(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 663 235**

(51) Int. CI.:

G01N 33/569 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2013 PCT/FR2013/051819**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14016534**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2013 E 13756613 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2877591**

(54) Título: **Procedimiento de detección de bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48**

(30) Prioridad:

27.07.2012 FR 1257324

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2018

(73) Titular/es:

BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR

(72) Inventor/es:

DEVIGNE, LAURENCE;
GHIRARDI, SANDRINE y
ZAMBARDI, GILLES

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 de detección de bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48

La presente invención se refiere al campo del análisis microbiológico. Más específicamente, se refiere a un procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48.

El aumento de la resistencia a los antibióticos de tipo beta-lactaminas, tales como las penicilinas y las cefaloesporinas, hacen complejo el tratamiento de las infecciones causadas por unas cepas de bacterias gram negativas. Estos antibióticos se sustituyen entonces por otros antimicrobianos de amplio espectro. Entre estos antimicrobianos de amplio espectro, los carbapenémicos han desempeñado un papel importante, en particular para tratar pacientes hospitalizados. Los carbapenémicos son activos contra la mayoría de las bacterias aeróbicas gram positivas y gram negativas, así como frente a algunas bacterias anaeróbicas.

Sin embargo, cada vez aparecen más cepas resistentes a los carbapenémicos en pacientes hospitalizados. Y es primordial detectar rápidamente las cepas que presentan una actividad carbapenemasa para instaurar, llegado el caso, una antibioterapia que permita tratar una infección de manera apropiada, y para identificar los pacientes portadores a fin de disminuir el riesgo de propagación de estas cepas en los centros de salud.

La nomenclatura de las beta-lactamasas, enzimas bacterianas de resistencia a las beta-lactaminas, no está completamente estandarizada. Están clasificadas o bien en cuatro clases moleculares (A a D) en base a su estructura primaria (clasificación de Ambler), o bien en grupos funcionales en base a sustratos diana y a su resistencia a los inhibidores (como repaso, véase Bush and Jacoby, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010; 54 (3): 969-976).

Las bacterias afectadas por la resistencia a los carbapenémicos son, de manera no exhaustiva, *Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter sp., Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Pseudomonas aeruginosa, Providencia rettgeri, Pseudomonas putida, Stenotrophomonas maltophilia, Acinetobacter baumanii, Comamonas sp., Aeromonas sp., Morganella morganii, Enterococcus sp., Proteus mirabilis, Salmonella senftenberg, Serratia marcescens, Salmonella typhimurium* etc.

Estas bacterias pueden producir diferentes tipos de beta-lactamasas capaces de hidrolizar los carbapenémicos, o carbapenemasas. Las carbapenemasas son unas beta-lactamasas de muy amplio espectro, capaces de inactivar casi la totalidad de las beta-lactaminas. Se distribuyen esquemáticamente en tres clases según la clasificación de Ambler:

* la clase A, también denominada serina-carbapenemasa, se caracteriza por una inhibición variable por el ácido clavulánico y los derivados de ácido borónico. El principal representante es la enzima KPC;

* la clase B, también denominada metalo-carbapenamasa, se caracteriza por una inhibición por unos agentes quelantes de cationes tales como EDTA. Los principales representantes son las enzimas NDM, VIM e IMP;

* la clase D, que corresponde a las beta-lactamasas de tipo OXA, entre las cuales figura la variante OXA-48 que tiene la particularidad de poseer una actividad carbapenemasa. Existen otras variantes derivadas por mutación puntual de OXA-48, a pesar de ser menos frecuentes, y conservan esta actividad carbapenemasa. Se citarán la OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204 y OXA-232.

Las metalo-beta-lactamasas (cuya abreviatura anglosajona es MBL) y las *Klebsiella pneumniae* carbapenemasa (KPC) son prevalentes en las enterobacterias, más particularmente en América del Norte, América del Sur, Israel, Italia, Grecia, India, China y Pakistán. La oxacilinasa-48 (OXA-48) se ha aislado recientemente en Turquía, en la cuenca mediterránea y en Europa del Oeste.

Los genes de carbapenemasas son susceptibles de estar presentes en los cromosomas y/o en los plásmidos. Debido a esta presencia en forma de plásmidos, estas resistencias de tipo enzimático son susceptibles de diseminarse de manera muy importante y presentan, por lo tanto, un riesgo mayor en términos de epidemiología.

Para detectar y/o identificar unas cepas resistentes a los carbapenémicos, es posible utilizar unas técnicas de biología molecular que son muy sensibles y presentan la ventaja de permitir una identificación rápida de las cepas de enterobacterias productoras de carbapenamasas. Sin embargo, estos métodos son costosos, complejos y no están disponibles de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios.

