suspensión en una solución que comprende al menos un sustrato cromógeno o fluorógeno tal como se ha descrito. Así, el sustrato cromógeno o fluorógeno se pone en contacto en una solución con los microorganismos concentrados, y no en medio sólido, como, por ejemplo, en medio de gelosa.

[0099] Por "poner en suspensión los microorganismos", se entiende en este caso el hecho de reducir los agregados bacterianos mediante recuperación en una solución, de manera que los agregados bacterianos provienen de una sedimentación natural o de una sedimentación realizada voluntariamente por ejemplo por centrifugado. La finalidad de la puesta en suspensión de los microorganismos según la presente invención es tender hacia una solución en la que los microorganismos están todos separados unos de otros.

[0100] La solución en la que los microorganismos se vuelven a poner en suspensión comprende al menos un sustrato cromógeno o fluorógeno tal como se ha descrito. Puede contener además al menos un agente de lisis. El agente de lisis según la invención puede ser un agente de lisis bacteriano o fúngico. Preferentemente, el agente de lisis lisa la pared bacteriano o fúngica sin hidrolizar el sustrato cromógeno o fluorógeno.

[0101] Dicho al menos un agente de lisis puede seleccionarse entre el grupo constituido por un detergente, una enzima que degrada la pared bacteriana o fúngica, un antibiótico activo en la pared bacteriana tal como una polimixina, y combinaciones de los mismos. Ventajosamente, el agente de lisis puede combinarse con, o ser sustituido por, un medio de lisis mecánico, por ejemplo de bolas o ultrasonidos.

[0102] En el contexto de la invención, un "detergente" o "tensioactivo" es un compuesto químico dotado de propiedades tensioactivas.

[0103] Los ejemplos de detergente son bien conocidos por el experto en la materia y comprenden en particular los descritos en la página de la empresa Sigma (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/life-science-catalog/product-catalog.html?TablePage=20964389>) y los compuestos siguientes: ácido quenodesoxicólico; sal de sodio del ácido quenodesoxicólico; ácido cólico; ácido deshidrocólico; ácido desoxicólico; éster de metilo de ácido desoxicólico; digitonina; digitoxigenina; óxido de N,N-dimetildodecilamina; docusato de sodio; sal de sodio del ácido glucoquenodesoxicólico; hidrato del ácido glucocólico; sal de sodio de hidrato del ácido glucocólico; monohidrato del ácido glucodesoxicólico; sal de sodio del ácido glucodesoxicólico; sal 3-sulfato de disodio del ácido glucoliticólico; éster de etilo de ácido glucoliticólico; sarcosil, sal de sodio de N-lauroilsarcosina; N-lauroilsarcosina; dodecilsulfato de litio; solución de lugol; Niaproof 4 Tipo 4 (es decir, sal de sodio de 7-etil-2-metil-4-undecilsulfato); sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico; 1-butanosulfonato de sodio; 1-decanosulfonato de sodio; 1-dodecanosulfonato de sodio; 1-heptanosulfonato de sodio anhidro; 1-nonanosulfonato de sodio; monohidrato del 1-propanosulfonato de sodio; 2-bromoetanosulfonato de sodio; hidrato del colato de sodio; coleato de sodio; desoxicolato de sodio; monohidrato del desoxicolato de sodio; dodecilsulfato de sodio; hexanosulfonato de sodio anhidro; octilsulfato de sodio; pentanosulfonato de sodio anhidro; taurocolato de sodio; taurodesoxicolato de sodio; sal de sodio del ácido tauroquenodesoxicólico; monohidrato de la sal de sodio del ácido taurodesoxicólico; hidrato de la sal de sodio del ácido taurodesoxicólico; sal de disodio del ácido 3-sulfatotaurolitocólico; sal de sodio del ácido taurosodesoxicólico; Trizma® dodecilsulfato (es decir, laurilsulfato de tris(hidroximetil)aminometano); ácido ursodesoxicólico, bromuro de alquiltrimetilamonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; cloruro de bencildimetiltetradecilamonio; bromuro de bencildodecildimetilamonio; tetracloroyodato de benciltrimetilamonio; bromuro de cetiltrimetilamonio; bromuro de dimetildiodecildimetilamonio; bromuro de

