

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 823**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2012 PCT/EP2012/072908**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072494**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12787734 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2780464**

54 Título: **Procedimiento para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en una muestra**

30 Prioridad:

18.11.2011 EP 11306516

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

05.07.2017

73 Titular/es:

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS

(APHP) (33.3%) y

UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI (33.3%)

72 Inventor/es:

NORDMANN, PATRICE;

DORTET, LAURENT y

POIREL, LAURENT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 621 823 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 para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en una muestra

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar la presencia de una β -lactamasa de amplio espectro (β -lactamasa que hidroliza las cefalosporinas de amplio espectro) en una muestra clínica o a partir de bacterias cultivadas.

Antecedentes de la invención

- 10 Las bacterias Gram-negativas son causantes importantes de infecciones adquiridas en comunidad y hospitalarias, siendo *Escherichia coli* el agente patógeno más importante para el ser humano. Las *Enterobacteriaceae* Multirresistentes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter spp.*), *Pseudomonas sp.* y *A. baumannii* a menudo se asocian con opciones terapéuticas limitadas. Estos aislados resistentes a multifármacos expresan la mayoría una β -lactamasa con amplia actividad contra las cefalosporinas de amplio espectro tales como cefotaxima, y/o ceftazidima, y/o cefepima, y/o aztreonam. Estos productores de β -lactamasas de amplio espectro pueden ser difíciles de detectar utilizando el ensayo de rutina de susceptibilidad a antibióticos y pueden parecer inicialmente que son susceptibles a varias moléculas de cefalosporina de amplio espectro. La identificación inexacta y/o retardada de las bacterias productoras de β -lactamasas tiene como resultado la selección inapropiada asociada de la terapia antimicrobiana y el fallo en el tratamiento. Por lo tanto una detección rápida y óptima de los productores de β -lactamasas de amplio espectro tiene una importancia principal en los cuadros clínicos

- 15 Las β -lactamasas se clasifican habitualmente de acuerdo con dos esquemas generales diferentes; la clasificación molecular de Ambler y la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros. El esquema de Ambler clasifica las β -lactamasas en cuatro clases de acuerdo con la homología proteica de las enzimas, las β -lactamasas A, C y D son serina- β -lactamasas y la clase B son metalo- β -lactamasas. La segunda clasificación es el esquema funcional de Bush-Jacoby-Medeiros basado en las propiedades funcionales de las enzimas. La expresión " β -lactamasas de amplio espectro (ESBL)" se aplicaba originalmente a los derivados TEM y SHV que pueden hidrolizar oximino cefalosporinas que se clasificaron en el grupo 2be en el esquema funcional Bush-Jacoby-Medeiros en los 80. Estas enzimas pertenecen al grupo de la clase A de Ambler de β -lactamasas y su actividad se inhibe por los inhibidores de la clase A tal como tazobactam, ácido clavulánico y sulbactam. Se han descrito más de 700 β -lactamasas distintas, muchas de ellas hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro y pertenecen a cada tipo de los grupos de enzimas Ambler. Además varias de estas enzimas de amplio espectro pueden hidrolizar no solo las cefalosporinas sino también los carbapenems que son los β -lactámicos con el mayor amplio espectro de actividad.

Por lo tanto, las β -lactamasas de amplio espectro se pueden agrupar de la siguiente manera en cada clase de enzimas Ambler.

- 35 1- Las enzimas de clase A de Ambler; se inhiben por el ácido clavulánico tazobactam y sulbactam. Estas enzimas (ESBL) son principalmente los grupos SHV, TEM y CTX-M. Mientras que las ESBL SHV y TM se han informado sobre todo en *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *Enterobacter sp.*) como fuente de infecciones hospitalarias, las CTX-M han llegado a ser el temor principal para los pacientes también de la comunidad. Se pueden identificar en hasta un 60 a 80 % de los aislados de *E. coli* en ciertas áreas del mundo tales como Asia. Se identifican no solo en las infecciones del tracto urinario que es la principal fuente de infecciones debido a *E. coli* sino también en infecciones mucho más graves tales como neumonía y septicemia. Las enzimas CTX-M se identifican principalmente en *Enterobacteriaceae* en plásmidos transferibles. Unas cuantas enzimas de esta clase tal como las enzimas KPC pueden hidrolizar adicionalmente los carbapenems.
- 40 2- Enzimas de clase B de Ambler. Estas enzimas poseen todas las propiedades adicionales para hidrolizar carbapenems las cuales no se inhiben por ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, sino por quelantes del zinc (EDTA). Estas metalo- β -lactamasas se identifican mayoritariamente entre los agentes patógenos adquiridos en los hospitales tales como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Son mayoritariamente de los tipos IMP, VIM y NDM.
- 45 3- Las enzimas de clase C de Ambler o conocidas comúnmente como "cefalosporinasas" hidrolizan las cefalosporinas de amplio espectro con una extensión diversa. Su actividad se inhibe por la cloxacilina y otras moléculas relacionadas con la metilicina así como por el ácido borónico. Se identifican en muchas especies Enterobacterianas (*Enterobacter sp.*, *Serratia*, *Citrobacter freundii*...), *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii*. Estas enzimas codificadas en el cromosoma se expresan a bajos niveles en las especies bacterianas de tipo silvestre lo que explica el porqué de que se mantengan susceptibles a las cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima en particular). Cuando se expresan a alto nivel, confieren un fenotipo de resistencia adquirida a las cefalosporinas. Además estos genes cefalosporinasa pueden identificarse en plásmidos en muchas otras especies enterobacterianas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Salmonella*) lo que explica un rasgo de resistencia adquirida a las cefalosporinas. Desde un punto de vista clínico, las cefalosporinasas adquiridas mediante plásmidos son menos frecuentes que las CTX-M a las que se pueden asociar en los mismos

aislados.

4- Las enzimas de clase D de Ambler con una capacidad amplia para hidrolizar cefalosporinas se han informado principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* (derivados de OXA-10). Su actividad no se inhibe ni por el ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam ni por EDTA.

- 5 Teniendo en cuenta la importancia de las ESBL en cualquier cuadro clínico (instalaciones de atención de agudos, instalaciones de atención a largo plazo, comunidades), la detección se ha enfocado en estas ESBL.

Se recomienda que al menos todos lo *E. coli* y *K. pneumoniae* significativos clínicamente se deberían someter a exploración de ESBL. Se recomienda que estas especies con una CIM ≥ 8 mg/l para la cefpodoxima o una CIM ≥ 2 mg/l contra ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, o aztreonam se deberían investigar utilizando ensayos confirmatorios del fenotipo. En estos ensayos fenotípicos, se compara la susceptibilidad a la cefotaxima, ceftazidima, sola o con inhibidores de β -lactamasa clase A. Se propuso el ensayo de sinergia de doble disco para este fin. Este ensayo se lleva a cabo en una placa de agar con un disco que contiene cefotaxima (30 μ g) y un disco que contiene amoxicilina/clavulanato (20 μ g/10 μ g, respectivamente) colocados con 20 mm de separación (de centro a centro). La extensión de la zona de inhibición alrededor del disco de cefotaxima respecto al disco de amoxicilina/clavulanato indica la producción de ESBL. Los discos que contienen otros oximino- β -lactámicos (ceftriaxona, ceftazidima, o aztreonam) pueden sustituirse por discos de cefotaxima. La técnica "Etest®" se utiliza también para la detección de ESBL. Es una técnica cuantitativa para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de muchos microorganismos. El sistema comprende un gradiente de antibiótico predefinido que se utiliza para determinar la Concentración Inhibidora Mínima (CIM), en mg/l, de diferentes agentes antimicrobianos contra microorganismos que se ensaya en medio agar utilizando una incubación de una noche. En el caso de la detección de ESBL, la tira del E-test se puede impregnar conteniendo en un lado un gradiente de concentración de ceftazidima y conteniendo en el otro lado un gradiente de concentración de ceftazidima más una concentración constante de clavulanato. Se han desarrollado tiras similares con cefotaxima/clavulanato o cefepima/clavulanato. Los resultados del Etest de ESBL se interpretan como positivos cuando se observa una disminución de más de 3 veces en el valor de la CIM del fármaco ensayado en presencia de clavulanato. La sensibilidad y especificidad del ensayo de doble disco y del E-test son bastante buenas variando del 80 al 95 %.

Se utilizan procedimientos automáticos para ensayar la identificación bacteriana y la susceptibilidad en la detección de organismos productores de ESBL. El sistema Phoenix BD (Becton-Dickinson) utiliza su software experto para interpretar la respuesta de crecimiento con ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefpodoxima con y sin clavulanato. De manera similar, el sistema Vitek2 (bioMérieux) utiliza una tarjeta que contiene ceftazidima y cefotaxima solas y en combinación con clavulanato. La ceftazidima y la cefotaxima más inhibidores de β -lactamasa también se utilizan en el sistema MicroScan Walkaway (Dade Behring). La actuación de estos sistemas varía y se diferencia según las especies que se investigan con una sensibilidad mucho mayor (80 % a 99 %) que la especificidad (50 % a 80 %).

Las técnicas basadas en PCR y otras técnicas moleculares también pueden ser de ayuda para identificar los genes ESBL pero consumen tiempo y son caras. Estas técnicas basadas en PCR necesitan el aislamiento de las bacterias a partir de las muestras clínicas antes de ensayar la susceptibilidad y la identificación fenotípica. Por lo tanto, los resultados se pueden obtener como pronto a las 48 horas tras la obtención de las muestras clínicas. No se llevan a cabo en una rutina de laboratorio sino que se restringen a fines epidemiológicos.

Como los pacientes con infecciones debidas a Enterobacterias productoras de ESBL tienden a tener resultados menos satisfactorios que los infectados con agentes patógenos que no producen ESBL, es importante detectar lo antes posible los productores de ESBL.

Para facilitar la detección de productores de β -lactamasa de amplio espectro (en particular ESBL) en el campo de la microbiología clínica, el Solicitante ha desarrollado un nuevo procedimiento basado en una simple técnica ácido-colorimétrica. Este procedimiento se basa en el concepto de que al hidrolizar el anillo β -lactámico de un sustrato de cefalosporina expandida, las enzimas generan un grupo carboxilo que a su vez acidifica un medio. La acidez resultante de esa hidrólisis se identifica por un cambio de color de un indicador de pH por color.

Este procedimiento sirve de ayuda para la diferenciación de productores de β -lactamasa de amplio espectro de los no productores.

Se obtienen resultados interpretables en muy poco tiempo, lo que es crucial cuando se diseña un tratamiento para los productores. Elimina la necesidad de utilizar las técnicas fenotípicas mencionadas anteriormente.