Para cribar, detectar y/o identificar unas enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC), se conocen bien por el experto en la técnica unos métodos basados en el cultivo. Se basan secuencialmente en un aislamiento sobre un medio convencional de tipo Mac-Conkey agar o en caldo de soja tripticasa que se hace selectivo por la adición de un carbapenemo o después de la realización de un antibiograma que muestra una no sensibilidad a un carbapenemo. Llegado el caso, se pueden utilizar unos discos impregnados de un carbapenemo o unas tiras de tipo

Etest® (bioMérieux). Es necesaria la confirmación de la presencia de carbapenemasa por unos ensayos complementarios, ensayos entre los cuales se citarán: el ensayo de Hodge modificado (CLSI M100-S22: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. January 2012. Supplemental Table2A-S2), unas pruebas de sinergia por difusión (o discos combinados) de gelosa, que emplean unos inhibidores combinados con carbapenemo, por ejemplo EDTA para las carbapenemasas de clase B, el ácido fenil-borónico para la detección de las carbapenemasas de clase A. La compañía Rosco propone un método multi-discos que permite detectar unas bacterias productoras de carbapenemasas a partir de cepas aisladas (BioConnections KPC + MBL Confirm ID kit) y sugiere añadir un disco que comprende 30 μg de temocilina para detectar la presencia de una enzima OXA-48. Sin embargo, esta prueba muestra que la temocilina no inhibe el conjunto de las cepas KPC, AmpC y MBL, por lo tanto no permite ella sola una detección específica de las cepas OXA-48.

Así, este estado de la técnica no permite la detección específica de EPC OXA-48 y necesita un tiempo de respuesta largo, de tres días. Además, estas técnicas son poco adecuadas para la búsqueda de CPE en extracciones de heces o rectales que se utilizan para la búsqueda de portadores en el ámbito de la prevención de las infecciones con bacterias mutli-resistentes.

Otros métodos utilizan unos medios cromogénicos comerciales tales como el medio Brilliance CRE (Oxoid®), el medio CHROMagar® KPC (CHROMagar™, Paris, Francia), el medio equivalente Colorex KPC (Biomed Diagnostics Inc.), o los medios de la solicitante chromID® ESBL o chromID® CARBA. Este último medio demuestra ser capaz de detectar una cepa OXA-48 de referencia, pero con la condición de que el inóculo sea importante (aproximadamente 10^7 CFU/ml). Se ha descrito otro medio (Super Carba (Nordmann *et al*., 2012, J. Clin. Microbiol., *in press*)), que permite una detección fiable de EPC productoras de OXA-48 que no permite, sin embargo, su identificación ni una detección específica ya que las bacterias que producen otros tipos de carbapenemasas no se inhiben. Además, este medio presenta el inconveniente de un tiempo de caducidad muy corto (alrededor de una semana) que limita en gran medida su utilización rutinaria y su industrialización.

Así, ninguno de estos métodos es al mismo tiempo suficientemente sensible, específico y rápido para la detección de las cepas OXA-48 y no se ha propuesto ninguna solución de mejora. En la detección de las cepas OXA-48 que presentan un interés real clínico y epidemiológico, permanecen sin superarse los inconvenientes de los medios existentes en este campo.

A este respecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de identificación específica de bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48 en una muestra biológica, que comprende las etapas que consisten en:

a) poner en contacto la muestra biológica, susceptible de contener dichas bacterias, con un medio de reacción que comprende temocilina a una concentración superior o igual a 150 mg/l, preferentemente comprendida entre 200 y 500 mg/l, un agente quelante de los cationes divalentes de tipo EDTA, preferiblemente a una concentración comprendida entre 1,0 y 2,5 mmoles/l, y un sustrato cromogénico que permite la detección de una actividad enzimática específica,

b) incubar el conjunto a fin de permitir el crecimiento de las bacterias, y

c) detectar las cepas que corresponden a las bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48.

En efecto, los trabajos de la solicitante han mostrado, de manera sorprendente, que la temocilina a fuertes concentraciones, superiores o iguales a 150 mg/l permite discriminar específicamente las EPC de tipo OXA-48. De manera preferida, la temocilina se utiliza a una concentración comprendida entre 150 y 500 mg/l. Así, el procedimiento según la invención permite una detección sensible, específica y rápida (generalmente en menos de 24 horas) de las CPE de tipo OXA-48, presentando al mismo tiempo la ventaja de utilizar un medio listo para el uso y que tiene una caducidad larga que permite su industrialización. Ventajosamente, el procedimiento según la invención permite también una identificación de las cepas.

La temocilina es un derivado 6-alfa-metoxi de la ticarcilina, que es a su vez una penicilina, a veces empleada en combinación con el ácido clavulánico. Se describe como un tratamiento alternativo entre las enterobacterias multi-resistentes.