dodeciletildimetilamonio; bromuro de dodeciltrimetilamonio; bromuro de etilhexadecildimetilamonio; reactivo T de Girard; bromuro de hexadeciltrimetilamonio; N,N',N'-polioxietilen(10)--N-sebo-1,3-diaminopropano; bromuro de tonzonio; bromuro de trimetil(tetradecil)amonio, BigCHAP (N,N-bis[3-(D-gluconamido)propil]colamida); bis(polietilenglicol-bis[imidazoilcarbonil]); alcoholes polioxietilénicos, como por ejemplo Brij® 30 (éter polioxietilen(4)laurílico), Brij®35 (éter polioxietilen(23)laurílico), Brij® 35P, Brij® 52 (éter polioxietilen-2-cetílico), Brij® 56 (éter polioxietilen-10-cetílico), Brij® 58 (éter polioxietilen-20-cetílico), Brij® 72 (éter polioxietilen-2-estearílico), Brij® 76 (éter polioxietilen-10 estearílico), Brij® 78 (éter polioxietilen-20-estearílico), Brij® 78P, Brij® 92 (éter polioxietilen-2-oleílico); Brij® 92V (éter polioxietilen-2 oleílico), Brij® 96V, Brij® 97 (éter polioxietilen-10-oleílico), Brij® 98 (éter polioxietilen(20)oleílico), Brij® 58P, y Brij® 700 (éter polioxietilen-(100)estearílico); Cremophor® EL (polioxietilengliceroltrirricinoleato 35; aceite de ricino polioxil-35); éter monododecílico de decaetilenglicol; éter monohexadecílico de decaetilenglicol; éter monotridecílico de decaetilenglicol; N-decanoil-N-metilglucamina; n-decil alfa-D-glucopiranosido; decil-beta-D-maltopiranosido; digitonina; n-dodecanoil-N-metilglucamina; n-dodecil-alfa-D-maltósido; neodecil-beta-D-maltósido; éter monodecílico de heptaetilenglicol; éter monododecílico de heptaetilenglicol; éter monotetradecílico de heptaetilenglicol; n-hexadecil-beta-D-maltósido; éter monododecílico de hexaetilenglicol; éter monohexadecílico de hexaetilenglicol; éter monooctadecílico de hexaetilenglicol; éter monotetradecílico de hexaetilenglicol; Igepal® CA-630 (nonilfenil-polietilenglicol, (octilfenoxi)polietoxietanol, octilfenil-polietilenglicol); metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-alfa-D-glucopiranosido; éter monododecílico de nonaetilenglicol; N-nonanoil-N-metilglucamina; éter monodecílico de octaetilenglicol; éter monododecílico de octaetilenglicol; éter monohexadecílico de octaetilenglicol; éter monooctadecílico de octaetilenglicol; éter monotetradecílico de octaetilenglicol; octil-beta-D-glucopiranosido; éter monodecílico de pentaetilenglicol; éter monododecílico de pentaetilenglicol; éter monohexadecílico de pentaetilenglicol; éter monohexílico de pentaetilenglicol; éter monooctadecílico de pentaetilenglicol; éter monoocílico de pentaetilenglicol; éter diglucidílico de polietilenglicol; éter de polietilenglicol W-1; éter polioxietilen-10-tridecílico; estearato de polioxietileno 100; éter polioxietilen-20 isohexadecílico; éter polioxietilen-20 olélico; estearato de polioxietileno 40; estearato de polioxietileno 50; estearato de polioxietileno 8; polioxietileno bis(imidazolilcarbonilo); estearato de polioxietileno-25-propilenglicol; saponina de corteza de quillaja; ésteres de ácido graso de sorbitano, por ejemplo, Span® 20 (monolaurato de sorbitano), Span® 40 (monopalmitato de sorbitano), Span® 60 (monoestearato de sorbitano), Span® 65 (triestearato de sorbitano), Span® 80 (monooleato de sorbitano), y Span® 85 (trioleato de sorbitano); los diferentes ésteres alquílicos de polietilenglicoles, como por ejemplo Tergitol® Tipo 15-S-12, Tergitol® Tipo 15-S-30, Tergitol® Tipo 15-S-5, Tergitol® Tipo 15-S-7, Tergitol® Tipo 15-S-9, Tergitol® Tipo NP-10 (etoxilato de nonilfenol), Tergitol® Tipo NP-4, Tergitol® Tipo NP-40, Tergitol® Tipo NP-7, Tergitol® Tipo NP-9 (éter de nonilfenol-polietilenglicol), Tergitol® MIN FOAM 1X, Tergitol® MIN FOAM 2X, Tergitol® Tipo TMN-10 (éter trimetinonílico de polietilenglicol), Tergitol® Tipo TMN-6 (éter trimetilnonílico de polietilenglicol), Triton® 770, Triton® CF-10 (éter bencil-polietilenglicol terc-octilfenílico), Triton® CF-21, Triton® CF-32, Triton® DF-12, Triton® DF-16, Triton® GR-5M, Triton® N-42, Triton® N-57, Triton® N-60, Triton® N-101 (éter nonilfenílico de polietilenglicol; éter nonilfenílico de polioxietileno ramificado), Triton® QS-15, Triton® QS-44, Triton® RW-75 éter (polietilenglicol 260 mono(hexadecil/octadecílico) y 1-octadecanol), Triton® SP-135, Triton® SP-190, Triton® W-30, Triton® X-15, Triton® X-45 (éter 4-terc-octilfenílico de polietilenglicol; 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton® X-100 (t-octilfenoxipolietoxietanol; éter terc-octilfenílico de propilenglicol; 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton® X-102, Triton® X-114 (éter terc-octilfenílico de propilenglicol; (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton® X-165, Triton® X-305, Triton® X-405 (éter polioxietilen(40) isooctilciclohéxico; éter terc-octilfenílico de polietilenglicol), Triton® X-705-70, Triton® X-151, Triton® X-200, Triton® X-207, Triton® X-301, Triton® XL-80N, y Triton® XQS-20; tetradecil-beta-D-maltósido; éter monodecílico de tetraetilenglicol; éter monododecílico de tetraetilenglicol; éter monotetradecílico de tetraetilenglicol; éter monodecílico de trietilenglicol; éter monododecílico de trietilenglicol; éter monohexadecílico de trietilenglicol; éter monoocílico de trietilenglicol; éter monotetradecílico de trietilenglicol; ésteres de ácido graso polioxietileno sorbitano, por ejemplo TWEEN® 20 (polietilenglicol monolaurato de sorbitano), TWEEN® 20 (polioxietileno (20) monolaurato de sorbitano), TWEEN® 21 (polioxietileno (4) monolaurato de sorbitano), TWEEN® 40 (polioxietileno (20) monopalmitato de sorbitano), TWEEN® 60 (polietilenglicol monoestearato de sorbitano; polioxietileno (20) monoestearato de sorbitano), TWEEN® 61 (polioxietileno (4) monoestearato de sorbitano), TWEEN® 65 (polioxietileno (20) triestearato de sorbitano), TWEEN® 80 (polietilenglicol monooleato de sorbitano; polioxietileno (20) monooleato de sorbitano), TWEEN® 81 (polioxietileno (5) monooleato de sorbitano), y TWEEN® 85 (polioxietileno (20) trioleato de sorbitano); tiloxapol; n-undecil-beta-D-glucopiranosido, CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato); CHAPSO (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato); N-dodecilmaltósido; alfa-dodecilmaltósido; beta-dodecilmaltósido; sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato (SB3-10 sal interna de 3-(decildimetilamonio) propanosulfonato (SB3-10), sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato (SB3-12), sal interna de 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato (SB3-14), sal interna de 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato (SB3-16), sal interna de 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato (SB3-18); MEGA-8; MEGA-9; MEGA-10; metilheptilcarbamoil-glucopiranosido; N-nonanoil-N-metilglucamina; octilglucopiranosido; octil-tioglucoipiranosido; octil-beta-tioglucoipiranosido; 3-[N,N-dimetil(3-