Este procedimiento ofrece una solución para la detección rápida, fiable, y asequible de productores de β -lactamasa de amplio espectro en particular los productores de ESBL. Esto se puede remitir a un procedimiento de industrialización de manera que se puede implementar en cualquier laboratorio de microbiología clínica en todo el mundo sin una carga de trabajo significativa adicional para los técnicos de laboratorio. Se puede utilizar directamente en las muestras clínicas y no solo en bacterias cultivadas en estadio de colonia.

Además, en el campo de la epidemiología, el uso de este procedimiento puede ser de mayor ayuda cuando se quieran seleccionar rápidamente cepas que se deberían ensayar por PCR y secuenciarse para la identificación de genes de β -lactamasas de amplio espectro.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar la presencia de producción de β -lactamasa expandida en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 5 a) llevar a cabo la lisis celular de la muestra de ensayo con el fin de obtener una suspensión enzimática;
 b) hacer reaccionar una fracción de la suspensión enzimática obtenida en la etapa a) con un kit reactivo, comprendiendo dicho kit reactivo
- una cefalosporina de amplio espectro o aztreonam como sustrato
 - un indicador de pH por color que cambiará de color cuando el pH de la mezcla de reacción esté comprendido entre 6,4 y 8,4

10 en el que un cambio de color tras la etapa b) indica la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro ESBL o no ESBL.

15 La presente invención también se refiere al uso de un kit reactivo que comprende una cefalosporina de amplio espectro o aztreonam o un sustrato de cefalosporinasa que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas y cefamicinas y un indicador de pH por color, para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro ESBL o no ESBL en una muestra de ensayo.

20 La invención también se refiere al uso de una placa de microtitulación que comprende un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de beta lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas o aztreonam, para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro ESBL y/o no ESBL en una muestra de ensayo y eventualmente para determinar la clase específica de la bacteria productora de β -lactamasa de amplio espectro ESBL o no ESBL en una muestra de ensayo.

Descripción detallada de la invención**Definiciones:**

25 Como se utiliza en el presente documento, "muestra de ensayo" significa cualquier material líquido o sólido que se va a ensayar que puede contener bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro ESBL o no ESBL. Normalmente, se puede aislar una colonia bacteriana de dicho material. La "muestra de ensayo" preferida es una muestra biológica.

Como se utiliza en el presente documento, una "muestra biológica" significa cualquier muestra biológica que se obtiene de un sujeto. Ejemplos de dichas "muestras biológicas" incluyen fluidos, tejidos, muestras celulares, etc. Las "muestras biológicas" preferidas son la sangre completa, suero, plasma u orina.

30 Como se utiliza en el presente documento "sujeto" denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente, un "sujeto" de acuerdo con la invención es un ser humano.

Como se utiliza en el presente documento "indicador de pH por color" es un compuesto químico halocrómico que se añade en pequeñas cantidades a una solución de manera que se puede determinar visualmente el pH de la solución/medio. El indicador da lugar a que el color de la solución/medio cambie dependiendo del pH.

35 Como se utiliza en el presente documento, "suspensión enzimática" significa que la etapa de lisis celular (etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención ayuda a liberar enzimas que están presentes en las células de la muestra de ensayo, obteniendo de esta manera una "suspensión enzimática".

40 Como se utiliza en el presente documento, "fracción" significa que todo o parte de la suspensión enzimática que se obtiene en la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención se toma con el fin de hacerla reaccionar con un kit reactivo en la etapa b). Normalmente una "fracción" de acuerdo con la invención es una parte de la suspensión enzimática. Preferentemente, un "fracción" de acuerdo con la invención es de 10 μ l a 50 μ l.

45 Como se utiliza en el presente documento, "kit" significa un producto que comprende varios componentes diferentes, como un producto de combinación, para su uso por separado, simultáneo o secuencial en el procedimiento de la invención. Preferentemente, los componentes son sustratos de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro ESBL o no ESBL que se seleccionan de entre el grupo que consiste en cefalosporinas y aztreonam, un indicador de pH por color, opcionalmente un inhibidor de ESBL.

Procedimiento de detección:

50 Como se ha mencionado anteriormente, la detección precoz de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro ESBL o no ESBL se ha convertido en un problema principal en el campo de la microbiología clínica con el fin de evitar su diseminación y adaptar rápidamente la terapia de antibióticos para tratar infecciones graves.

Como solución a este problema el Solicitante ha desarrollado un procedimiento rápido, fiable y asequible para detectar bacterias productoras que producen β -lactamasa de amplio espectro de cualquier tipo.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro ESBL o no ESBL en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) llevar a cabo la lisis de las células de una muestra de ensayo con el fin de obtener una suspensión enzimática;
b) hacer reaccionar una fracción de la suspensión enzimática obtenida en la etapa a) con un kit reactivo, comprendiendo dicho kit reactivo

- un sustrato de una bacteria que produce β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporina y aztreonam,
- un indicador de pH por color que cambiará de color cuando el pH de la mezcla de reacción esté comprendido entre 6,4 y 8,4,

en el que el cambio de color tras la etapa b) indica la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en la muestra de ensayo.

El procedimiento de la invención se basa en el concepto de que al hidrolizar los beta-lactámicos por bacterias que producen β -lactamasa de amplio espectro como sustrato, se genera un grupo carboxilo que a su vez acidifica un medio, típicamente un medio no tampón. La acidez resultante de esta hidrólisis se identifica entonces por un cambio de color de un indicador de pH por color. Un cambio de color indica la presencia de una bacteria productora de β -lactamasa de amplio espectro.

Normalmente, se inocula un caldo con la cepa de ensayo (que se obtiene de una muestra de ensayo) y se incuba en un agitador rotatorio. Después, el cultivo se centrifuga y el aglomerado se re-suspende en un tampón de lisis, se remueve y se incuba adicionalmente (de manera similar, se puede aplicar un protocolo de lisis directa, conocido por el experto en la técnica, utilizando colonias bacterianas cultivadas en un medio de cultivo sólido). Tras la incubación suficiente, se centrifuga la suspensión (es decir la suspensión enzimática) y se retira el sobrenadante y se coloca en hielo. Se mezcla una pequeña fracción de este sobrenadante con un kit reactivo que comprende un sustrato de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro y un indicador de pH por color. La mezcla compuesta por el kit reactivo y la suspensión enzimática que se ensaya se incuba posteriormente a una temperatura y durante una cantidad de tiempo suficientes para que se observe un cambio de color. Un cambio de color indica la presencia de una bacteria productora de β -lactamasa de amplio espectro. El cambio de color se puede obtener en tan poco tiempo como 5 minutos después del inicio de la incubación. En la mayoría de los casos, es suficiente un tiempo de 30 minutos para obtener un cambio de color evidente por las productoras de β -lactamasa de amplio espectro.

Normalmente, el uso del presente procedimiento puede ser de ayuda adicionalmente cuando se quieren seleccionar rápidamente cepas que se deberían ensayar por PCR y secuenciarse para la identificación de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro. En consecuencia una vez que la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro se ha determinado por el presente procedimiento, se pueden utilizar otras técnicas de identificación conocidas por los expertos en la técnica para caracterizar adicionalmente las enzimas.

Normalmente, una vez que se han detectado las bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro por el procedimiento de la invención las bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro se pueden utilizar adicionalmente para descubrir o evaluar nuevos inhibidores o nuevas moléculas resistentes a la actividad de las bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro. En el último caso, la nueva molécula que se va a evaluar puede reemplazar la molécula de sustrato de β -lactamasa de amplio espectro en el kit reactivo.

Normalmente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para detectar cualquier bacteria productora de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en bacterias gram positivas y gram negativas. Preferentemente, las bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro se seleccionan de entre el grupo que consiste en bacterias que tienen importancia clínica e incluso más preferentemente de entre el grupo que consiste en bacterias gram negativas que tienen importancia clínica.

Como se utiliza en el presente documento, bacterias de "importancia clínica" significa las bacterias implicadas en infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad.

Normalmente, las bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro se seleccionan de entre los géneros que consisten en *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pandoreae*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*, *Shigella* y *Strenotrophomonas*.

Normalmente, las bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro se seleccionan de entre el grupo que consiste en *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas junii*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pandora*

pnomenusa, Proteus mirabilis, Proteus rettgeri, Proteus vulgaris, Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Serratia marcescens, Shigella flexneri, Stenotrophomonas maltophilia, Ralstonia picketti y Shewanella algae

5 De acuerdo con la presente invención, las bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro se seleccionan preferentemente de entre los géneros que consisten en *Acinetobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Pseudomonas*, e incluso más preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste en *Acinetobacter baumannii, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

De acuerdo con la presente invención, el sustrato de β -lactamasa de amplio espectro es el que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas.

10 Normalmente, las cefalosporinas se seleccionan de entre el grupo que consiste en cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, cefpiroma y aztreonam.

Normalmente, la cefamicina se selecciona de entre el grupo que consiste en moxalactam y cefoxitina. Las cefamicinas son particularmente interesantes para la detección de varios tipos de β -lactamasas de amplio espectro no ESBL.

15 Preferentemente, el sustrato de β -lactamasa de amplio espectro es cefotaxima.

Normalmente, la concentración de sustrato de β -lactamasa que se utiliza en el kit reactivo está comprendida entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, más preferentemente entre 1 mg/ml y 5 mg/ml e incluso más preferentemente entre 3 mg/ml y 4 mg/ml.

20 De acuerdo con la invención, el indicador de pH por color cambiará de color cuando el pH de la mezcla de reacción esté comprendido entre 6,4 y 8,4, preferentemente entre 6,6 y 7,5.

Normalmente, la concentración del indicador de pH por color que se utiliza en el kit reactivo está comprendida entre un 0,01 % y un 1 %, más preferentemente entre un 0,03 % y un 0,08 % e incluso más preferentemente entre un 0,05 % y un 0,06 %.

25 Normalmente, el experto en la técnica es capaz de seleccionar un indicador de pH por color apropiado para esta reacción de hidrólisis. Una lista de indicadores de pH que se pueden utilizar en la presente invención se puede encontrar en el CRC Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-reference Book of Chemical and Physical Data, 91ª ed. revisada (1 de junio de 2010), CRC Press Inc. Por ejemplo, el indicador de pH por color que se utiliza en la presente invención se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en 6,8-dinitro-2,4-(1H) quinazolindiona (pH: 6,6 a 7,8), rojo fenol (pH: 6,6 a 8,0) y rojo neutro (pH: 6,8 a 8,0).

30 Preferentemente, el indicador de pH por color que se utiliza en la presente invención es rojo fenol y cuando se utiliza, un cambio de color de rojo a amarillo indica la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro ESBL o no ESBL en la muestra de ensayo.

35 Normalmente, la reacción de la etapa b) se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para observar un cambio de color. Preferentemente, el cambio de color se observa visualmente en el periodo de tiempo comprendido entre los 5 minutos y los 120 minutos, preferentemente entre 10 minutos y 60 minutos, más preferentemente entre 20 minutos y 40 minutos. De manera alternativa, la identificación del cambio de color se puede automatizar utilizando por ejemplo un fotómetro.