Se han llevado a cabo unos ensayos de susceptibilidad *in vitro* por Livermore *et al*. (International Journal of Antimicrobial Agents, 2011; 37: 415-419). Indican una concentración mínima inhibidora (CMI) ≥ 256 mg/l, que el experto en la materia interpreta como que las bacterias ensayadas crecen para la última concentración ensayada en temocilina de 128 mg/l. Estos ensayos han mostrado así que 18/19 cepas de tipo OXA-48 y 32/35 cepas con una metalo-carbapenemasa eran resistentes a la temocilina. Esto disuade al experto en la materia de utilizar la temocilina en un medio que tiene como objetivo detectar específicamente OXA-48.

Las definiciones siguientes se precisan con el fin de comprender mejor la invención.

Por muestra biológica, se entiende una pequeña parte o una pequeña cantidad aislada de una entidad para el análisis. Esto puede ser una muestra clínica, humana o animal, procedente de una extracción de líquido biológico, o una muestra alimenticia, procedente de cualquier tipo de alimento, o una muestra del entorno de producción o de transformación de alimentos. Esta muestra puede así ser líquida o sólida. Se puede citar de manera no limitativa, una muestra clínica de sangre entera, de suero, plasma, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, extracciones de nariz, garganta, piel, del recto, de heridas, una muestra alimenticia de agua, de bebidas tales como la leche, zumo de frutas, yogur, carne, huevos, hortalizas, mahonesa, queso, pescado, etc., una muestra alimenticia procedente de una alimentación destinada a los animales, tal como en particular una muestra procedente de harinas animales, una muestra para el control de superficie o de agua. De manera preferida, según la presente invención, la muestra es una muestra clínica.

La extracción se puede utilizar tal cual o, previamente al análisis, sufrir una preparación de tipo enriquecimiento, dilución, extracción, concentración, purificación, según unos métodos conocidos por el experto en la materia.

Por medio de reacción, se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la expresión de un metabolismo y/o para el crecimiento de microorganismos. El medio de reacción puede ser sólido, semisólido o líquido. Por medio sólido, se entiende por ejemplo un medio gelificado, o gelosado. El agar es el agente gelificante tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar gelatina, agarosa u otros gelificantes naturales o artificiales solos o en combinación. Un cierto número de preparaciones están disponibles en el mercado, como por ejemplo el agar Columbia, la gelosa tripcasa-soja, la gelosa MacConkey, la gelosa Mueller Hinton, o más generalmente las descritas en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

El medio de reacción puede comprender uno o varios elementos en combinación, tales como aminoácidos, peptonas, hidratos de carbono, nucleótidos, minerales, vitaminas, etc. El medio puede comprender también un colorante. A título indicativo, se puede citar como colorante el azul de Evans, el rojo neutro, la sangre de oveja, la sangre de caballo, un opacificante tal como el óxido de titanio o el caolín, nitroanalina, verde malaquita, verde brillante, o varios indicadores metabólicos, uno o varios reguladores metabólicos, etc.

El medio de reacción puede ser un medio de revelación o un medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la inoculación y, en el segundo caso, el medio de detección y/o de identificación constituye también el medio de cultivo. La identificación significa la clasificación de los microorganismos en una especie o un grupo de interés.

El experto en la materia puede también utilizar una bi-caja, o caja de tipo caja de Petri que comprende dos compartimientos, que permite comparar fácilmente dos medios, que comprenden diferentes sustratos o diferentes mezclas selectivas, en los que se habrá depositado una misma muestra biológica.

El medio de reacción puede comprender uno o varios agentes selectivos. Por agente selectivo, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de un microorganismo diferente del microorganismo diana. Sin ser limitativo, una concentración comprendida entre 0,01 mg/l y 5 g/l es particularmente adecuada para la presente invención.

Se pueden citar como agente selectivo, los antibióticos, los antifúngicos, las sales biliares, el cristal violeta, la fucsina básica, el verde brillante, los tensioactivos tales como Tergiol™, etc. Por antibióticos, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de una bacteria. Pertenecen en particular a los grupos de bet-lactaminas, glicopéptidos, aminósidos, polipéptidos, sulfamidas, quinilonas. A título indicativo, se pueden citar en particular los antibióticos carbenicilina, ticarcilina, temocilina, formidacilina, cefotaxima, cefsulodina, ceftazidima, cefoxitina, ceftriazona, cefpodoxima, aztreonam, ertapenemo, faropenemo, doripenemo, vancomicina, gentamicina, trimetoprima, tobramicina, moxalactam, fosfomicina, D-cicloserina, polimixina, colistina, las quinolonas tales como el ácido nalidíxico.