miristoilaminopropil)amonio]propanosulfonato o amidosulfobetaina-14 (ASB-14); amidosulfobetaina-16 (ASB-16); EMPIGEN® BB; Cymal-1, Cymal-2, Cymal-5, Cymal-6 y ácido desoxicólico.

[0104] Preferentemente, en los procedimientos según la invención, el detergente se selecciona entre el grupo
5 constituido por CHAPS, TWEEN 20, TWEEN 80, c7bzo, octilglucósido, octiltioglucopiranosido, ASB-14, SB3-10, dodecilsulfato de sodio, digitonina, sarcosil y Tergitol.

[0105] El agente de lisis puede ser igualmente una enzima que degrada la pared bacteriana tal como la
10 lisozima, la lisostafina, la acromopeptidasa, la mutanolisina, la labiasa, la quitinasa, la glucanasa, la glucosaminidasa, la muramidasa, la transglucosilasa lítica, la amidasa y la endopeptidasa.

[0106] El agente de lisis puede ser un agente causante de la formación de poros en la pared bacteriana o la
15 membrana celular como, por ejemplo, una polimixina, en particular una polimixina A, B, C, D, E (o colistina), F, K, M, P, S o T. Las polimixinas son antibióticos peptídicos cíclicos que actúan como detergentes catiónicos y se insertan entre los fosfolípidos de la pared bacteriana. Puede tratarse igualmente de β -lactamas, de glucopéptidos, de fosfomicina, de cicloserina, de bacitracina, de ácido fusídico o de neomicina.

[0107] Durante la etapa b1) de puesta en suspensión, el sustrato cromógeno o fluorógeno puede además ser
20 puesto en presencia de al menos un inhibidor de β -lactamasa. La solución en la que los microorganismos se vuelven a poner en suspensión puede comprender así además al menos un inhibidor de β -lactamasa, en particular al menos un inhibidor de β -lactamasa seleccionado entre el grupo constituido por un inhibidor de cefalosporinasa, un inhibidor de serina β -lactamasa, un agente de quelación de metal y un inhibidor de BLEE.

[0108] Los ejemplos de inhibidores de β -lactamasa son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen
25 en particular cloxacilina, compuesto syn2190, aztreonam, ácido borónico y derivados del mismo tales como ácido 3-aminofenil-borónico, ácido fenil-borónico, ácido benzo(b)tiofen-2-borónico, ácido *meta*-carboxifenilborónico; ácido clavulánico, sales del ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam; ácido dipicolínico (DPC), dietilditiocarbamato (DEDTC), N,N,N',N'-tetraquis-(2-piridilmetil)-etilendiamina (TPEM), ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido 2,3-dimercapto-1-propano-sulfónico (DMPS) y 1,10-fenantrolina; ceftazidima, una sal de la ceftazidima, cefotaxima y una
30 sal de la cefotaxima; monobactama sideróforo BAL30072, 2-amino-4-tiazolil-metoxiimino-penicilina (ATMO-penicilina); penicilinato de C-6-mercaptopemil; metilidenopenem BRL 42715; metilidenpenem BLI-489; alquilidenpenemes; metilidenpenemes tricíclicos y bicíclicos; carbapenem tricíclico LK-157; 1-b-metilcarbapenem 225; sulfona de penem Ro 48-1220; sulfona de penem LN-1-255; sal de sodio de trans-7-oxo-6-(sulfooxi)-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octan-2-carboxamida (NXL104); fosfonatos y derivados de los mismos tales como fosfonatos de
35 acilo cíclicos; penicilinas tales como JDB/LN-I-255; cefalosporinas sulfónicas como JBB/DVR-II-214. Se sabe que la elección del o de los inhibidores que pueden usarse puede depender del tipo de enzima que se desea detectar (documento WO-2009/051.838).

