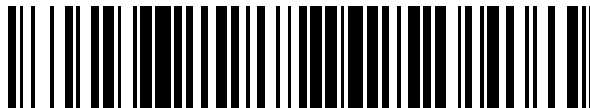


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 534**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2010 PCT/FI2010/050395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10130882**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2010 E 10723161 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2430188**

54 Título: **Un método y un kit de detección de bacterias resistentes a antibióticos**

30 Prioridad:

15.05.2009 FI 20095544

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

06.05.2019

73 Titular/es:

**AMPLIDIAG OY (100.0%)
C/o Mobidiag Oy, Keilaranta 16A
02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**KIRVESKARI, JUHA y
KOSKELA, SUVI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 711 534 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

Un método y un kit de detección de bacterias resistentes a antibióticos

5 La presente invención se refiere a un método y a un kit de detección de genes de carbapenemasas que causan resistencia a los carbapenemas en bacterias (es decir, bacterias resistentes a los carbapenemas). La invención también se refiere a cebadores oligonucleotídicos que pueden usarse en la detección.

10 El aumento de la resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos, tales como las penicilinas y las cefalosporinas, presenta problemas de tratamiento de infecciones causadas por bacilos Gram negativos. Por lo tanto, cada vez más a menudo, los antibióticos β -lactámicos deben ser reemplazados por antibióticos de amplio espectro.

15 Los carbapenemas representan un importante grupo de antibióticos de amplio espectro para tratar infecciones hospitalarias difíciles. En general, los carbapenemas son eficaces contra la mayoría de las bacterias aerobias Gram positivas y Gram negativas, y también contra las anaerobias. Los carbapenemas de uso frecuente son el imipenem, el meropenem y el ertapenem. Las cepas bacterianas resistentes a estos productos farmacéuticos aparecen en pacientes de hospitales, en particular, en Grecia, Israel, Estados Unidos, Turquía y el Lejano Oriente (China) y en América Central.

20 Las bacterias típicas con susceptibilidad reducida a los carbapenemas son *E. coli*, *Klebsiella* sp. y otras especies de *Enterobacteriaceae*. Además, *Pseudomonas aeruginosa*, y sus especies estrechamente relacionadas de origen ambiental, y *Acinetobacterium* sp., que se dan en pacientes con respuesta inmunitaria comprometida, suelen tener una reducida susceptibilidad a los carbapenemas.

25 La susceptibilidad reducida a los antibióticos carbapenemas puede estar causada por uno o más de cientos de genes resistentes a antibióticos β -lactámicos diferentes en combinación con cambios en la permeabilidad de la pared celular (por ejemplo, cambios en porinas específicas) y/o la salida asociada con la hiperproducción de β -lactamasas ampC. Por lo general, esto causa una reducción en la susceptibilidad a los carbapenemas, que suele ser reversible y termina cuando finaliza el tratamiento con antibióticos. La razón de esto es que el mantenimiento del mecanismo consume energía de la bacteria y es una desventaja para su suministro de nutrientes.

35 Otra razón, y más grave, de la resistencia a los carbapenemas son las enzimas que degradan los antibióticos carbapenemas, denominadas carbapenemasas. En presencia de las carbapenemasas, la bacteria no necesita ofrecer de manera significativa su capacidad para competir en comparación con las bacterias de tipo silvestre. Por lo tanto, las carbapenemasas solo pueden ser la razón de una notable resistencia a los carbapenemas. Este mecanismo puede aparecer combinado con los mecanismos mencionados anteriormente, lo que aumenta la reducción de la susceptibilidad y, por consiguiente, la resistencia. Los genes de carbapenemasas pueden estar presentes tanto en los cromosomas como en los plásmidos. En particular, los que se encuentran en los plásmidos se transfieren fácilmente a otras especies bacterianas, de manera similar a las de las cepas de β -lactamasa de espectro extendido (ESBL). Las cepas que producen carbapenemasas también suelen ser cepas de ESBL. En especial, la familia de genes de las carbapenemasas *Klebsiella pneumoniae* (KPC) y de *Verona imipenemase* (VIM) son una amenaza potencial para los tratamientos con antibióticos de los que se dispone en la actualidad. Dado que las bacterias productoras de KPC pueden ser difíciles de detectar, de acuerdo con las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de rutina, pueden causar problemas en las medidas del control de la infección. Otra familia común de β -lactamasas con propiedades de carbapenemasas es la β -lactamasa (GES) de espectro extendido de la Guayana, que también es particularmente difícil de detectar basándose en las pruebas rutinarias de susceptibilidad a los antibióticos.