Normalmente, la reacción de la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15 °C y 40 °C, preferentemente entre 18 °C y 37 °C, más preferentemente entre 20 °C y 37 °C.

40 Basándose en estudios moleculares, las β -lactamasas de amplio espectro ESBL y no ESBL se pueden dividir adicionalmente en cuatro tipos de acuerdo con la clasificación de Ambler:

- Enzimas clase A de Ambler ("ESBL")
- Enzimas clase B de Ambler (metalo- β -lactamasas)
- Enzimas clase C de Ambler ("cefalosporinas")
- 45 Enzimas clase D de Ambler ("oxacilinasas")

50 Normalmente, se inocula un caldo con una cepa de ensayo (obtenida de una muestra de ensayo) y se incuba en un agitador rotatorio. Después, el cultivo se centrifuga y el aglomerado se re-suspende en un tampón de lisis, se revuelve y se incuba adicionalmente. Después de una incubación suficiente, la suspensión (es decir, la suspensión enzimática) se centrifuga y el sobrenadante se retira y se coloca en hielo. Se mezcla una pequeña fracción de este sobrenadante con el kit reactivo que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro, un indicador de pH por color. La mezcla compuesta por el kit reactivo y la suspensión enzimática que se ensaya se incuba adicionalmente a una temperatura y durante la suficiente cantidad de tiempo para que se observe un cambio de color. Un cambio de color indica la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro. El cambio de color se puede obtener en tan poco tiempo como 5 minutos tras el inicio de la incubación. En la mayoría

de los casos, un tiempo de incubación de 30 minutos es suficiente para obtener un cambio de color evidente para al menos los productores de ESBL.

En una realización preferida, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 5 a) llevar a cabo la lisis celular de una muestra biológica con el fin de obtener una suspensión enzimática;
 b) hacer reaccionar una fracción de la suspensión enzimática que se obtiene en la etapa a) con un kit reactivo, comprendiendo dicho kit reactivo
- cefotaxima como sustrato de β -lactamasa de amplio espectro, y
 - rojo fenol como indicador de pH por color,

- 10 en el que un cambio de color de rojo a amarillo tras la etapa b) indica la presencia de una bacteria productora de β -lactamasa de amplio espectro en la muestra biológica.

De acuerdo con una realización, con el fin de identificar específicamente la clase o la bacteria productora de β -lactamasa de amplio espectro que está presente en la muestra, y si se trata de una β -lactamasa de clase A, B, C, D según Ambler, se puede utilizar un inhibidor de β -lactamasa.

- 15 Normalmente, el inhibidor de β -lactamasa puede ser mono-específico para una clase de β -lactamasa. Por ejemplo los inhibidores de β -lactamasa se seleccionan de entre el grupo que consiste en ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam, y ácido aminofenilborónico para la clase A de β -lactamasas de Ambler, y se seleccionan de entre el grupo de M penicilinas para la clase C de β -lactamasas de Ambler.

En una realización preferida, el inhibidor mono-específico para la clase A de β -lactamasas de Ambler es tazobactam.

- 20 En una realización preferida, el inhibidor mono-específico de β -lactamasa para la clase B de β -lactamasas de Ambler es EDTA más o menos asociado con el agotamiento de zinc.

En una realización preferida, el inhibidor mono-específico de β -lactamasa para la clase C de β -lactamasas de Ambler es cloxacilina u oxacilina.

- 25 Normalmente, el inhibidor de carbapenemasa puede ser bi-específico para más de una clase de enzimas, tal como por ejemplo NLX-104 que es bi-específico para las carbapenemasas de las clases A y D de Ambler.

Normalmente, la concentración del inhibidor mono-específico de β -lactamasa para la clase A de β -lactamasas de Ambler (tales como por ejemplo tazobactam) está comprendida entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, más preferentemente entre 1 mg/ml y 5 mg/ml e incluso más preferentemente entre 2 mg/ml y 4 mg/ml.

- 30 Normalmente, la concentración de inhibidor mono-específico de carbapenemasa para las carbapenemasas de clase B de Ambler (tales como por ejemplo EDTA) está comprendida entre 0,001 M y 0,5 M, más preferentemente entre 0,001 M y 0,01 M e incluso más preferentemente de 0,005 M.

Normalmente, la concentración de inhibidor mono-específico de β -lactamasa para la clase C de β -lactamasas de Ambler (tales como por ejemplo, cloxacilina y oxacilina) está comprendida entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, más preferentemente entre 1 mg/ml y 5 mg/ml e incluso más preferentemente entre 2 mg/ml y 4 mg/ml.

- 35 Normalmente, la concentración de inhibidor bi-específico de β -lactamasa para las β -lactamasas de las clases A y D de Ambler (tal como por ejemplo NXL-104) está comprendida entre 0,05 mg/ml y 10 mg/ml, más preferentemente entre 1 mg/ml y 8 mg/ml e incluso más preferentemente entre 3 mg/l y 5 mg/ml.

- 40 Normalmente, con el fin de identificar la clase de β -lactamasa de amplio espectro, se puede utilizar una placa de microtitulación de 96 pocillos dividiendo la placa en cuatro secciones. En una primera sección, la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro se puede detectar de acuerdo con el procedimiento de la invención como se ha descrito anteriormente. En una segunda sección, se pueden detectar las ESBL de clase A de Ambler añadiendo un inhibidor de β -lactamasa para las β -lactamasas de clase A. En una tercera sección, las metalo- β -lactamasas de clase B de Ambler se pueden detectar añadiendo un inhibidor de β -lactamasa para las β -lactamasas de clase B. En una cuarta sección, las cefalosporinasas de clase C de Ambler se pueden detectar añadiendo un inhibidor de β -lactamasa para las β -lactamasas de clase C. Finalmente en una quinta sección, se pueden detectar la β -lactamasa de clase D de Ambler añadiendo un inhibidor de β -lactamasa para las carbapenemasas de clase D. Dependiendo del inhibidor de β -lactamasa que se utilice, el experto en la técnica es capaz entonces, por simple deducción, de establecer la clase(s) específica(s) de Ambler de la β -lactamasa de amplio espectro que está(n) presente(s) en la muestra de ensayo.

- 50 Normalmente, el inhibidor de β -lactamasa puede ser parte del propio kit reactivo y por lo tanto se añade al mismo tiempo que el sustrato de β -lactamasa de amplio espectro, el indicador de pH por color.

De manera alternativa, el inhibidor de β -lactamasa puede estar separado del kit reactivo y por lo tanto se añade simultáneamente o secuencialmente al kit reactivo y/o la muestra de ensayo (la fracción de la suspensión enzimática).

5 Una vez que se ha llevado a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención en las cuatro secciones, es decir, con o sin los inhibidores de β -lactamasa, se establece una comparación entre los resultados obtenidos tras llevar a cabo el procedimiento como se ha descrito anteriormente y los resultados obtenidos tras llevar a cabo el mismo procedimiento en el cual se añadió adicionalmente el inhibidor de β -lactamasa.

Kit reactivo:

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un kit reactivo que comprende un sustrato de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un indicador de pH por color.

De acuerdo con una realización de la invención, el kit reactivo puede comprender un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro, un indicador de pH por color.

15 De acuerdo con una realización de la invención, el kit reactivo puede comprender adicionalmente un inhibidor de β -lactamasa. Por lo tanto, el kit reactivo puede comprender un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro, un indicador de pH por color y un inhibidor de β -lactamasa.

El sustrato de β -lactamasa de amplio espectro, el indicador de pH por color y el inhibidor de β -lactamasa de amplio espectro son como se han definido anteriormente en la presente solicitud de patente.

20 Normalmente, el kit reactivo se utiliza para detectar la presencia de β -lactamasa de amplio espectro en una muestra de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Normalmente, cuando el inhibidor específico de β -lactamasa está presente en el kit reactivo, se puede determinar la clase específica de β -lactamasa correspondiente, sea la clase A, B, C o D de Ambler.

Placa de microtitulación:

25 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una placa de microtitulación que comprende un pocillo o una serie de pocillos que comprenden un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro y cefalosporinas que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas.

Normalmente, la placa de microtitulación comprende:

- 30 - un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un inhibidor de β -lactamasa clase A de Ambler;
- un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un inhibidor de β -lactamasa clase B de Ambler;
- 35 - un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un inhibidor de β -lactamasa clase C de Ambler;
- un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un inhibidor de β -lactamasa clase D de Ambler.

40 La placa de microtitulación puede contener también un pocillo de control o una serie de pocillos de control que se puede ensayar y comparar con las muestras de ensayo.

Normalmente, la placa de microtitulación es una placa de microtitulación de 96 pocillos.

45 Se pueden utilizar dispositivos distintos de placas de microtitulación para este fin. Por ejemplo, se puede utilizar un papel de transferencia en el que el kit reactivo (es decir el sustrato de β -lactamasa de amplio espectro y el indicador de pH por color) se ha incorporado. Al añadir la suspensión enzimática al papel de transferencia, se puede observar si el papel cambia de color o no. De manera similar, se pueden utilizar galerías de plástico. Además, el kit reactivo puede incluirse en estas galerías de plástico y luego, al añadir la suspensión enzimática en estas galerías se puede observar si hay un cambio de color o no.

50 Con el fin de llevar a cabo el procedimiento de la invención, se añade un indicador de pH por color, y una fracción de la suspensión enzimática que se va a ensayar a cada pocillo de la placa de microtitulación. En consecuencia, se proporciona el uso de una placa de microtitulación para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en una muestra de ensayo de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, por lo que en cada pocillo se añade al menos un indicador de pH por color y una fracción de suspensión enzimática

que se va a ensayar. La placa de microtitulación es particularmente muy adecuada para determinar la clase específica de β -lactamasa de amplio espectro que está presente en la muestra.

5 Normalmente, si el indicador de pH por color es estable, el pocillo o serie de pocillos de la placa de microtitulación también puede comprender el indicador de pH por color con el sustrato de β -lactamasa de amplio espectro o con la β -lactamasa de amplio espectro y el inhibidor de β -lactamasa antes de llevar a cabo el procedimiento de la invención. De manera alternativa, si el indicador de pH por color no es estable, se puede añadir más tarde al pocillo o serie de pocillos.

El sustrato de β -lactamasa de amplio espectro, el indicador de pH por color y el inhibidor de β -lactamasa son los que se han definido anteriormente en la presente solicitud de patente.

10 De acuerdo con una realización, algunos de los componentes tales como por ejemplo, un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro y el inhibidor de β -lactamasa (si está presente), puede unirse directamente a una superficie sólida de la placa de microtitulación. En este caso, los componentes restantes (es decir, el indicador de pH por color) se añaden al sustrato de β -lactamasa de amplio espectro unido a la superficie y (si está presente) el inhibidor de β -lactamasa unido a la superficie en la placa de microtitulación con la muestra de ensayo.