[0109] Preferentemente, los microorganismos se dejan en suspensión en la solución que comprende un
40 sustrato cromógeno o fluorógeno según la invención a una temperatura y durante un periodo apropiado para permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima y detectar una posible liberación del cromóforo o fluoróforo. Dichas condiciones son bien conocidas por el experto en la materia y son funciones del sustrato cromógeno o fluorógeno usado. Normalmente, los microorganismos se dejan en incubación durante 5 min a 2 h, a una temperatura comprendida entre 15 y 42°C. La liberación del cromóforo o fluoróforo, que se caracteriza por un cambio de color del
45 sustrato cromógeno o de emisión de fluorescencia del sustrato fluorógeno, puede observarse entonces directamente en solución.

[0110] Los procedimientos según la invención presentan la ventaja de que reducen acusadamente el tiempo
50 al cabo del cual es posible detectar la presencia de una enzima de un microorganismo en una muestra biológica. Esta ganancia de tiempo proviene en particular del hecho de que los procedimientos según la invención no comprenden etapa de cultivo de los microorganismos en un medio selectivo que contiene un antibiótico específico. En particular, no comprenden etapa de selección ni de inducción de los microorganismos en medio de gelosa.

[0111] Cuando la muestra biológica es una muestra que contiene sangre o hematíes, el procedimiento de
55 detección según la invención puede comprender además una etapa de lisis de los hematíes presentes en la muestra biológica antes de la etapa de puesta en suspensión, tal como se describe en la sección "*Etapas de lisis*" anterior.

Procedimiento de preparación de una muestra de hemocultivo

[0112] La presente solicitud describe igualmente un procedimiento de preparación *in vitro* de una muestra de hemocultivo que comprende microorganismos, que comprende las etapas que consisten en:

- 5 A) lisar o aglutinar los hematíes presentes en la muestra de hemocultivo sin lisar los microorganismos presentes en la muestra de hemocultivo,
- B) separar los microorganismos presentes en la muestra de hemocultivo de los hematíes lisados o aglutinados en la etapa A), y
- C) opcionalmente lavar los microorganismos de la muestra de hemocultivo separados en la etapa B).

10 **[0113]** Preferentemente, el procedimiento de preparación anterior permite obtener microorganismos en los que es posible aplicar la etapa a1) de los procedimientos de detección tal como se define anteriormente.

[0114] La etapa A) de lisis de los hematíes puede implementarse normalmente tal como se indica anteriormente en el apartado "*Etapa de lisis*", poniendo en contacto la muestra de hemocultivo con un tampón de lisis de glóbulos rojos como, por ejemplo, el tampón de lisis RBC, durante un periodo apropiado, por ejemplo entre 15 min y 10 min, a una temperatura apropiada, por ejemplo a temperatura ambiente o a 37°C, para permitir la lisis de los hematíes.

[0115] La etapa A) de aglutinación de los hematíes puede implementarse normalmente tal como se indica anteriormente en el apartado "*Etapa de aglutinación*" poniendo en contacto el hemocultivo con al menos un agente de aglutinación tal como se define anteriormente.

[0116] La etapa B) de separación de los microorganismos presentes en la muestra de hemocultivo puede implementarse mediante cualquier técnica apropiada bien conocida por el experto en la materia. La etapa de 25 separación de los microorganismos puede implementarse en particular por centrifugado, filtrado o toma de la fase acuosa, por ejemplo, después de decantación. Preferentemente, la etapa de separación de los microorganismos se implementa por centrifugado.

[0117] La etapa opcional de lavado puede implementarse normalmente por nueva suspensión de los 30 microorganismos separados en un tampón de lavado, como, por ejemplo, el tampón de lisis RBC, incubación durante un periodo apropiado, a una temperatura apropiada, y nueva separación de los microorganismos, por ejemplo por centrifugado.

Procedimiento de detección in vitro de microorganismos

35

[0118] Tal como se indica anteriormente, en los procedimientos de detección *in vitro* de enzimas, las enzimas para detección son producidas por microorganismos particulares. La presencia de la enzima para detección significa así que el microorganismo que produce esta enzima está presente en la muestra biológica.

40 **[0119]** En consecuencia, la presente solicitud describe igualmente un procedimiento de detección *in vitro* de microorganismos a partir de una muestra biológica que aplica el procedimiento de detección de enzima tal como se define anteriormente.