Por antifúngico, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de una levadura o de un moho. A título indicativo, se puede citar en particular la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol, la cicloheximida, la flucitosina.

Por sustrato cromogénico, se entiende un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática o metabólica de los microorganismos diana gracias a una señal detectable directa o indirectamente. Para una detección directa, este sustrato puede unirse a una parte que actúa como marcador, fluorescente o coloreado (Orenga *et al.*, 2009; J. Microbiol. Methods; 79(2):139-55). Para una detección indirecta, el medio de reacción según la invención puede comprender además un indicador de pH, sensible a la variación de pH inducida por el consumo del sustrato y que revela el metabolismo de los microorganismos diana. Dicho indicador de pH puede ser un cromóforo o un fluoróforo. Se citarán como ejemplos de cromóforos la púrpura de bromocresol, el azul de bromotimol, el rojo neutro, el azul de anilina, el azul de bromocresol. Los fluoróforos comprenden por ejemplo la 4-metilumbeliferona, los derivados de hidroxicumarina o los derivados de resorufina.

Según la presente invención, el sustrato cromogénico se selecciona preferiblemente entre los sustratos a base de indoxilo (3-Indoxilo, 5-Bromo-3-indoxilo, 5-Yodo-3-indoxilo, 4-Cloro-3-indoxilo, 5-Bromo-4-cloro-3-indoxilo, 5-Bromo-6-cloro-3-indoxilo, 6-Bromo-3-indoxilo, 6-Cloro-3-indoxilo, 6-Fluoro-3-indoxilo, 5-Bromo-4-cloro-N-metil-3-indoxilo, N-Metil-3-indoxilo, Aldol™, etc.); de umbeliferona (4-Metilumbeliferona, Ciclohexenoesculetina, etc.); de Alizarina; de p-Naftolbenzeína; de Nitrofenol (orto-Nitrofenol, para-Nitrofenol, etc.); de Hidroxiquinolina; de Catecol (Catecol, Dihidroxiflavona, Hidroxiflavona, etc.); de Resorufina; de rojo de Clorofenol; de Fluoresceína; de Aminofenol (para-Aminofenol, Dicloro-aminofenol, etc.); de Naftol (alfa-Naftol, 2-Naftol, Naftol-ASBI, etc.); de Aminocumarina (7-Amino-4-metil-cumarina, etc.); de Naftilamida; de Acridina (Aminofenil-acridino, etc.); de Amino-fenoxazina (Amino-benzofenoxazinona, Amino-pentil-resorufina, etc.); de Amino-estirilo (Amino-estiril-quinolinio, Amino-estiril-lepidinio, etc.).

A título indicativo, las actividades enzimáticas que son dianas por los sustratos cromógenos pueden pertenecer al grupo de las hidrolasas, preferiblemente a los grupos de las osidasas, de las esterasas o de las peptidasas. Preferiblemente, las actividades enzimáticas que son dianas por los sustratos cromogénicos se seleccionan entre: la glucuronidasa, la glucosidasa, la galactosidasa, la ribosidasa, la esterasa, la sulfatasa, la fosfolipasa, la aminopeptidasa y la desaminasa.

A título indicativo, los sustratos utilizados para la detección de una actividad beta-glucuronidasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-beta-glucurónido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucurónido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-glucurónido, el 6-Cloro-3-indolil-beta-glucurónido, el Aldol™-beta-glucurónido, el Alizarin-beta-glucurónido, el Ciclohexenoesculetin-beta-glucurónido o sus sales.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad beta-galactosidasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-beta-galactósido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galactósido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-galactósido, el 6-Cloro-3-indolil-beta-galactósido, el Aldol™-beta-galactósido, el Alizarin-beta-galactósido, el Ciclohexenoesculetin-beta-galactósido o sus sales.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad alfa-galactosidasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-alfa-galactósido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-galactósido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-alfa-galactósido, el 6-Cloro-3-indolil-alfa-galactósido o sus sales.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad beta-glucosidasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-beta-glucósido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucósido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-beta-glucósido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-glucósido, el 6-Cloro-3-indolil-beta-glucósido, el Aldol™-beta-glucósido, el Alizarin-beta-glucósido, el Ciclohexenoesculetin-beta-glucósido, el Nitrofenil-beta-glucósido, el Dicloroaminofenil-glucósido o sus sales.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad alfa-glucosidasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-alfa-glucósido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-glucósido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-alfa-glucósido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-alfa-glucósido, el 6-Cloro-3-indolil-alfa-glucósido, el Nitrofenil-alfa-glucósido o sus sales.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad ribosidasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-beta-ribósido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-ribósido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-ribósido, el 6-Cloro-3-indolil-beta-ribósido, el Alizarin-beta-ribósido, el Nitrofenil-beta-ribósido o sus sales.