15 De acuerdo con una realización, la placa de microtitulación, así como cada uno de los elementos que se utilizan para llevar a cabo el procedimiento de la invención se pueden incluir en un envase individual y todos los distintos envases se pueden colocar en un único paquete junto con las instrucciones para la observación de si pueden encontrarse bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en la muestra de ensayo.

La invención se ilustrará adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplos.

20 **Figuras**

Figura 1. Resultados del procedimiento de detección de productores de ESBL.

Los productores de ESBL (panel A) son los siguientes: *E. coli* FOR CTX-M-15 (1), *E. coli* GUE CTX-M-1 (2), *E. coli* DEV CTX-M-3 (3), *E. coli* GAL CTX-M-14. (4), *K. pneumoniae* ISS CTX-M-14 (5), *K. pneumoniae* DOU CTX-M-15 (6), *E. cloacae* MAZ CTX-M-15 (7), *E. coli* SHV-2a (8), *E. coli* SHV-12 (9), *E. coli* TEM-52 (10)

25 Los no productores de ESBL (panel B) son los siguientes: *E. coli* BG 1106 6175 tipo silvestre (1), *E. coli* BG 1106 6207 tipo silvestre (2), *E. coli* BG 1106 6301 tipo silvestre (3), *S. enterica* BG 1106 6187 tipo silvestre (4), *K. oxytoca* BG 1106 6141 tipo silvestre (5), *K. pneumoniae* BG 1106 7725 tipo silvestre (6), *K. pneumoniae* BN 1113 0227 tipo silvestre (7), *E. coli* MAC BG 1106 7257 penicilinas (8), *E. coli* BG 1106 5898 penicilinas (9), *E. coli* BN 1113 0228 penicilinas (10), *E. coli* BN 1113 0231 penicilinas (11), *E. cloacae* BG 1106 7746 tipo silvestre (12), *C. freundii* BG 1106 7767 tipo silvestre (13), *E. aerogenes*, *E. cloacae* BN 1113 0225 tipo silvestre (14), *M. morgani* BG 1106 5902 tipo silvestre (15), *E. cloacae* BG 1106 7725 tipo silvestre (16).

30 **Figura 2. Resultados (panel A) y estrategia (panel B) para la detección de productores de ESBL directamente de cultivos sanguíneos.** Se aplicó el ensayo a dos cultivos sanguíneos positivos (panel A) y la identificación de confirmación del contenido de β -lactamasa se observaba 24-36 h después. El uso del ensayo permitía la detección precoz de productores de ESBL y la terapia adecuada (panel B).

Ejemplos

Ejemplo 1 – Procedimiento (ensayo ácido-colorimétrico) de acuerdo con la invención

40 Se incluyeron en el estudio seis no productores de β -lactamasas, siete productores de penicilinasas sin actividad de amplio espectro, cinco productores de bajo nivel de cefalosporinasas, trece productores de ESBL, dos productores de enzimas de clase D de amplio espectro (F), tres productores de cefalosporinasas codificadas por plásmidos (G), seis sobre-productores de cefalosporinasas cromosómicas, y (H) dos productores de enzimas de clase B de la colección de cepas del Solicitante y de origen mundial (Tabla 1).

Las cepas se remitieron para el procedimiento de la presente invención de la siguiente manera.

45 La equivalencia de un asa de 10 μ l de cepas bacterianas cultivadas anteriormente en soja agar tripticasa se re-suspendieron en tampón de lisis Tris-HCl 20 mM + Triton X-100 2 % + Tween 20 al 0,5 %, se removió durante 1 min y se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 30 min. Esta suspensión bacteriana se centrifugó a 10.000 g a 4 °C durante 5 min, y los sobrenadantes se retiraron y se colocaron en hielo. Se mezclaron 50 μ l de esta suspensión de sobrenadantes (es decir, la suspensión enzimática) en un pocillo de una placa de 96 pocillos con 50 μ l de una solución de 1 ml compuesta de 3 mg de cefotaxima, solución de rojo fenol pH 7,5 (es decir el kit reactivo).

50 La solución de rojo fenol que se utilizó por el Solicitante se fabricó tomando 2,2 ml de una solución de fenol concentrada de pH 8 (producida a partir de una mezcla de rojo fenol al 0,5 % en agua destilada) a la que el Solicitante añadió 16,6 ml de agua destilada. El valor del pH se ajustó entonces a 7,5 añadiendo gota a gota una solución de NaOH 1 N.

Las mezclas del kit reactivo y la suspensión enzimática que se ensaya se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 h. Las suspensiones de cepas bacterianas que producían β -lactamasas de amplio espectro o no (controles positivos y negativos) también se ensayaron de acuerdo con el procedimiento de la invención (Tabla 1). El color de los pocillos cambiaba de rojo a amarillo en todas las cepas ensayadas que producían β -lactamasas de amplio espectro mientras que los pocillos correspondientes a los extractos bacterianos de aislados que no producían β -lactamasas de amplio espectro se mantenían rojos. El cambio de color de rojo a amarillo se obtenía tan pronto como a los 15 min tras el inicio de la incubación para los productores de CTX-M-15. En la mayoría de los casos, un tiempo de incubación de 40 min era suficiente para obtener un cambio de color evidente para los productores de ESBL (Figura 1). El cambio de color aunque aun siendo positivo era menos evidente en varios aislados tales como varios productores de ESBL tipo SHV (Figura 1). El ensayo se llevó a cabo como un estudio con ocultación por una persona que no sabía qué pocillo contenía los productores de ESBL. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado con resultados altamente reproducibles.

La estrategia y utilidad clínica de la detección de los productores de ESBL directamente a partir de un cultivo sanguíneo positivo se muestra en la Figura 2.

Tabla 1. Resultados de la exploración de (A) seis no productores de β -lactamasa, (B) siete productores de penicilinasas (enzimas clase A de Ambler) sin actividad de amplio espectro, (C) cinco productores de bajo nivel de cefalosporinasas, (D) trece productores de ESBL, (E) dos productores de enzimas de clase D de amplio espectro, (F) tres productores de cefalosporinasas codificadas por plásmidos, (G) seis sobre-productores de cefalosporinasas cromosómicas, y (H) dos productores de enzimas de clase B.

	Especies	Contenido en β -lactamasa	Origen	Ensayo de Detección	
				CTX	CTX + TAZ
A	<i>E. coli</i> BG 1106 6252	Tipo silvestre	Cultivo sanguíneo	-	-
	<i>E. coli</i> BG 1106 6367	Tipo silvestre	Cultivo sanguíneo	-	-
	<i>E. coli</i> BG 1106 6175	Tipo silvestre		-	-
	<i>E. coli</i> BG 1106 6207	Tipo silvestre		-	-
	<i>E. coli</i> BG 1106 6301	Tipo silvestre		-	-
	<i>S. enterica</i> BG 1106 6187	Tipo silvestre	Heces	-	-
B	<i>K. oxytoca</i> BG 1106 6141	Tipo silvestre	Orina	-	-
	<i>K. pneumoniae</i> BG 11067725	Tipo silvestre	Leche materna	-	-
	<i>K. pneumoniae</i> BG 1113 0227	Tipo silvestre	Orina	-	-
	<i>E. coli</i> MAC BG 1106 7257	Penicilinasas	Esputo	-	-
	<i>E. coli</i> BG 1106 5898	Penicilinasas	Cultivo sanguíneo	-	-
	<i>E. coli</i> BG 1113 0228	Penicilinasas		-	-
	<i>E. coli</i> BG 1113 0231	Penicilinasas	Orina	-	-

20

(continuación)

	Especies	Contenido en β -lactamasa	Origen	Ensayo de Detección	
				CTX	CTX + TAZ
C	<i>E. cloacae</i> BG 1106 7746	Tipo silvestre	Espujo	-	-
	<i>C. freundii</i> BG 1106 7767	Tipo silvestre	Orina	-	-
	<i>E. cloacae</i> BN 1113 0225	Tipo silvestre	Espujo	-	-
	<i>M. morgani</i> BG 1106 902	Tipo silvestre	Espujo	-	-
	<i>E. cloacae</i> BG 1106 7725	Tipo silvestre	Leche materna	-	-
D	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>E. coli</i> FOR	CTX-M-15	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>E. coli</i> GUE	CTX-M-1	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>E. coli</i> DEV	CTX-M-3	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>E. coli</i> GAL	CTX-M-14	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>E. coli</i> BRE	CTX-M-15	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>K. pneumoniae</i> ISS	CTX-M-14	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>K. pneumoniae</i> DOU	CTX-M-15	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>E. cloacae</i> MAZ	CTX-M-15	Cultivo sanguíneo	+	-
	<i>E. coli</i> LAN	SHV-2a		+	-
	<i>E. coli</i> PAN	SHV-12		+	-
	<i>K. pneumoniae</i> PAS	TEM-3		+	-
E	<i>E. coli</i>	TEM-52		+	-
	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-14		+	+
F	<i>P. aeruginosa</i>	OXA-18		+	+
	<i>E. coli</i> Ec13 SYD	CMY-2		+	+
	<i>K. pneumoniae</i> FOR	DHA-2		-	-
	<i>P. mirabilis</i>	ACC-1		-	-
	<i>E. cloacae</i> AZA	sobre-expresión de cefalosporinasa cromosómica		+	+

(continuación)

	Especies	Contenido en β -lactamasa	Origen	Ensayo de Detección	
				CTX	CTX + TAZ
	<i>E. coli</i> MAR	sobre-expresión de cefalosporinasa cromosómica	Bilis	-	-
	<i>M. morgannii</i> MAU	sobre-expresión de cefalosporinasa cromosómica	Orina	-	-
	<i>E. cloacae</i> H U R	sobre-expresión de cefalosporinasa cromosómica	Cultivo sanguíneo	+	+
G	<i>E. cloacae</i> ARF	sobre-expresión de cefalosporinasa cromosómica		-	-
	<i>E. cloacae</i> MEU	sobre-expresión de cefalosporinasa cromosómica	Cultivo sanguíneo	-	-
	<i>C. freundii</i>	sobre-expresión de cefalosporinasa cromosómica + TEM-3		+	-
H	<i>E. coli</i>	NDM-1		+	+
	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1		+	+

ND = No determinado
CTX = Cefotaxima (3 mg/ml), TAZ = sulfato de Tazobactam (4 mg/ml)