[0120] En particular, en el presente documento se describe un procedimiento de detección *in vitro* de un 45 microorganismo a partir de una muestra biológica que comprende las etapas que consisten en:

- a1) concentrar los microorganismos presentes en la muestra biológica, opcionalmente después de una etapa a0) de cultivo de los microorganismos tal como se define anteriormente;
- b1) poner en suspensión los microorganismos concentrados en la etapa a1) en una solución que comprende al 50 menos un sustrato cromógeno o fluorógeno susceptible de liberar un cromóforo o un fluoróforo después de hidrólisis por una enzima del microorganismo para detección tal como se define anteriormente;
- c1) detectar la posible liberación del cromóforo o del fluoróforo obtenida en la etapa b1);

siendo la liberación del cromóforo o del fluoróforo detectada en la etapa c1) indicativa de la presencia del 55 microorganismo para detección.

[0121] La detección de la liberación del cromóforo o del fluoróforo del sustrato cromógeno o fluorógeno es así indicativa de la presencia de microorganismos que expresan la enzima específica del sustrato cromógeno o fluorógeno.

[0122] Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1: Detección de β -lactamasa que confiere a los microorganismos que la producen una resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, directamente a partir de orina, sin etapa de crecimiento bacteriano

[0123] Este ejemplo muestra que es posible identificar enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (C3G) directamente a partir de orina.

10 [0124] Se han recogido dos muestras de orina de sujetos sanos (un hombre y una mujer). Estas muestras de orina han sido inoculadas cada una de forma separada por diferentes cargas de dos cepas de *Escherichia coli* (T434 = resistente a las C3G que tienen una actividad β -lactamasa importante; ATCC 25922 = sensible).

15 [0125] Brevemente, se ha inoculado 1 ml de orina con 1, 10 o 100 μ L de una suspensión bacteriana en 0,5 McFarland (McF). Los tubos se han centrifugado a 3.000 g o 6.000 g opcionalmente con lavados.

20 [0126] En el depósito bacteriano obtenido se han añadido 20 μ L de una solución que comprende 0,8 g/L de sustrato HMRZ-86 y 20 μ L de CHAPS a 20 g/L. Después de mezcla en vortización durante 10 segundos, el tubo se deja 30 min a temperatura ambiente.

[0127] Los autores de la invención han observado una reacción positiva para el inóculo más fuerte. Así, era visible un viraje del amarillo al anaranjado con la cepa resistente cuando su número alcanzaba $6 \cdot 10^9$ ufc/mL mientras que no era visible ningún viraje con la cepa sensible.

25 **Ejemplo 2: Detección de β -lactamasa que confiere a los microorganismos que la producen una resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, con una etapa de crecimiento bacteriano**

[0128] Esta prueba se ha realizado en microplaca.

30 [0129] Cada pocillo contenía

- 50 μ L de HMRZ-86 disueltos en medio TCS 60 g/L con tampón (Tampón de fosfato 0,2 M pH 6)
- 40 μ L de CHAPS o H₂O
- 10 μ L de una suspensión bacteriana densa (5 McF, $> 10^8$ ufc/ml).

35 [0130] Se han observado las microplacas durante todas las horas con el fin de detectar un viraje opcional de color.

40 [0131] Al cabo de 3 h, por ejemplo, en un panel de 8 cepas resistentes y 4 cepas sensibles, con 0,4 g/L de HMRZ-86 y entre 10 y 20 g/L de CHAPS, y un inóculo fuerte, se han obtenido los resultados presentados en la **tabla 2**.

Tabla 2

| | Agua | | CHAPS | |
|------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | Cepas resistentes | Cepas sensibles | Cepas resistentes | Cepas sensibles |
| Viraje «significativo» | 3 | | 5 | |
| Viraje dudoso | 1 | | | |
| Ausencia de viraje | 4 | 4 | 3 | 4 |

45 [0132] Al cabo de 3 h 30, en otro ejemplo, en un panel de 8 cepas resistentes y 4 cepas sensibles con 0,4 g/L de HMRZ-86, en presencia o no de 5 g/L de CHAPS y a partir de un inóculo fuerte, se han obtenido los resultados presentados en la **tabla 3**.

Tabla 3

| | Ausencia de CHAPS | | Presencia de CHAPS | |
|------------------------|-------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | Cepa resistente | Cepa sensible | Cepa resistente | Cepa sensible |
| Viraje «significativo» | 4 | | 6 | |
| Viraje dudoso | 1 | 1 | | |

| | | | | |
|--------------------|---|---|---|---|
| Ausencia de viraje | 3 | 3 | 2 | 4 |
|--------------------|---|---|---|---|

[0133] Así, la presencia de CHAPS favorece la reacción en el caso de una etapa de crecimiento bacteriano previo.

5 Ejemplo 3: Detección de β -lactamasa que confiere a los microorganismos que la producen una resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, directamente a partir de hemocultivo

[0134] Este ejemplo muestra que es posible identificar enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (C3G) directamente a partir de hemocultivo.