50 El gran reservorio de genes de resistencia a los carbapenemas de las especies ambientales, combinado con el creciente uso de los carbapenemas genera el riesgo de aparición de nuevos o raros genes de carbapenemasas, que pueden permanecer sin ser detectados. Por otro lado, la resistencia a los carbapenemas puede estar causada por un mecanismo reversible como el descrito anteriormente. Por lo tanto, existe la necesidad de mejores métodos de detección de genes de carbapenemasas causantes de bacterias resistentes a los carbapenemas en muestras biológicas.

55 Sumario

Es un objetivo de la presente invención resolver al menos algunos de los problemas de la técnica anterior.

60 En particular, un objetivo de la invención es proporcionar un método para averiguar si una muestra biológica contiene bacterias resistentes al grupo de antibióticos de los carbapenemas.

Más específicamente, un objetivo de la invención es proporcionar un método para seleccionar genes de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas en bacterias, es decir, causantes de la resistencia a los antibióticos del grupo de los carbapenemas.

65

La presente invención se basa en el uso de métodos de biología molecular para seleccionar genes de resistencia a partir de muestras biológicas. En particular, la invención se basa en el uso de cebadores diseñados específicamente capaces de detectar genes de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas. Estos métodos pueden usarse para reemplazar métodos bioquímicos o combinados con estos.

La presente invención proporciona un método de detección de genes de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas en bacterias (bacterias resistentes a los carbapenemas) presentes en una muestra biológica.

La presente invención se refiere a un método de detección de genes de carbapenemasas en una muestra biológica como se define en la reivindicación 1. Además, la presente invención se refiere a un método de identificación, en una reacción, de más de un gen de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas en bacterias como se define en reivindicación 12.

La invención también proporciona un kit y cebadores para identificar genes de carbapenemasas.

La presente invención se refiere a un kit que comprende un conjunto de pares de cebadores para la identificación, en una reacción de multiplexación, de más de un gen de carbapenemasas causante de resistencia a los carbapenemas en bacterias como se define en la reivindicación 7.

Asimismo, la divulgación proporciona una disposición para la identificación de genes de carbapenemasas. La invención tiene muchas ventajas. Permite identificar rápidamente las cepas que amenazan la higiene de los hospitales y el seguimiento continuo. Esto es solo parcialmente posible usando métodos bioquímicos. El uso de métodos de biología molecular solos o en combinación con métodos bioquímicos es una notable mejora frente a la técnica anterior.

A continuación, se examinará la invención más de cerca con la ayuda de una descripción detallada y con referencia a algunos ejemplos de trabajo.

La Fig. 1 muestra una curva de amplificación de genes de cuatro genes de carbapenemasas diferentes.

La Fig. 2 muestra un análisis de la curva de fusión, diferentes productos génicos pueden separarse en función de su diferente temperatura de fusión.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención hace que sea posible detectar genes resistentes a los antibióticos carbapenemas. El método se basa en la detección de genes de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas en bacterias. Más específicamente, la detección se basa en el uso de un método de amplificación, tal como el método de LCR (reacción en cadena de la ligasa) o el método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Preferentemente, la reacción de amplificación es un método de PCR, en particular, PCR en tiempo real. Más ventajosamente, el método usa la PCR basada en la detección de SYBR Green en tiempo real y, preferentemente, el análisis de curva de fusión del producto.

En el presente documento, SYBR Green significa un colorante fluorescente de unión al ácido nucleico que ilumina los productos amplificados con colorante fluorescente de unión al ácido nucleico unido a los mismos con una longitud de onda de luz seleccionada para la generación de fluorescencia a partir de los mismos, y para el control de la emisión de fluorescencia y la determinación de un ciclo cuando la emisión de fluorescencia alcanza una fase de meseta, lo que indica la finalización de la reacción. Preferentemente, el colorante fluorescente de unión al ácido nucleico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en SYBRTM. GREEN I, bromuro de etidio, verde pico, verde EVA, naranja de acridina, naranja de tiazol, YO-PRO-1 y cromomicina A3.

La detección con SYBR Green en tiempo real se refiere en el presente documento a un método de control en tiempo real de una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra biológica. El método comprende amplificar la secuencia diana mediante la reacción en cadena de la polimerasa, preferentemente en presencia de SYBRTM. Green I; reacción en cadena de la polimerasa que comprende las etapas de añadir una polimerasa termoestable y cebadores para la secuencia de ácido nucleico diana a la muestra biológica; y ciclar térmicamente la muestra biológica entre al menos una temperatura de desnaturalización y una temperatura de elongación; estimular la muestra biológica con luz a una longitud de onda absorbida por el SYBRTM. Green I y detectar la emisión de la muestra biológica; y controlar la fluorescencia dependiente de la temperatura del SYBRTM. Green I. Preferentemente, la etapa de control comprende determinar un perfil de fusión de la secuencia diana amplificada.