Referencias

- A lo largo de la presente solicitud, distintas referencias describen el estado de la técnica a la cual pertenece la invención. Las divulgaciones de estas referencias se incorporan de esta manera por referencia en la presente divulgación.
- Zahar, J.R. y col. 2009. Adressing the challenge of extended-spectrum β -lactamases. *Curr Opin Investig Drugs*, 10:172-180.
 - Poirel, L., T. Naas, y P. Nordmann. 2008. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*, 14 (supl.1):75-81.
 - Poirel, L., T. Naas, y P. Nordmann. 2009. Diversity, epidemiology and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54:24-38.
 - Livermore D. M., y D. F. J. Brown. 2001. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 48: supl. S1, 59-64.
 - Shannon K., y I. Phillips. 1980. β -Lactamase detection by three simple methods; intralactam, nitrocefin and acidimetric. *J. Antimicrob. Chemother*, 6:617-621.
 - Livermore D.M. 2008. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect*, 14 (Supl 1): 3-10.
 - Drieux, L. y col. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: a review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*, 14 (Supl 1):90-13.
 - Pitout, D.D. y K. B Laupland. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, 8:159-166.
 - Giske y col. 2011. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the suited of meropenem disks Supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect*, 17: 552-556.
 - Livermore, D.M. y col. 2011. Activities of NXL-104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 390-394.
 - Perez, F. y col. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol*, 7:459-469.
 - Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21^a century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 14:933-951.
 - Yang, K. y B. J. Guglielmo. 2007. Diagnosis and treatment of extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing organisms. *Ann Pharmacother* 41:1427-1435.
 - Harada, S., Y. Ishii, y K. Y. Yamaguchi. 2008. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med*, 28:401-412.
 - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S20U. Actualización junio 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Ejemplo 2: Detección rápida de *Enterobacteriaceae* productoras de β -lactamasa de amplio espectro**Resumen**

Cada vez se informa más de cepas enterobacterianas que producen β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) que se inhiben con ácido clavulánico, en todo el mundo. La detección convencional de la producción de ESBL sigue consumiendo tiempo (24 a 48 h). Por lo tanto, se ha desarrollado el ensayo NDP (Nordmann/Dortet/ Poirel) de ESBL para la identificación rápida de ESBL en *Enterobacteriaceae*. Este ensayo bioquímico se basa en la detección *in vitro* de la hidrólisis de una cefalosporina (cefotaxima) que se inhibe con la adición de tazobactam. La actividad de ESBL se evidencia por un cambio de color (rojo a amarillo) de un indicador de pH (rojo fenol) debido a la formación de ácido carboxílico que resulta de la hidrólisis de cefotaxima que se invierte por adición de tazobactam (ensayo positivo). El ensayo rápido NDP de ESBL se aplicó en cepas cultivadas (215 productores de ESBL y 40 no productores de ESBL). La sensibilidad y especificidad eran del 96,2 % y del 100 %, respectivamente. Su sensibilidad (del 100 %) era excelente para la detección de productores de CTX-M. Unos cuantos productores de ESBL (n = 16) que seguían siendo susceptibles a cefotaxima no se detectaban. El ensayo también evalúa cultivos de sangre con adiciones y presentaba una excelente sensibilidad y especificidad (del 100 % para ambas). El ensayo es rápido (menos de 1 h) y barato. Se puede implementar en cualquier instalación de atención sanitaria y se adapta bien en particular para fines de control de infecciones.

En el presente documento, los inventores proponen un nuevo ensayo, basado en una técnica diseñada para identificar la hidrólisis del anillo β -lactámico de una cefalosporina (cefotaxima), que genera un grupo carboxilo, acidificando el medio de cultivo. Utiliza placas de microtitulación de 96 pocillos pero se adapta también a un tubo sencillo. La acidez que resulta de esta hidrólisis se identifica por el cambio de color utilizando un indicador de pH (rojo fenol). La inhibición de la actividad de la ESBL se evidencia añadiendo tazobactam en un pocillo complementario. Los inventores demostraron que este ensayo, aplicado a colonias bacterianas o directamente a cultivos sanguíneos, poseía una buena sensibilidad y especificidad.

PROCEDIMIENTOS**25 Colección de cepas**

Se utilizó un total de 255 cepas para evaluar la actuación del ensayo NDP (Nordmann/Dortet/Poirel) de ESBL. Estas eran de varios orígenes clínicos (cultivo sanguíneo, orina, esputo...) y de origen mundial (Tablas 3A, B y C). Estas cepas ya se habían caracterizado anteriormente en cuanto a su contenido en β -lactamasa a nivel molecular. Esta colección incluía productores de ESBL (n = 215) que representaban la mayoría de las ESBL comunes que se identifican en aislados clínicos (enzimas CTX-M, SHV, TEM, GES, y VEB) (Tablas 3A y B). Los controles negativos (n = 40) se produjeron con cualquier cepa que producía β -lactamasas que poseía una actividad de amplio espectro, pero cuya actividad no se inhibía por el ácido clavulánico/tazobactam (Tabla 3C). Los controles negativos también incluían cepas que expresaban β -lactamasas que poseían un estrecho espectro de actividad (Tabla 3C).

Ensayo de susceptibilidad

35 Se llevó a cabo el ensayo de susceptibilidad determinando los valores de la CIM utilizando el Etest® (AB bioMérieux; Solna, Suecia) o una placa de agar Mueller-Hinton a 37 °C y los resultados se registraron de acuerdo con las directrices de EE. UU. (CLSI), como se actualizó en 2012 (2). Los puntos límite para la cefotaxima son: susceptible (S) < 1 y resistente (R) > 4 μ g/ml, y para la ceftazidima S < 4 y R > 16 μ g/ml.

Ensayo NDP de ESBL utilizando cepas cultivadas

40 Las cepas se aislaron en agar Mueller-Hinton (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) y se incubaron a 37 °C durante 16 h a 24 h antes de llevar a cabo el ensayo rápido NDP de ESBL de la siguiente manera. Un asa calibrada inoculada (10 μ l) de la cepa ensayada se re-suspendió en 150 μ l de tampón de lisis Tris-HCl 20 mM previamente distribuido en tubos de Microperlas (Tubos de perlas del kit de aislamiento de ADN microbiano Ultraclean, MO BIO Laboratories, Carlsbad, EE. UU). Se llevó a cabo la lisis mecánica de las bacterias por agitación fuerte de los tubos de microperlas utilizando un adaptador de agitado (MO BIO Laboratories) durante 30 min a temperatura ambiente. Esta suspensión bacteriana se centrifugó a 10.000 x g a temperatura ambiente durante 5 min. Se mezclaron treinta μ l del sobrenadante en un pocillo de una placa de 96 pocillos con 100 μ l de 1 ml de solución fabricada con 3 mg de sal sódica de cefotaxima purificada (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, Francia) en una solución de rojo fenol pH 7,8. Se ensayaron otras concentraciones de cefotaxima, otras moléculas β -lactámicas (ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam), y otros indicadores de pH, pero daban resultados de corte menos claros (datos no mostrados). La solución de rojo fenol se hizo tomando 2 ml de una solución de fenol concentrada pH 8 (producido de una mezcla de rojo fenol al 0,5 % con agua destilada) a la que se añadían 16,6 ml de agua destilada. El valor de pH se ajustó entonces a un valor de 7,8 añadiendo gota a gota una solución de NaOH 1 N. La mezcla de la solución de rojo fenol y la suspensión enzimática que se iba a ensayar se incubaron a 37 °C durante 30 min. De manera similar, los extractos del cultivo se analizaron en pocillos que contenían cefotaxima y tazobactam (4 mg/ml). Se ensayaron otras concentraciones de tazobactam y otros inhibidores de β -lactamasa dando resultados menos claros (datos no mostrados). Un ensayo se consideraba positivo cuando el pocillo que contenía cefotaxima sola viraba de rojo a amarillo/naranja y el pocillo que contenía cefotaxima suplementado con tazobactam seguía estando rojo (no

cambiaba de color). Esta definición de la positividad del ensayo se aplicará en todo el estudio. Los resultados se interpretaron con oculación por técnicos que no conocían cuáles eran las productoras de ESBL.

Ensayos NDP de ESBL utilizando cultivos sanguíneos con adiciones

5 La detección rápida de los productores de ESBL se intentó a partir de cultivos sanguíneos con adiciones cuya positividad se evaluaba utilizando el sistema de cultivo sanguíneo BactAlert (bioMérieux). Un estudio preliminar demostraba que la positividad de los cultivos sanguíneos que utilizaban este sistema de cultivo sanguíneo automático correspondía a un inóculo desde $\sim 5 \times 10^7$ a $\sim 5 \times 10^9$ UFC/ml. Este inóculo se conseguía tras 24-48 h de incubación en este sistema BactAlert. Las cepas se inocularon en el sistema de cultivo sanguíneo en presencia de 10 ml de sangre estéril. El panel de cepas que se utilizaron para las adiciones de cultivos sanguíneos incluían no 10 productores de ESBL (n = 24) o productores de ESBL (n = 64) (Tabla 4). Los cultivos sanguíneos con adiciones se hicieron de 1×10^3 UFC de cada cepa y se incubaron 24 a 48 h antes de que se detectara una positividad del cultivo sanguíneo por el sistema BactAlert. Después, 15 ml del cultivo sanguíneo con adiciones se transfirió a un tubo estéril y se centrifugó a $1.500 \times g$ durante 3 minutos para aglomerar los glóbulos rojos sanguíneos. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó durante 15 min a $4.000 \times g$ para aglomerar las bacterias. El aglomerado bacteriano se re-suspendió entonces en 500 μ l de agua destilada, transfirió a un tubo de 1,5 ml y se removió completamente durante 15 seg para lisar los glóbulos rojos sanguíneos remanentes y se lavó el aglomerado bacteriano. Tras 5 min de centrifugación a $10.000 \times g$, el aglomerado bacteriano se re-suspendió en 150 μ l de tampón de lisis Tris-HCl 20 mM y se distribuyó en tubos de perlas. El ensayo NDP de ESBL se aplicó entonces a este aglomerado como se ha descrito anteriormente. Los experimentos se llevaron a cabo sistemáticamente por triplicado.