10

[0135] Para estudiar la posibilidad de detección de cepas resistentes a las C3G en los hemocultivos, el protocolo adoptado ha sido el siguiente (nota: las variantes en el protocolo que no conllevan variación en el valor de los resultados se anotan entre corchetes. Se han aplicado en 2 cepas, una sensible y una resistente. Se ha observado un viraje de color para la cepa resistente y no se ha observado ningún viraje para la cepa sensible):

15

[0136] Se han añadido 7,5 mL de obtenido del frasco de hemocultivo (bacTAlert; ref. 259791 o 259793) de 2,5 mL de sangre de cordero defibrinado. Se han añadido 25 μ L de una suspensión bacteriana a 0,5 McF. Después de homogeneización en vórtex y de incubación durante 18-20 h a 37°C, se han tomado 500 μ L. Se han añadido 0,5 mL [o 1 mL] de una solución de lisis de glóbulos rojos modificada que contiene sobre todo NH_4Cl pero que no contiene EDTA (SL). Después de homogeneización en vórtex, se ha incubado el tubo 10 min a 37°C, [o 1 min a 37°C o 1 min a temperatura ambiente]. Se ha vuelto a poner en suspensión un depósito, recuperado después de un centrifugado a 750 g durante 5 min [o 2 min], en 200 μ L de SL y se ha dejado 2 min a temperatura ambiente. A continuación se ha añadido 1 mL de PBS 0,1 M. Se ha centrifugado de nuevo el tubo a 750 g durante 5 min [o 2 min], y se ha vuelto a tomar el depósito en una solución que comprende 50 μ L de sustrato HMRZ-86 (1,2 g/L) y 50 μ L de CHAPS (30 g/L). Después de homogeneización en vórtex, se ha vuelto a poner el tubo en incubación 15 min a temperatura ambiente. Después de centrifugado a 750 g durante 5 min [o 2 min], se ha observado el cambio de color.

20

25

[0137] La prueba se ha realizado en 4 cepas de las que 3 son cepas resistentes a las C3G (de ellas 2 a metalo- β -lactamasas cuya reacción se inhibía en presencia del medio de cultivo), y una sensible.

30

[0138] Se ha realizado un ensayo en los dos medios de hemocultivo (aerobio y anaerobio) en un panel mayor. En medio aerobio, 17 cepas resistentes a las C3G de 18 han respondido positivamente a la prueba y 6 cepas sensibles de 8 no han mostrado de viraje significativo de coloración. En medio anaerobio, 16 cepas resistentes a las C3G de 18 han respondido positivamente a la prueba y 6 cepas sensibles de 8 no han mostrado un viraje significativo de coloración.

35

[0139] Se han realizado asimismo ensayos a partir de frascos de medio para hemocultivo suplementados por sangre total humana.

40

[0140] Se han seguido diferentes protocolos:

[0141] Se han añadido 7,5 mL de obtenido del frasco de hemocultivo (bacTAlert; ref. 259791 o 259793) de 2,5 mL de sangre total humana. Se han añadido 25 μ L de una suspensión bacteriana a 0,5 McF. Después de homogeneización en vórtex, se ha incubado el tubo 18-20 h a 37°C.

45

Protocolo de lisis

[0142] Se han tomado 0,5 ml de hemocultivo y se ha añadido 0,5 mL de tampón de lisis. Se ha dejado la mezcla en contacto durante 10 min y después se ha centrifugado durante 2 min a 750 g. El depósito se ha sometido dos veces al mismo protocolo (adición del tampón de lisis y centrifugado). A continuación se ha tomado en una solución que comprende 50 μ L de sustrato HMRZ-86 (1,2 g/L) y 50 μ L de CHAPS (30 g/L). Después de homogeneización en vórtex, se ha incubado el tubo 15 min a temperatura ambiente. Se ha anotado cualquier cambio de color después de centrifugado durante 2 min a 750 g.

55

Protocolo «aglomeración – filtrado en filtro para centrifugar»

[0143] Se han depositado 50 mg de PEG en un filtro para centrifugar de tipo «Filtros para centrifugado Millipore Ultrafree MC centrifugal filter units 5 µm». Se han tomado 0,5 mL de hemocultivo y se han depositado en el filtro y se han dejado en contacto con el PEG durante 5 min. Después de un centrifugado durante 5 min a 5.500 g (que ha permitido el filtrado) y eliminación del sobrenadante por encima del filtro, se ha tratado el filtrado con 1 mL de tampón de lisis durante 10 min. Se ha centrifugado el tubo 5 min a 5.500 g, y se ha eliminado el sobrenadante.

[0144] A continuación se ha tomado nuevamente el depósito en una solución que comprendía 50 µL de sustrato HMRZ-86 (0,8 g/L) y 50 µL de CHAPS (20 g/L). Después de homogeneización en vórtex, se ha incubado el tubo 15 min a temperatura ambiente, y seguidamente se ha anotado cualquier cambio de color.