A título indicativo, los sustratos utilizados para la detección de una actividad esterasa pueden ser en particular los ésteres de ácidos grasos lineales saturados o insaturados, que tienen entre 6 y 14 carbonos, preferiblemente entre 7 y 9 carbonos y de 4-Metilumbeliferona, 5-Bromo-4-cloro-3-indoxilo, 5-Bromo-6-cloro-3-indoxilo, 6-Cloro-3-indoxilo, 5-Bromo-3-indolilo o de Alizarina o sus sales. Preferiblemente, se selecciona entre 4-Metilumbelifil-octanoato, 5-Bromo-4 cloro-3-indoxiloctanoato, 5-Bromo-6-cloro-3-indoxiloctanoato, 6-Cloro-3-indoxiloctanoato, 5-Bromo-3-indoliloctanoato o Alizarinoctanoato.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad fosfolipasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-fosfatidil inositol, el 4-Metilumbeliferil-fosfatidil colina, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfatidil inositol, 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfatidilcolina, el Nitrofenil-fosfatidil inositol, el Nitrofenil-fosfatidilcolina o sus sales.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad aminopeptidasa pueden ser en particular el L-Alanil-7-amido-4-metilcumarina, el L-Alanil-dicloroamido-fenilo, la L-Alanil-7-amido-1-pentil-fenoxazinona, el L-Alanil-4-amidostiril-quinaldinio, o sus sales.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad desaminasa pueden ser en particular el L-Triptófano, la L-Fenilalanina, la L-Tirosina y la L-Histidina.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad sulfatasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-sulfato, el 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-sulfato, el 5-Bromo-6-cloro-3-indoxil-sulfato, el 3-Indoxil-sulfato, el fenolftaleín-disulfato o sus sales.

Preferiblemente, el sustrato cromogénio se selecciona entre: el 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranósido (X-glucósido), el 5-Bromo-6 cloro-3-indoxil-beta-D galactopiranósido (Magenta beta-Gal), el 6-Cloro-3-indoxil-beta-D-glucurónido (Rose-beta-Gur), el 5-Bromo-4 cloro-3-indoxil-N-metil-beta-D-glucopiranósido (GreenA-beta-Glu), el Metil-beta-D-glucopiranósido (metil-beta-D-glucósido), la Lactosa, el L-Triptófano.

El medio de reacción contiene también al menos un agente quelante de cationes, de tipo EDTA, con el objetivo de complejar el zinc, que es un cofactor de las carbabapenemasas de clase B, que favorece así su inhibición y que puede así restaurar la actividad de una beta-lactamina tal como la temocilina. Ventajosamente, la concentración en EDTA está comprendida entre 1,0 y 2,5 mmoles/l.

A título de indicativo se pueden citar otros agentes quelantes: el ácido dipicolínico, el 2-mercaptoetanol, unos derivados de la fenantrolina.

Por incubar, se entiende llevar y mantener entre 1 y 48 horas, preferiblemente entre 4 y 24 horas, más preferiblemente entre 16 y 24 horas, a una temperatura apropiada, generalmente comprendida entre 20 y 50ºC, preferiblemente entre 30 y 40ºC.

Por detectar, se entiende discernir a simple vista o con la ayuda de un aparato óptico o numérico la existencia de un crecimiento de las bacterias diana. Ventajosamente, cuando el medio utilizado comprende un sustrato cromogénico, la detección puede también permitir una identificación taxonómica de las bacterias diana. La detección se realiza a simple vista o con la ayuda de un aparato óptico o numérico para los sustratos fluorescentes y para los sustratos coloreados. Por especificidad, se entiende la capacidad del procedimiento o del medio de reacción para dar un resultado negativo cuando la cepa bacteriana buscada no está presente. En otras palabras, según la presente invención, una identificación más específica corresponde a una reducción del número de falsos positivos relacionados con las cepas que no expresan carbapenemasa de tipo OXA-48, sin pretender inhibir el conjunto de estas cepas.

Por sensibilidad, se entiende la capacidad para dar un resultado positivo cuando la cepa bacteriana buscada está presente en la muestra.

Así, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de identificación específica de bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48, en una muestra biológica, que comprende las etapas que consisten en:

a) poner en contacto la muestra biológica susceptible de contener dichas bacterias con un medio de reacción que comprende un sustrato cromogénico, y temocilina a una concentración superior o igual a 150 mg/l, preferentemente comprendida entre 200 y 500 mg/l,

y un agente quelante de los cationes divalentes de tipo EDTA, preferiblemente a una concentración comprendida entre 1,0 y 2,5 mmoles/l,

b) incubar el conjunto a fin de permitir el crecimiento de las bacterias, y

c) detectar las cepas que corresponden a las bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48.