20 RESULTADOS

Ensayo NDP de ESBL y cultivos bacterianos

Utilizando el ensayo rápido NDP de ESBL, cuando se ensayan todos los productores de CTX-M (n = 147, Tabla 3A), el color de los pocillos viraba de rojo a amarillo en presencia de cefotaxima y se mantenían rojos cuando se añadía tazobactam. La sensibilidad del ensayo era excelente (del 100 %). En todos los casos, los valores de CIM de cefotaxima para esas cepas era alto (> 8 mg/ml). El ensayo era menos sensible para detectar los productores de ESBL no CTX-M ya que 17 de las 68 cepas ensayadas (un 25 %) entre los productores de ESBL no se detectaban (Tabla 3B). Los resultados negativos se observaban en cepas que tenían valores de CIM de cefotaxima menores que el punto límite de resistencia para esa molécula (excepto en unos pocos aislados de *E. aerogenes*) (Tabla 3B). Para todos los aislados productores de ESBL que hidrolizan la cefotaxima (cambio de color de rojo a amarillo en el primer pocillo), el segundo pocillo que contenía tazobactam seguía rojo (inhibición de hidrólisis), por lo tanto se correspondían con un ensayo positivo. Ese resultado indicaba la inhibición *in vitro* de la actividad de la EBSL por el tazobactam. Ninguno de los pocillos que contenían extractos bacterianos obtenidos de las cepas que no producen β -lactamasa con actividad de amplio espectro daba un ensayo positivo (Tabla 3). Unas pocas cepas negativas a ESBL que producían β -lactamasas que hidrolizan la cefotaxima (cefalosporinasas sobre-producidas) (Tabla 3B) daban un cambio de color de rojo a amarillo en los pocillos que contenían cefotaxima. Sin embargo, este cambio de color se observaba también en pocillos que contenían cefotaxima suplementada con tazobactam, indicando que la actividad hidrolítica de estas enzimas no se inhibía por el tazobactam, lo que correspondía con un ensayo negativo) (Tabla 3C). La sensibilidad y especificidad del ensayo NDP de ESBL era del 92,6 % y 100 % respectivamente. El ensayo NDP de ESBL era capaz de diferenciar entre productores de ESBL y cepas que eran resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro por otros mecanismos, o de las eran susceptibles a las cefalosporinas de amplio espectro y que por lo tanto no producían una ESBL (Tabla 3C). Es digno de tenerse en cuenta, que estos aislados que combinan la producción de ESBL junto con AmpC sobre-producido (cromosómico o mediado por plásmidos) daban resultados positivos.

45 El cambio de color de rojo a amarillo se obtenía rápidamente (1 a 5 min tras el inicio de la incubación) para la mayoría de los productores de CTX-M. En total, un tiempo de incubación de 15 min era suficiente para obtener un cambio de color evidente para todos los productores de CTX-M (n = 147). Sin embargo, siempre se obtenían resultados interpretables para todos los productores de ESBL en menos de 30 min.

Ensayo NDP de ESBL y cultivos sanguíneos

50 El ensayo NDP de ESBL se utilizó directamente a partir de cultivos sanguíneos inoculados con productores de ESBL (n = 64) y no productores de ESBL (n = 24) (Tabla 4). La sensibilidad y especificidad del ensayo era del 100 % en cada caso. La cantidad total de tiempo necesario para obtener resultados utilizando los cultivos sanguíneos con adiciones era menor de dos horas.

Conclusión

55 El ensayo NDP de ESBL combina múltiples ventajas. Es barato, rápido, sensible, y específico. Es particularmente eficaz en la detección de productores de CTX-M que actualmente son la mayoría de las ESBL identificadas en todo el mundo. Las razones de la falta de detección de varios productores de ESBL en particular de las series TEM y SHV siguen sin aclararse. Puede ser el resultado de una débil hidrólisis de cefotaxima, pero también de un bajo nivel de producción de la ESBL que está relacionada con valores CIM bajos de cefotaxima. Todas las cepas que sobre-

5 producen un AmpC pero son negativos a ESBL daban resultados negativos. Esto resultaba por dos posibilidades: (i) no había hidrólisis (o muy poca) de cefotaxima por AmpC dando lugar a dos pocillos rojos, o (ii) la hidrólisis de cefotaxima no se inhibe por el ácido clavulánico o el tazobactam de acuerdo con la propiedad de AmpC, dando lugar a dos pocillos amarillo/naranja. Es digno de considerar, que se habían ensayado varios aislados positivos para la producción de ESBL y que sobre expresan su cefalosporinasa codificada por el cromosoma. Todas esas cepas eran positivas para la hidrólisis de cefotaxima debido a la acción de la ESBL pero esta hidrólisis se inhibía bien por el tazobactam, dando así un resultado positivo. Sin embargo, los inventores no pudieron conseguir que algunos aislados positivos a ESBL y que sobre-producían AmpC pudieran dar un resultado positivo para cefotaxima más tazobactam, aunque el AmpC correspondiente hidrolizara la cefotaxima a alto nivel (dando lugar a un resultado falso negativo).

15 De manera interesante, los inventores demostraron que este ensayo se puede implementar fácilmente para la detección de aislados productores de ESBL a partir de cultivos sanguíneos. Hay que señalar que la sensibilidad total del ensayo rápido NDP de ESBL era incluso mayor (alcanzando el 100 %) cuando se utiliza este protocolo de cultivo sanguíneo. Estos resultados se podrían explicar por el aumento de inóculo recuperado de los experimentos de cultivos sanguíneos en comparación con los que se recuperan durante los experimentos de cultivo puro.

20 Este ensayo se puede utilizar para buscar productores de ESBL entre (i) bacterias que crecen en cultivos sanguíneos y/o (ii) colonias de bacterias que se cultivan en medios selectivos o no selectivos antes de cualquier ensayo de susceptibilidad a antibióticos. Este ensayo por lo tanto puede tener una aplicación excelente en países en los que existe una alta incidencia de productores de ESBL (principalmente CTX-M), tal como en muchos países asiáticos. El uso de este ensayo puede mejorar significativamente el resultado de pacientes infectados por productores de ESBL, apoyando una mejor gestión antimicrobiana por miedo de la identificación rápida y precisa de aislados productores de ESBL. De manera interesante siempre se asociaba una hidrólisis de cefotaxima (con cambio de color de rojo a amarillo en el pocillo que contenía cefotaxima) con la expresión de una ESBL o una cefalosporinasa mediada por un plásmido y altos valores de la CIM para cefotaxima y por encima de los puntos límite de resistencia (Tablas 3A, B, C; Tabla 4). Aunque un resultado negativo no excluía la presencia de una cepa resistente a cefalosporinas de amplio espectro como resultado de una deficiencia de porina asociada con un bajo nivel de actividad β-lactamasa, un resultado positivo con el ensayo NDP de ESBL puede tener una significación clínica importante excluyendo la elección de cefalosporinas de amplio espectro para tratar pacientes infectados y manteniendo un régimen que contenga carbapenem.

30 Se admite que la detección de ESBL es particularmente útil para la higiene y el control de la infección. Una identificación rápida de que se portan productores de ESBL, en particular cuando se ha obtenido un aislado resistente a cefalosporinas utilizando un medio de exploración cromogénico, puede ayudar a implementar rápidamente medidas de higiene adecuadas que evitarán adicionalmente el desarrollo de brotes nosocomiales. Utilizar el ensayo NDP de ESBL directamente en colonias que crecen en estos medios de exploración proporciona una ganancia significativa de tiempo (al menos 24 h) en comparación con las técnicas basadas en el fenotipo. Esto puede tener un valor importante para prevenir los brotes, particularmente en unidades de alto riesgo (es decir, unidades de cuidados intensivos...) y para ahorrar en costes, en particular, los costes que resultan del personal dedicado. Además, el ensayo NDP de ESBL que se utiliza como ensayo de exploración es mucho más barato que las técnicas moleculares. Esta característica es de la máxima importancia en muchos países en desarrollo.

40 El ensayo NDP de ESBL también sustentaría el desarrollo de nuevos antibióticos facilitando que el paciente se inscriba en ensayos clínicos clave. Los resultados del ensayo NDP de ESBL puede seleccionar las cepas que se van a ensayar posteriormente por PCR y/o remitirlo para su secuenciación para una identificación detallada de los genes a nivel molecular.

Tabla 3A. Detección de aislados productores de CTX-M utilizando el ensayo rápido NDP de ESBL

Fenotipo de resistencia a β-lactámicos	Contenido en β-lactamasa	Especie	n	Ensayo		Intervalo de CIM (µg/ml)				
				CTX	CTX+TZB	CTX	CTX + CLA	CAZ	CAZ + CLA	
β-lactamasas de amplio espectro	CTX-M grupo 1	CTX-M-1	<i>E. coli</i>	16	+	-	>16	0,04-0,12	0,5-2	0,06-0,19
			<i>S. enterica</i>	1	+	-	>16	0,06	0,75	0,12
		CTX-M-3	<i>E. coli</i>	1	+	-	>16	>1	4	1
			<i>K. pneumoniae</i>	1	+	-	>16	0,5	1,5	0,19
		CTX-M-15	<i>E. coli</i>	46	+	-	8->16	0,06-1	0,5-24	0,12-0,19
			<i>K. pneumoniae</i>	28	+	-	>16	0,03-0,12	2->32	0,12-0,19
			<i>E. cloacae</i>	17	+	-	>16	0,12-0,25	2-16	0,25-0,5

45

(continuación)

Fenotipo de resistencia a β -lactámicos	Contenido en β -lactamasa	Especie	n	Ensayo		Intervalo de CIM (μ g/ml)				
				CTX	CTX+TZB	CTX	CTX + CLA	CAZ	CAZ + CLA	
CTX-M grupo 2		<i>C. freundii</i>	3	+	-	>16	0,12-0,25	8->32	0,25-0,75	
		<i>P. mirabilis</i>	1	+	-	>16	0,09	8	0,19	
	CTX-M-28	<i>E. coli</i>	1	+	-	>16	0,06	8	0,09	
	CTX-M-32	<i>E. coli</i>	1	+	-	>16	0,09	6	0,12	
	CTX-M-2	<i>E. coli</i>	3	+	-	>16	0,05-0,06	1,5-4	0,06-0,25	
	CTX-M-97	<i>E. coli</i>	1	+	-	>16	0,04	2	0,09	
	CTX-M grupo 9	CTX-M-14	<i>E. coli</i>	15	+	-	>16	0,03-0,12	0,5-4	0,09-0,25
			<i>K. pneumoniae</i>	3	+	-	>16	0,04-0,12	0,5-6	0,12-0,25
			<i>E. cloacae</i>	1	+	-	>16	>1	8	>1
			<i>P. mirabilis</i>	1	+	-	>16	0,09	0,75	0,12
		CTX-M-27	<i>E. coli</i>	6	+	-	>16	0,03-0,09	0,5-4	0,09-0,25
		CTX-M-9	<i>E. coli</i>	1	+	-	>16	0,06	0,19	0,09

CTX, cefotaxima; TZB, tazobactam; CAZ, ceftazidima; CLA, ácido clavulánico

(+) y (-) en referencia al cambio de color siendo, rojo a amarillo o sin cambio, respectivamente

Tabla 3B. Detección de aislados productores de tipo TEM, tipo SHV, tipo GES, tipo VEB y tipo PER utilizando el ensayo rápido NDP de ESBL.