Por "muestra biológica" se entiende, en el presente documento, una muestra clínica directa, por ejemplo, fluidos corporales tales como sangre u orina, o frotis de garganta, frotis nasales, frotis dérmicos, esputo, heces o aspirados

bronquiales. La muestra biológica también puede significar cultivos puros de bacterias de diversos ambientes. Por lo general, los cultivos bacterianos pueden prepararse a partir de muestras biológicas sembrando en placas y cultivando las bacterias.

5 Se puede usar una reacción de amplificación, normalmente, una reacción de PCR, para amplificar los ácidos nucleicos directamente en una muestra biológica, que, en el presente documento, normalmente es una muestra clínica, o en un cultivo de bacterias puras, o la reacción de amplificación, normalmente, se puede usar una reacción de PCR para amplificar ácidos nucleicos aislados.

10 Por "cebadores", se entienden oligonucleótidos diseñados para que sean específicos de la detección de polinucleótidos. Los cebadores pueden diseñarse para comprender o tener una secuencia complementaria a la secuencia polinucleotídica diana. Se pueden diseñar cebadores directos e inversos que sean capaces de hibridarse a través del emparejamiento de bases con el polinucleótido diana. En una realización de la presente invención, los cebadores están diseñados para detectar genes de carbapenemasas que se espera que causen resistencia a los carbapenemas. En una realización preferida de la invención, los cebadores contienen al menos parte, o comprenden o tienen las secuencias seleccionadas del grupo que comprende de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 49.

15 Los cebadores tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos, normalmente, de 20 a 40 o de 20 a 35 nucleótidos. Se pueden añadir más nucleótidos, por ejemplo, 1, 2 o 3, en uno o ambos extremos de los cebadores. Como alternativa, 1, 2 o 3 nucleótidos pueden eliminarse o sustituirse en uno o ambos extremos de los cebadores. En algunos casos, se pueden añadir, eliminar o sustituir 1, 2 o 3 nucleótidos en el medio, es decir, en otras partes distintas de las partes terminales del cebador.

25 Las modificaciones (en particular, modificaciones genéticas) o secuencias parciales de cebadores son posibles siempre que el cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de ácido nucleico diana que es capaz de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico diana. Dentro del alcance de la presente invención, están los cebadores modificados o las secuencias parciales de cebadores que aún son capaces de detectar las secuencias polinucleotídicas diana, es decir, los genes responsables de la resistencia a los carbapenemas, los genes de las carbapenemasas.

30 Las condiciones de hibridación son condiciones preferentemente rigurosas, y se refieren, en el presente documento, a la hibridación a 58 °C +/- 7 °C, preferentemente, +/-3 °C. La prueba puede ejecutarse usando una mezcla maestra de PCR comercial que contenga una concentración óptima de iones, por ejemplo Mg²⁺, K⁺ y NH₄⁺ para la hibridación de cebadores (emparejamiento en el caso de la PCR) y reacciones de extensión. Por ejemplo, La mezcla maestra de qPCR MAXIMA SYBR, que usa una cantidad baja de SYBR Green para una alta eficiencia de la PCR. Los componentes de la reacción son 10 microlitros de mezcla maestra de qPCR, 6,8 microlitros de oligomix 1 o 6,4 microlitros de oligomix 2 y 1 microlitro de molde de ADN.

35 Solo con el uso de métodos bioquímicos no es posible resolver los mecanismos genéticos que hay detrás de la resistencia a los carbapenemas, porque la resistencia está causada por más de 110 genes. El conocimiento del mecanismo de resistencia mejora esencialmente la interpretación del ensayo de susceptibilidad a los antibióticos y la elección de los productos farmacéuticos usados para tratar al paciente. Por ejemplo, las carbapenemasas con amplio espectro de sustratos, tales como VIM, desalientan el uso *in vivo* de cualquier antibiótico β-lactámico, mientras que otros mecanismos, tales como el IML, pueden dejar disponibles algunas opciones de tratamiento con β-lactama.

40 La presente divulgación proporciona cebadores que se han diseñado para detectar genes responsables de la resistencia a los carbapenemas (es decir, los genes de las carbapenemasas causantes de la resistencia a las carbapenemasas). Los cebadores se han probado y optimizado experimentalmente. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la reacción de identificación se lleva a cabo en dos reacciones separadas. En estas reacciones, las condiciones de amplificación son comúnmente compatibles. Esto hace posible la detección HTP (detección de alto rendimiento).

45 Por consiguiente, el método hace posible reducir al mínimo los costes de las pruebas. El método también es sencillo y fácil de usar. Asimismo, el método es adecuado para un uso diagnóstico diario.