10

Protocolo «aglomeración - decantación»

[0145] Se ha tomado 1 ml de hemocultivo y se le han añadido 200 mg de PEG. Se ha dejado la mezcla decantar durante 15 min. Se han colocado 500 µL de sobrenadante en otro tubo. Después de un centrifugado durante 5 min a 5.500 g y eliminación del sobrenadante, el depósito se ha tratado con 1 mL de tampón de lisis, y después de 10 min se ha sometido a un nuevo centrifugado durante 5 min a 5.500 g.

[0146] A continuación se ha vuelto a tomar el depósito en una solución que comprende 50 µL de sustrato HMRZ-86 (0,8 g/L) y 50 µL de CHAPS (20 g/L). Después de homogeneización en vórtex seguida de una incubación durante 15 min a temperatura ambiente, se ha anotado cualquier cambio de color.

[0147] El conjunto de estos tres protocolos permite limitar la coloración roja debida al hemocultivo y la identificación rápida de las C3GR.

25 [0148] Se han aplicado a una cepa C3GR y una cepa C3GS: la prueba con la cepa C3GR mostraba una coloración roja viva mientras que la prueba con la cepa C3GS permanecía amarilla anaranjada.

Ejemplo 4 (fuera de invención): **Detección de la actividad de glucosidasa de *Candida tropicalis* (sustrato: 5-bromo 4-cloro-3-indolil-α-glucósido) de *Enterococcus faecalis* (sustrato: 5-bromo 4-cloro-3-indolil-β-glucósido) y de la actividad de esterasa de *Pseudomonas aeruginosa* o de *Salmonella enteritidis* (sustrato: butirato de 5-bromo 4-cloro 3-indolilo) directamente a partir de orina**

[0149] Se han contaminado artificialmente muestras de orina proveniente de sujetos sanos. Para ello, se ha preparado una suspensión bacteriana a 0,5 McF (aproximadamente 10⁷⁻⁸ ufc/ml) en agua fisiológica. Esta suspensión se ha centrifugado durante 5 min a 6.000 g y se ha eliminado el sobrenadante. A continuación se ha vuelto a tomar el depósito en 1 mL de orina de manera que se obtenga una concentración de aproximadamente 10⁷⁻⁸ ufc/ml de orina. La orina contaminada ha sido incubada durante 15 a 30 min. A continuación se ha centrifugado durante 5 min a 6.000 g y se ha eliminado el sobrenadante. Se ha vuelto a tomar el depósito en una solución que comprende 50 µL de sustrato cromógeno 2X y 50 µL de detergente 2X. El viraje de color se ha observado después de 30 min de incubación a temperatura ambiente.

[0150] Los resultados obtenidos en la prueba de detección de actividad glucosidasa son presentados en las tablas 4 y 5.

45

Tabla 4

| | <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Sustrato | X-α-glucósido |
| Tiempo de lectura | 30 min |
| Tampón de fosfato 0,1 M pH 7 (Tp) | Blanco |
| Tp + Digitonina 0,5 g/L | Azul |
| Tp + OTG 5 g/L | Azul |

(OTG = Octil-β-tioglucopiranósido; X=5-bromo 4-cloro 3-indolilo).

Tabla 5

| | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 |
|------------------------------|---|
| Sustrato | X-β-glucósido |
| Tiempo de lectura | 30 min a TA |
| Tampón de fosfato 0,1 M pH 7 | Reflejo azul / azul claro |

[0151] Los resultados obtenidos en la prueba de detección de actividad esterasa son presentados en las tablas 6 y 7.

5

Tabla 6

| <i>P. aeruginosa</i> RDC 45 | |
|-----------------------------------|---------------|
| Sustrato | X-butirato |
| Tiempo de lectura | 45 min a 37°C |
| Tampón de fosfato 0,1 M p H7 (Tp) | Blanco |
| Tp + PoliB 250 mg/L | Azul |
| Tp + CHAPS 10 g/L | Blanco |
| Tp + CHAPS + PoliB | Azul |

(poliB = polimixina B)

Tabla 7

| <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 | |
|--|-----------------------------------|
| Sustrato | X-butirato |
| Tampón | Tampón de fosfato 0,1 M pH 7 (Tp) |
| Tiempo de lectura | 1 h a TA |
| Tp +PoliB 250 mg/L | Reflejo azul (RA) / azul claro |
| Tp + CHAPS 10 g/L | RA |
| Tp + Tween 20 0,2% | RA |
| Tp + CHAPS + PoliB | RA / azul claro |
| Tp + Tween 20 + PoliB | RA / azul claro |

10 **[0152]** Se ha sometido a ensayo la influencia de la temperatura y del tiempo de incubación (ver **tabla 8**).

Tabla 8

| <i>P. aeruginosa</i> RDC 45 | | | |
|---|------------|-------------------|-------------------|
| Sustrato | X-butirato | | |
| Tiempo de lectura | 1 h a TA | 45 min a 37°C | 1 h 15 a 37°C |
| Testigo negativo sin bacterias en Tp (tampón de fosfato 0,1 M pH 7) | ND | Blanco | Blanco |
| Tp | ND | Blanco | Reflejo azul (RA) |
| Tp + CHAPS 10 g/L | Blanco | Blanco | RA |
| Tp + PoliB 250 mg/L | RA- | Azul claro | Azul |
| Tp + CHAPS + PoliB | RA- | Azul claro | Azul- |

ND: no determinado

15 **Ejemplo 5: Detección de β -lactamasa que confiere a los microorganismos que la producen una resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, directamente a partir de hemocultivos positivos a bacilos gramnegativos.**

20 **[0153]** Este ejemplo muestra que es posible detectar la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (C3G) en enterobacterias u otros bacilos gramnegativos como las *Pseudomonas* directamente desde hemocultivo.