Fenotipo de resistencia a β -lactámicos	Contenido en β -lactamasa	Especie	n	Ensayo		Intervalo de CIM (μ g/ml)				
				CTX	CTX+TZB	CTX	CTX + CLA	CAZ	CAZ + CLA	
β -lactamasas de amplio espectro	Tipo TEM	TEM-3	<i>K. pneumoniae</i>	3	+	-	4->16	0,06-0,09	4->32	0,06-0,09
			<i>E. cloacae</i>	2	+	-	>16	0,12-0,38	>16	0,12-0,5
			<i>C. freundii</i>	1	+	-	>16	0,12	>16	0,25
		TEM-12	<i>E. coli</i>	1	-	-	0,5	0,06	8	0,09
		TEM-21	<i>P. mirabilis</i>	1	+	-	0,25	0,06	4	0,12
		TEM-24	<i>E. aerogenes</i>	6	-	-	0,5-8	0,5-8	8->32	0,09-8
			<i>P. stuartii</i>	1	-	-	0,5	0,25	8	0,09
		TEM-29	<i>E. coli</i>	2	-	-	0,25	0,06	4	0,12
		TEM-52	<i>E. coli</i>	8	+	-	8->16	0,03-0,09	8->32	0,09
			<i>K. pneumoniae</i>	2	+	-	>16	0,04-0,12	>32	0,12-0,19
			<i>P. mirabilis</i>	1	+	-	>16	0,09	16	0,12
		TEM-121	<i>E. aerogenes</i>	1	-	-	<0,06	<0,06	>32	32
		TEM-133	<i>E. coli</i>	1	-	-	0,19	0,06	12	0,09

(continuación)

Fenotipo de resistencia a β -lactámicos	Contenido en β -lactamasa	Especie	n	Ensayo		Intervalo de CIM (μ g/ml)				
				CTX	CTX+TZB	CTX	CTX + CLA	CAZ	CAZ + CLA	
Tipo SHV	SHV-2a	<i>K. pneumoniae</i>	4	+	-	8->16	0,06-0,09	2-4	0,06-0,19	
		<i>K. pneumoniae</i>	2	-	-	1	0,03-0,06	1-4	0,03-0,12	
		<i>E. coli</i>	3	+	-	8->16	0,06-0,09	2-4	0,06-0,19	
	SHV-3	<i>E. coli</i>	1	+	-	12	0,02	>32	0,09	
	SHV-5	<i>K. pneumoniae</i>	2	+	-	>16	0,03-0,12	16-32	0,09-0,25	
		<i>E. cloacae</i>	1	+	-	>16	0,38	>32	0,5	
	SHV-12	<i>E. coli</i>	6	+	-	>16	0,05-0,06	8->32	0,06-0,25	
		<i>E. coli</i>	1	-	-	0,75	0,06	8	0,12	
		<i>K. pneumoniae</i>	2	+	-	2-8	0,03-0,06	16-32	0,12-0,19	
		<i>K. pneumoniae</i>	1	-	-	1	0,04	8	0,12	
		<i>E. cloacae</i>	6	+	-	8->16	0,38->1	16->32	0,5->4	
	SHV-28	<i>K. pneumoniae</i>	3	+	-	>16	0,12-0,25	>32	0,09-0,25	
	GES	GES-1	<i>K. pneumoniae</i>	1	+	-	0,5	0,06	4	0,5
		GES-5	<i>E. cloacae</i>	1	+	-	>16	>1	>32	>1
	VEB	VEB-1	<i>E. coli</i>	1	+	-	8	0,12	>32	0,25
		<i>E. cloacae</i>	1	+	-	16	0,5	>32	0,5	
PER	PER-1	<i>P. mirabilis</i>	1	+	-	>16	0,12	>32	0,25	
	PER-1	<i>E. cloacae</i>	1	+	-	>16	>1	>32	>1	

CTX, cefotaxima ; TZB, tazobactam ; CAZ, ceftazidima; CLA, ácido clavulánico
(+) y (-) en referencia al cambio de color siendo, rojo a amarillo o sin cambio, respectivamente

Tabla 3C. Detección de aislados no productores de ESBL utilizando el ensayo NDP rápido de ESBL

Fenotipo de resistencia a β-lactámicos	Contenido en β-lactamasa	Especie	n	Ensayo		Intervalo de CIM (µg/ml)					
				CTX	CTX+TZB	CTX	CTX + CLA	CAZ	CAZ + CLA		
Sin resistencia	Tipo silvestre	<i>E. coli</i>	5	-	-			0,02-0,04	ND	0,05-0,19	ND
	Tipo silvestre	<i>S. enterica</i>	1	-	-			0,05	ND	0,19	ND
Penicilinas	TEM-1	<i>E. coli</i>	5	-	-			0,03-0,09	ND	0,09-0,12	ND
	Tipo silvestre	<i>K. pneumoniae</i>	2	-	-			0,02-0,03	ND	0,03	ND
	Tipo silvestre	<i>K. oxytoca</i>		-	-			0,03	ND	0,06	ND
	Tipo silvestre	<i>E. cloacae</i>	5	-	-			0,09-0,5	ND	0,12-0,38	ND
	Tipo silvestre	<i>E. aerogenes</i>		-	-			0,094	ND	0,25	ND
	Tipo silvestre	<i>M. organii</i>	2	-	-			0,03-0,75	ND	0,09-1	ND
	Tipo silvestre	<i>C. freundii</i>		-	-			0,12	ND	0,25	ND
	Tipo silvestre	<i>C. braakii</i>		-	-			0,12	ND	0,25	ND
	Tipo silvestre	<i>S. marcescens</i>	2	-	-			0,19-0,75	ND	0,09	ND
	Tipo silvestre	<i>S. ficaria</i>		-	-			0,12	ND	0,09	ND
Cefalosporinas adquirida	DHA-1	<i>E. coli</i>		-	-			0,25	1	1	2
	DHA-1	<i>K. pneumoniae</i>		-	-			>16	>1	>32	>4
	DHA-2	<i>K. pneumoniae</i>		+	+			>16	>1	>32	>4
	ACC-1	<i>E. coli</i>		-	-			>16	>1	>32	>4
	ACC-1	<i>E. coli</i>		+	+			>16	>1	>32	>4
	ACC-1	<i>P. mirabilis</i>		-	-			>16	>1	>32	>4
	CMY-2	<i>E. coli</i>		+	+			>16	>1	>32	>4

(continuación)

Fenotipo de resistencia a β-lactámicos	Contenido en β-lactamasa	Especie	n	Ensayo			Intervalo de CIM (µg/ml)			
				CTX	CTX+TZB	CTZ	CTX	CTX + CLA	CAZ	CAZ + CLA
Cefalosporinasa codificada por el cromosoma sobre-expresada		<i>E. cloacae</i>	3	+	+		>16	>1	>32	>4
		<i>E. cloacae</i>	2	-	-		>16	>1	>32	>4
		<i>E. sakazakii</i>	1	-	-		>16	>1	>32	>4

ND, no determinado
 CTX, cefotaxima ; TZB, tazobactam ; CAZ, ceftazidima; CLA, ácido clavulánico (+) y (-) en referencia al cambio de color siendo, rojo a amarillo o sin cambio, respectivamente

Tabla 4. Detección de no productores de ESBL y productores de ESBL con el ensayo rápido de ESBL en cultivos sanguíneos con añadidos utilizando el NDP

	β -lactamasa	Especie	Concentración bacteriana en cultivo sanguíneo	Ensayo NDP de ESBL de:			
				Cultivo sanguíneo		Colonias	
				CTX	CTX+TZB	CTX	CTX+TZB
Cepas de control	Tipo silvestre	<i>E. coli</i> BG 1106 6252	$8,0 \times 10^8$	-	-	-	-
		<i>E. coli</i> BG 1106 6367	$7,0 \times 10^8$	-	-	-	-
		<i>E. coli</i> BG 1107 8873	$5,2 \times 10^9$	-	-	-	-
	Penicilinasa	<i>E. coli</i> BG 1106 5698	$2,0 \times 10^9$	-	-	-	-
		<i>E. coli</i> BG 1106 7202	$1,3 \times 10^9$	-	-	-	-
		<i>E. coli</i> BG 1108 6157	$1,2 \times 10^9$	-	-	-	-
		<i>K. pneumoniae</i> BG 1202 5484	$4,0 \times 10^8$	-	-	-	-
	Tipo silvestre	<i>E. cloacae</i> BG 1106 7746	$1,4 \times 10^9$	-	-	-	-
		<i>E. cloacae</i> BG 1106 7725	$5,2 \times 10^8$	-	-	-	-
		<i>E. cloacae</i> BG 1107 4118	$5,0 \times 10^8$	-	-	-	-
		<i>E. aerogenes</i> BN 1113 0225	$1,0 \times 10^9$	-	-	-	-
		<i>M. morgani</i> BG 1106 5902	$1,7 \times 10^9$	-	-	-	-
		<i>M. morgani</i> BG 1117 0617	$1,4 \times 10^9$	-	-	-	-
		<i>C. freundii</i> BG 1106 7767	$8,8 \times 10^8$	-	-	-	-
		<i>S. marcescens</i> BG 1107 4243	$8,0 \times 10^8$	-	-	-	-
	<i>S. marcescens</i> BN 1201 0816	$3,8 \times 10^9$	-	-	-	-	
	<i>S. ficaria</i> CIP 104255	$2,1 \times 10^9$	-	-	-	-	
Cefalosporinasas adquirida	DHA-1	<i>E. coli</i> GOU	$9,7 \times 10^8$	-	-	-	-
	DHA-1	<i>K. pneumoniae</i> ANG	$1,1 \times 10^8$	-	-	-	-
	DHA-2	<i>K. pneumoniae</i> FOR	$2,1 \times 10^9$	+	+	+	+
	ACC-1	<i>E. coli</i> (Bélgica)	$7,8 \times 10^7$	-	-	-	-
	ACC-1	<i>E. coli</i> LOU	$2,3 \times 10^9$	+	+	+	+
	ACC-1	<i>P. mirabilis</i> BIK	$8,0 \times 10^7$	-	-	-	-
	CMY-2	<i>E. coli</i> Ec13SYD	$1,8 \times 10^9$	+	+	+	+
Cepas productoras de TEM	TEM-3	<i>K. pneumoniae</i> 09.200	$1,5 \times 10^8$	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.138	$3,0 \times 10^8$	+	-	+	-
	TEM-21	<i>P. mirabilis</i> 09.177	$1,2 \times 10^9$	+	-	-	-
	TEM-52	<i>E. coli</i> 09.11	$2,7 \times 10^9$	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.40	$1,3 \times 10^9$	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.66	$1,8 \times 10^9$	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.73	$1,1 \times 10^9$	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.92	$6,0 \times 10^8$	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.124	$1,0 \times 10^9$	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.225	$2,0 \times 10^8$	+	-	+	-
		<i>K pneumoniae</i> 09.162	$8,0 \times 10^8$	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.169	$1,0 \times 10^9$	+	-	+	-
		<i>P. mirabilis</i> 09.128	$5,0 \times 10^8$	+	-	+	-
	TEM-121	<i>E. aerogenes</i> E2015	$3,0 \times 10^8$	+	-	-	-
TEM-133	<i>E. coli</i> 09.123	$1,7 \times 10^9$	+	-	-	-	