Ventajosamente, el sustrato cromogénico permite detectar una actividad enzimática e identificar las bacterias detectadas.

De manera ventajosa, dicho medio de reacción es un medio de cultivo.

El medio de reacción utilizado en la etapa a) comprende además un agente quelante de los cationes divalentes, de tipo EDTA, preferiblemente a una concentración comprendida entre 1,0 y 2,5 mM.

Según un modo particular de realización de la invención, el medio utilizado en la etapa a) comprende al menos otro sustrato cromogénico que permite detectar una actividad enzimática.

De manera preferida, la actividad enzimática detectada para permitir la identificación de las bacterias se selecciona entre las actividades esterasa, glucosidasa, galactosidasa y glucuronidasa.

De manera preferida, las bacterias diana susceptibles de producir unas carbapenemasas de tipo OXA-48 son unas enterobacterias.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención combina dos medios de reacción, uno que comprende al menos un sustrato cromogénico, temocilina y un agente quelante de los cationes divalentes de tipo EDTA, comprendiendo el otro al menos un sustrato cromogénico y un carbapenemo, preferiblemente faropenemo. De manera preferida, una caja de tipo caja de Petri bi-compartimentada, también denominada bicaja, permite combinar estos dos medios. Una comparación de las colonias presentes después de la incubación permite identificar las cepas que corresponden a las bacterias resistentes a los carbapenemos y/o productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48.

La presente invención se refiere también a un medio de cultivo listo para el uso para la detección y/o la identificación específica de enterobacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48, que comprende:

* una base con gelosa nutritiva apta para el crecimiento de las enterobacterias,

* temocilina a una concentración superior o igual a 150 mg/l, preferentemente comprendida entre 200 y 500 mg/l,

* al menos un sustrato cromogénico, y un agente quelante de los cationes divalentes, de tipo EDTA, preferiblemente a una concentración comprendida entre 1,0 y 2,5 mM.

Finalmente, la presente invención se refiere a la utilización de la temocilina a una concentración superior o igual a 150 mg/l, preferiblemente a una concentración comprendida entre 200 y 500 mg/l combinado con un agente quelante de los cationes divalentes de tipo EDTA, preferiblemente a una concentración comprendida entre 1,0 y 2,5 mmoles/l, en un medio de reacción con gelosa o líquido, para detectar y/o identificar específicamente unas bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48 susceptibles de estar comprendidas en un medio biológico.

En el sentido de la presente invención, la temocilina está en fase homogénea en el medio de reacción, en presencia de la muestra. La temocilina no está impregnada en un disco o en una tira o cualquier otro contenedor independiente depositado sobre o en el medio de reacción.

Los ejemplos desarrollados a continuación tienen como objetivo facilitar la comprensión de la invención. Se dan a título explicativo y no pueden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Determinación de CMI con temocilina de un panel de cepas EPC (mediante el método de dilución en gelosa)

Lista de cepas utilizadas:

Perfil de resistencia	Número de cepas
Amp C	10
BLSE	10
IMP	13
KPC	12
NDM-1	26
Resistencia por impermeabilidad (RI)	10
VIM	16
OXA-48	16

Medio de reacción: la base es un medio chromID™ CPS (bioMérieux, ref. 43821-43829), que comprende un sustrato cromogénico de beta-glucuronidasa, un sustrato cromogénico de beta-glucosidasa, un sustrato cromogénico de beta-galactosidasa y un sustrato de desaminasa. A este medio de base se añade temocilina a las concentraciones indicadas a continuación.

Rango de Temocilina ensayado: 50 - 150 - 200 - 300 mg/l (Temocilina disódica, Eumedica SA, Manage, Bélgica)

Método

Los medios se inoculan por depósito de una mancha: 1 µl de una suspensión microbiana en agua fisiológica a 0,5 McF, diluida al 1/10.

Incubación de 24h a 37°C.

Lectura después de las 24 horas de incubación. Se elegirá como CMI el medio con la menor concentración en temocilina sobre el cual se obtendrá una mancha de crecimiento negativo. Se han considerado como negativas las manchas que presentan sólo 3 colonias o menos o una ausencia total de crecimiento.

Resultados

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI*	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	8	8	25	1	8	10	12	9
150	0	1	1	0	2	0	0	5
200	0	0	0	0	0	0	0	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0
> 300	2	3	0	15	0	0	1	1
*RI: cepas resistentes a los carbapenemos por impermeabilidad								

Conclusión

La mayoría de las cepas no-OXA-48 tienen unos CMI ≤ 200. La mayor parte de las cepas OXA-48 tienen unos CMI > 300. Sólo algunas cepas no-OXA-48 tienen también unos CMI > 300.