[0154] El estudio se ha realizado de modo prospectivo a partir de hemocultivos positivos a bacilos gramnegativos aerobios. El protocolo indicado a continuación se ha realizado el mismo día en que se los hemocultivos han sido detectado como positivos por el autómatas (BacT/ALERT de Biomérieux).

25

Protocolo de lisis

30 **[0155]** Se han tomado 0,5 ml de hemocultivo y se les han añadido de 0,5 mL de tampón de lisis. Se ha agitado la mezcla brevemente en vórtex y después se ha dejado en contacto durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se ha realizado una etapa de centrifugado (2 min a 3.000 rpm) y se ha eliminado el sobrenadante. Seguidamente se ha sometido al depósito dos veces a las etapas siguientes: adición de 1 mL de tampón de lisis, breve agitación en vórtex, espera de 10 min, centrifugado durante 2 min a 3.000 rpm y eliminación del sobrenadante. Después se ha tomado el depósito en una solución que comprende 50 μ L de sustrato HMRZ-86

(1,2 g/L) y 50 µL de CHAPS (30 g/L). Tras homogeneización en vórtex, se ha incubado el tubo 15 min a temperatura ambiente. Se ha anotado cualquier cambio de color después de centrifugado durante 2 min a 3.000 rpm.

[0156] Las cepas detectadas se detallan en la **tabla 9**.

5

Tabla 9

| | Cepas sensibles (C3GS) | Cepas resistentes (C3GR) |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 | - |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 10 | 3 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | - | 1 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | - |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1 | - |
| TOTAL | 15 | 4 |

[0157] Los resultados se presentan en la **tabla 10**.

10

Tabla 10

| | Cepas resistentes | Cepas sensibles |
|------------------------|--------------------------|------------------------|
| Viraje «significativo» | 4 | 1 |
| Viraje dudoso | - | - |
| Ausencia de viraje | - | 14 |

[0158] Este ejemplo muestra así que el protocolo de lisis permite la detección de β-lactamasa que confieren a los bacilos gramnegativos aerobios que la producen una resistencia a las cefalosporinas de tercera generación directamente a partir de hemocultivos positivos. Aparte de una cepa C3GS que ha sido detectada como "falso positivo", la prueba realizada con las cepas C3GS mostraba una coloración de amarillo claro a amarillo anaranjado mientras que la prueba con las cepas C3GR viraba de amarillo a rojo intenso.

15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección *in vitro* de una enzima de un microorganismo resistente a las cefalosporinas de tercera generación a partir de una muestra biológica, seleccionándose dicha enzima para
5 detección en el grupo constituido por β -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:
- a1) concentrar los microorganismos presentes en la muestra biológica, opcionalmente después de una etapa a0) de cultivo de los microorganismos;
- 10 b1) poner en suspensión los microorganismos concentrados en la etapa a1) en una solución que comprende al menos un sustrato cromógeno susceptible de liberar un cromóforo después de hidrólisis por la enzima para detección, siendo dicho sustrato cromógeno el compuesto HMRZ-86 (trifluoroacetato del ácido (7R)-7-[2-(aminotiazol-4-il)-(z)-2-(1-carboxi-1-metiloxiimino) acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, isómero E) o una sal del mismo;
- 15 c1) detectar la posible liberación del cromóforo obtenida en la etapa b1);
- siendo la liberación del cromóforo detectada en la etapa c1) indicativa de la presencia de la enzima para detección y comprendiendo dicho procedimiento además, cuando la muestra biológica es una muestra que contiene sangre o
20 hematíes:
- una etapa de lisis de los hematíes presentes en la muestra biológica antes de la etapa b1) de puesta en suspensión o antes de la etapa a1) de concentración, y/o
 - una etapa a') de preparación de la muestra biológica antes de la etapa a1) de concentración de microorganismos,
- 25 comprendiendo la etapa a'):
- (i) la aglutinación de los hematíes, y
 - (ii) la separación de los hematíes aglutinados de los microorganismos presentes en la muestra.
- 30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre o una muestra de orina.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre y la etapa a0) de cultivo es una etapa de hemocultivo.
- 35 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la etapa b1) el sustrato cromógeno se pone en presencia de al menos un inhibidor de β -lactamasa seleccionado entre el grupo constituido por un inhibidor de cefalosporinasa, un inhibidor de serina β -lactamasas, un agente de quelación de metal y un inhibidor de β -lactamasa de espectro extendido.
- 40 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa a1) de concentración comprende el centrifugado de la muestra biológica seguida por la eliminación del sobrenadante obtenido.