(continuación)

	β-lactamasa	Especie	Concentración bacteriana en cultivo sanguíneo	Ensayo NDP de ESBL de:			
				Cultivo sanguíneo		Colonias	
				CTX	CTX+TZB	CTX	CTX+TZB
Cepas productoras de SHV	SHV-2a	<i>E. coli</i> 09.187	1,3 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.207	4,0 x 10 ⁸	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.99	1,7 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.127	9,0 x 10 ⁸	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.181	1,3 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.190	1,4 x 10 ⁹	+	-	-	-
	SHV-3	<i>E. coli</i> A7R5	1,4 x 10 ⁸	+	-	+	-
	SHV-5	<i>K. pneumoniae</i> 09.60	1,6 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.217	9,0 x 10 ⁸	+	-	+	-
	SHV-12	<i>E. coli</i> 09.41	1,3 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.79	1,4 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.129	1,7 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.173	3,2 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 09.193	2,6 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.45	2,6 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 09.158	1,9 x 10 ⁹	+	-	+	-
	<i>E. cloacae</i> 09.57	1,0 x 10 ⁹	+	-	+	-	
Cepas productoras de CTX-M	CTX-M-1	<i>E. coli</i> 10.36	1,8 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.38	1,7 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>S. typhimurium</i> 10.81	2,0 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.95	1,0 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.104	3,3 x 10 ⁹	+	-	+	-
	CTX-M-14	<i>E. coli</i> 10.46	7,8 x 10 ⁸	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.124	5,2 x 10 ⁸	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.11	1,9 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.13	1,6 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.32	2,7 x 10 ⁹	+	-	+	-
	CTX-M-15	<i>E. coli</i> 10.16	2,0 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.33	3,7 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.43	3,6 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.49	1,0 x 10 ⁷	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.74	9,6 x 10 ⁸	+	-	+	-
		<i>E. cloacae</i> 10.75	3,8 x 10 ⁸	+	-	+	-
		<i>E. cloacae</i> 10.87	2,2 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> SHI	1,5 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> MEK	3,4 x 10 ⁸	+	-	+	-
	CTX-M-2	<i>E. coli</i> 10.121	1,9 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.23	1,2 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>E. coli</i> 10.132	1,4 x 10 ⁹	+	-	+	-
	CTX-M-27	<i>E. coli</i> 10.73	5,0 x 10 ⁸	+	-	+	-
	<i>E. coli</i> 10.178	1,3 x 10 ⁹	+	-	+	-	
	<i>E. coli</i> 10.198	2,7 x 10 ⁹	+	-	+	-	
	<i>E. coli</i> 10.204	1,7 x 10 ⁹	+	-	+	-	

(continuación)

	β -lactamasa	Especie	Concentración bacteriana en cultivo sanguíneo	Ensayo NDP de ESBL de:			
				Cultivo sanguíneo		Colonias	
				CTX	CTX+TZB	CTX	CTX+TZB
		<i>E. coli</i> 10.207	2,3 x 10 ⁹	+	-	+	-
	CTX-M-3	<i>E. coli</i> 10.130	1,9 x 10 ⁹	+	-	+	-
		<i>K. pneumoniae</i> 10.159	2,1 x 10 ⁹	+	-	+	-
	CTX-M-32	<i>E. coli</i> 10.64	1,0 x 10 ⁹	+	-	+	-
	CTX-M-28	<i>E. coli</i> C5052	1,0 x 10 ⁹	+	-	+	-
	CTX-M-9	<i>E. coli</i> 10.53	2,2 x 10 ⁹	+	-	+	-

CTX, cefotaxima ; TZB, tazobactam ; CAZ, ceftazidima; CLA, ácido clavulánico
 (+) y (-) en referencia al cambio de color siendo, rojo a amarillo o sin cambio, respectivamente

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

5 a) llevar a cabo la lisis celular en una muestra biológica con el fin de obtener una suspensión enzimática;
b) hacer reaccionar una fracción de la suspensión enzimática que se obtiene en la etapa a) con un kit reactivo, comprendiendo dicho kit reactivo

- un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas, y

10 - un indicador de pH por color que cambiará de color cuando el pH de la mezcla de reacción esté comprendido entre 6,4 y 8,4,

en el que un cambio de color después de la etapa b) indica la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en la muestra biológica
en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre o una muestra de orina.

15 2. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, en el que las bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro se seleccionan de entre los géneros que consisten en *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pandoreae*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*, *Shigella* y *Stenotrophomonas*.

3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la reacción de la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15 °C y 40 °C.

20 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la reacción de la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 20 °C y 37 °C.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la reacción de la etapa b) se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para observar un cambio de color, preferentemente el cambio de color se observa visualmente en un periodo de tiempo comprendido entre 5 minutos y 120 minutos, preferentemente entre 10 y 60 minutos, más preferentemente entre 20 y 40 minutos.

25 6. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) llevar a cabo la lisis celular en una muestra biológica con el fin de obtener una suspensión enzimática;

30 b) hacer reaccionar una fracción de la suspensión enzimática que se obtiene en la etapa a) con un kit reactivo, comprendiendo dicho kit reactivo

- cefotaxima como sustrato de β -lactamasa de amplio espectro,

- rojo fenol como indicador de pH por color, y

en el que un cambio de color de rojo a amarillo después de la etapa b) indica la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en la muestra biológica.

35 7. El uso de un kit reactivo para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en una muestra de acuerdo con el procedimiento definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56 en el que dicho kit reactivo comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam, y cefamicinas y un indicador de pH por color que cambia de color cuando el pH está comprendido entre 6,4 y 8,4.

40 8. El uso de una placa de microtitulación que comprende un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas, para detectar la presencia de bacterias productoras de β -lactamasa de amplio espectro en una muestra de acuerdo con el procedimiento definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y/o para determinar la clase específica de ESBL presente en una muestra, por medio de lo cual se añade a cada pocillo al menos un indicador de pH por color que cambia de color cuando el pH está comprendido entre 6,4 y 8,4 y una fracción de la suspensión enzimática a ensayar,
45 en el que la placa de microtitulación comprende además

- un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un inhibidor de β -lactamasa de clase A de Ambler;

50 - un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un inhibidor de β -lactamasa de clase B de Ambler;

- un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se

selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un inhibidor de β -lactamasa de clase C de Ambler;

- 5 - un pocillo o una serie de pocillos que comprende un sustrato de β -lactamasa de amplio espectro que se selecciona de entre el grupo que consiste en cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas y un inhibidor de β -lactamasa de clase D de Ambler;

- 10 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 6**, el uso del kit reactivo de acuerdo con la reivindicación 7 y el uso de la placa de microtitulación de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la cefalosporina se selecciona de entre el grupo que consiste en cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, ceftiroma, y aztreonam, preferentemente cefotaxima, y la cefamicina se selecciona de entre el grupo que consiste en moxalactam y cefoxitina.

FIGURA 1

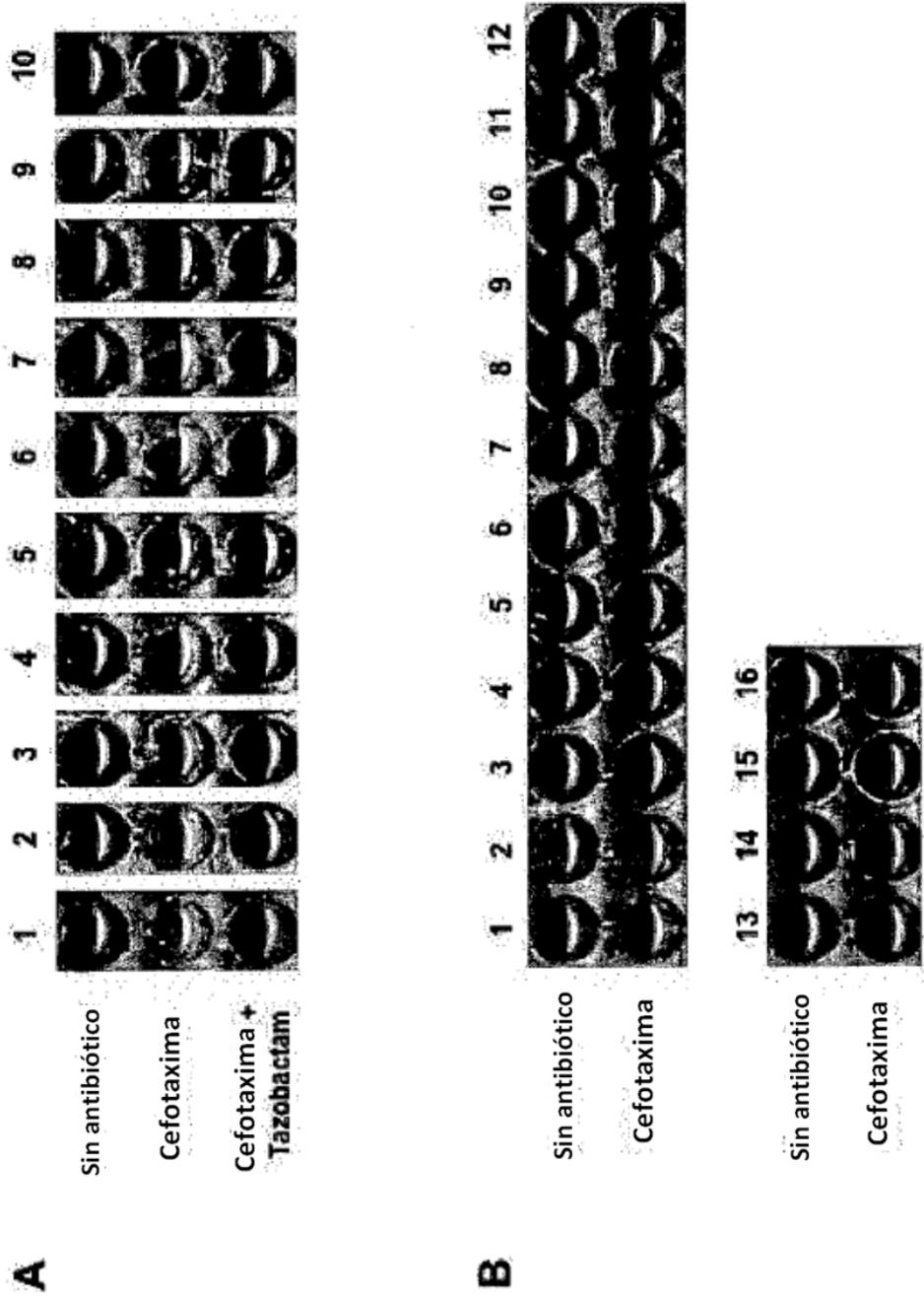


FIGURA 2