Detección de las cepas productoras de una carbapenemasa de tipo OXA-48 (con una concentración en Temocilina de 200 mg/l):

Sensibilidad	93,8%
Especificidad	92,8%

La Temocilina parece por lo tanto ser discriminante de las cepas productoras de una carbapenemasa de tipo OXA-48 a partir de la concentración de 150 mg/l y muy discriminante a 200 mg/l.

Ejemplo 2: Optimización de la especificidad de detección mediante la aportación de inhibidores específicos de inhibición de las cepas de clase B (NDM, VIM, IMP) por adición de EDTA.

Lista de cepas utilizadas:

Perfil de resistencia	Número de cepas
AmpC	10
BLSE	10
IMP	13
KPC	19
NDM-1	27
Resistencia por impermeabilidad (RI)	10
VIM	17
OXA-48	15

Base peptonada:

Idéntica a la utilizada para determinar los CMI a la Temocilina en dilución en gelosa (Ejemplo 1)

Rango de Temocilina 50-150-200-300 mg/l

Para cada concentración en Temocilina, se ensayará en forma de EDTA disódico, las concentraciones en EDTA activa siguientes: 0, 1,77, 2,12, 2,47 y 2,83 mmoles/l

Método: idéntico al método utilizado en el ejemplo 1.

Resultados:

Distribución de los CMI obtenidos con un medio a 0 mmol/l de EDTA

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	10	18	22	0	8	10	12	9
150	0	0	4	0	2	0	0	6
200	0	0	1	0	0	0	0	1
300	0	0	0	3	0	0	0	0
> 300	0	1	0	12	0	0	1	1

Distribución de los CMI obtenidos con un medio a 1,77 mmol/l de EDTA activo

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	10	18	25	0	4	9	12	17
150	0	0	2	0	4	1	0	0

200	0	0	0	0	1	0	0	0
300	0	0	0	0	1	0	0	0
> 300	0	1	0	15	0	0	1	0

Distribución de los CMI obtenidos con un medio a 2,12 mmoles/l de EDTA activo

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	9	18	26	0	4	9	12	17
150	1	0	1	0	3	1	0	0
200	0	0	0	0	2	0	0	0
300	0	0	0	0	1	0	0	0
> 300	0	1	0	15	0	0	1	0

Distribución de los CMI obtenidos con un medio a 2,47 mmoles/l de EDTA activo

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	10	18	26	0	6	10	12	17
150	0	0	1	0	2	0	0	0
200	0	0	0	0	2	0	0	0
300	0	0	0	2	0	0	0	0
> 300	0	1	0	13	0	0	1	0

Distribución de los CMI obtenidos con un medio a 2,83 mmoles/l de EDTA activo

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	10	19	27	3	6	10	12	17
150	0	0	0	1	3	0	0	0
200	0	0	0	0	1	0	0	0
300	0	0	0	3	0	0	0	0
> 300	0	0	0	8	0	0	1	0

Conclusión: las EPC de clase B de tipo VIM y NDM ven su CMI disminuir en presencia de EDTA de manera proporcional a la concentración utilizada. Por el contrario, el EDTA parece favorecer un ligero aumento de las CMI para las cepas resistentes a los carbapenemos por impermeabilidad (RI).

Rendimientos obtenidos para una concentración en Temocilina a 300 mg/l

	Sensibilidad en %	Especificidad en %
Medio a 0 mmol/l EDTA	100	97,2
Medio EDTA a 1,77 mmol/l	100	98,1
Medio EDTA a 2,12 mmol/l	100	98,1
Medio EDTA a 2,47 mmol/l	86,7	98,1
Medio EDTA a 2,83 mmol/l	53,3	99,1

La aportación de EDTA permite una mejora de especificidad, a partir de 1,77 mmol/l, sin degradación de la sensibilidad de detección de las cepas OXA-48 si la concentración sigue siendo <= 2,12 mmol/l.

Ejemplo 3: Evaluación de los rendimientos de un medio prototipo definido.

Lista de cepas utilizadas:

Perfil de resistencia	Número de cepas
BLSE	2
IMP	1
KPC	3
NDM-1	1
RI	3
VIM	1
OXA-48	15

Método:

Los medios se preparan en cajas de Petri de 55 mm de diámetro. Se inoculan con la ayuda de una suspensión bacteriana en agua fisiológica a 0,5 McF para las cepas no OXA-48 y con una dilución al 1/100 y 1/10 000 de una suspensión a 0,5 McF para las cepas OXA-48. La inoculación consiste en un aislamiento de 3 cuadrantes con la ayuda de un asa de inoculación calibrada de 10 µl: depósito teórico de 10^4 o 10^2 CFU para las cepas OXA-48 y de 10^6 CFU para las cepas no productoras de OXA-48.

Los medios se incuban a 37°C. Las lecturas se efectuarán después de 18 y 24 horas de incubación.

Se evalúan La densidad de crecimiento, los tamaños de colonias, así como la coloración (color e intensidad).

Medio de reacción idéntico a la base utilizada para el Ejemplo 1. Se añaden también un sistema selectivo que comprende una mezcla de antibióticos y de antifúngicos específico de los Gram positivos, unas levaduras y unos Gram negativos que no fermentan, así como cloxacilina y EDTA.

Rango de Temocilina: 200, 300, 400, y 500 mg/l

Se ensaya un medio a 200 mg/l de temocilina sin sistema selectivo, tal como se ha indicado anteriormente.

Resultados a 24 horas de incubación:

Concentración en Temocilina en mg/l					
Número de cepas detectadas	200	200	300	400	500
	Sin sistema selectivo				
OXA-48 depósito 10^4 CFU	15/15	15/15	15/15	15/15	12/15
OXA-48 depósito 10^2 CFU	15/15	15/15	15/15	14*/15	9/15
Non OXA-48 depósito 10^6 CFU	3**/13	3**/13	1/13	2***/13	2***/13
*incluyendo 3 cepas con 1 sola colonia detectada ** incluyendo 2 cepas con 1 sola colonia *** incluyendo 1 cepas con 1 sola colonia					

Conclusión: la adición del sistema selectivo no tiene ningún impacto sobre la detección de las cepas OXA-48. La sensibilidad tiende a disminuir ligeramente en esta configuración de medio de reacción, a partir de 400 mg/l de temocilina.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección y/o de identificación específica de bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48 en una muestra biológica, que comprende las etapas que consisten en:

a) poner en contacto la muestra biológica susceptible de contener dichas bacterias con un medio de reacción que comprende al menos un sustrato cromogénico que permite detectar una actividad enzimática, temocilina a una concentración superior o igual a 150 mg/l, preferentemente comprendida entre 200 y 500 mg/l, y un agente quelante de los cationes divalentes de tipo EDTA, preferiblemente a una concentración comprendida entre 1,0 y 2,5 mmoles/l,

b) incubar el conjunto a fin de permitir el crecimiento de las bacterias, y

c) detectar las cepas que corresponden a las bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las bacterias susceptibles de estar presentes en la muestra son unas enterobacterias.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el medio utilizado en la etapa a) comprende al menos otro sustrato cromogénico que permite detectar una actividad enzimática.

4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, en el que el sustrato permite detectar al menos una actividad enzimática elegida entre las actividades esterasa, glucosidasa, galactosidasa y glucuronidasa.

5. Procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48 y de bacterias resistentes a los carbapenemos en una muestra biológica, que comprende las etapas que consisten en:

d) poner en contacto la muestra biológica susceptible de contener dichas bacterias con un medio de reacción que comprende al menos un sustrato cromogénico que permite detectar una actividad enzimática, temocilina a una concentración superior o igual a 150 mg/l, y un agente quelante de los cationes divalentes de tipo EDTA, preferiblemente a una concentración comprendida entre 1,0 y 2,5 mmoles/l,

y con otro medio de reacción que comprende al menos un sustrato cromogénico que permite detectar una actividad enzimática y un carbapenemo, preferiblemente el faropenemo;

e) incubar el conjunto a fin de permitir el crecimiento de las bacterias, y

f) detectar las cepas que corresponden a las bacterias resistentes a los carbapenemos y/o productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la etapa a) se realiza en una bicaja que combina dos medios tales como se indican en la etapa a).

7. Medio de cultivo listo para el uso para la detección y/o la identificación de enterobacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48, que comprende:

* una base con gelosa nutritiva apta para el crecimiento de las enterobacterias,

* temocilina a una concentración superior o igual a 150 mg/l, preferentemente comprendida entre 200 y 500 mg/l, y un agente quelante de los cationes divalentes, de tipo EDTA, preferiblemente a una concentración comprendida entre 1,0 y 2,5 mmol/l,

* al menos un sustrato cromogénico.

8. Utilización de la temocilina a una concentración superior o igual a 150 mg/l, preferiblemente comprendida entre 200 y 500 mg/l, combinada con un agente quelante de los cationes divalentes, a una concentración preferiblemente comprendida entre 1,0 y 2,5 mmoles/l, en un medio de reacción líquido o con gelosa, para detectar y/o identificar unas bacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48 susceptibles de estar comprendidas en una muestra biológica.