50 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la prueba puede identificar 110 genes de resistencia con sus subvariantes. Esto se lleva a cabo preferentemente en dos (o más, preferentemente dos) reacciones de PCR de multiplexación basadas en la identificación basada en SYBR Green en tiempo real y con la determinación de la temperatura de disociación.

55 De acuerdo con una realización preferida de la invención, una (o la primera) reacción de multiplexación cubre más del 99 % de las carbapenemasas pertenecientes a enterobacterias. Usando la primera reacción de multiplexación, es posible detectar los bacilos coliformes pertenecientes a las enterobacterias.

60 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, otra reacción (la segunda) de multiplexación está dirigida,

en particular, a la detección de bacterias multirresistentes de pacientes que están inmunocomprometidos. Por lo general, estas son bacterias pertenecientes a *Pseudomonas* sp. y *Acinetobacterium* sp.

De acuerdo con una realización adicional, una (o la primera) reacción de multiplexación normalmente detecta los genes de la metalo- β -lactamasa del grupo B, la mayoría de los genes de las carbapenemasas del grupo A (genes de la penicilinasas), y el gen OXA-48, que pertenece al grupo D (oxasilinasas). La otra (o segunda) reacción de multiplexación normalmente detecta los genes de las carbapenemasas del grupo D (genes de oxasilinasas), los genes de las carbapenemasas del grupo C (genes de cefalo-esporinasas), y el gen de SFC, que pertenece al grupo A (penicilinasas) y NMD-1.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el método comprende las etapas:

1 y 2. Preparación de la muestra biológica.

Esta puede comprender el aislamiento del ácido nucleico. Esto normalmente se realiza por medio de la ebullición o, de manera semiautomática, con un robot de extracción. La muestra puede usarse también directamente o pueden usarse cultivos puros de bacterias preparadas a partir de la muestra.

3. Amplificación de genes:

a) mezcla maestra que comprende polimerasa y tampón de PCR;

b) monómeros de nucleósidos trifosfato;

c) cebadores oligonucleotídicos para las reacciones;

d) molde de ácido nucleico de la muestra;

e) amplificar y analizar las curvas de disociación de los productos. Esto se lleva a cabo preferentemente mediante equipos de PCR en tiempo real.

4. Análisis de los resultados

a) controles positivos y negativos presentes;

b) la temperatura de disociación suele indicar el mecanismo; el resultado se puede confirmar mediante la secuenciación del producto en una reacción separada, si es necesario,

c) el resultado negativo excluye con alta probabilidad las carbapenemasas, ya que la prueba comprende esencialmente todos los genes de carbapenemasas desvelados en especies clínicas.

El ácido nucleico aislado de la muestra y el molde de ácido nucleico es preferentemente ADN.

Como la mayoría de las muestras son negativas, el método de detección es muy eficaz y tiene una naturaleza de alto rendimiento.

En una realización preferida de la invención, los cebadores oligonucleotídicos están diseñados para la detección de genes o de familias de genes o de subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende: VIM 1-22, IMP 1-24, OXA-48, KPC 1-7, GES 1-10, SPM, NMC-A, IMI 1-3, SME 1-3, GIM-1 y SIM-1.

De acuerdo con una realización más preferida, al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes se detecta en una reacción. En realizaciones aún más preferidas, más de un gen o familia de genes o más de una subvariante génica, o todos los genes o familias de genes o subvariantes de genes se detectan en una reacción.

En otra realización preferida de la invención, los cebadores oligonucleotídicos están diseñados para la detección de genes o de familias de genes o sus subvariantes seleccionados del grupo que comprende: OXA-24 -25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51, 64-66, 68-71, 75-78, 83, 84, 86-89, -92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, SFC-1 e CMY-1,-10.

De acuerdo con una realización más preferida, al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes se detecta en una reacción. En realizaciones aún más preferidas, más de un gen o familia de genes o más de una subvariante génica, o todos los genes o familias de genes o subvariantes de genes se detectan en una reacción.

En una realización preferida adicional de la invención, al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes OXA se detecta en una reacción, más preferentemente, más de un gen o de una familia de genes, o más de una subvariante o todos los genes o familias de genes OXA se detectan en una reacción.

En una realización preferida adicional de la invención, los cebadores oligonucleotídicos están diseñados para la detección de genes o de familias de genes o sus subvariantes seleccionados del grupo que comprende: OXA-48, SME, GIM-1, VIM 1-22, SPM, GES 1-10, KPC 1-7, IMI 1-3/NMC-A, IMP 1-24.

5 De acuerdo con una realización más preferida, al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes se detecta en una reacción. En realizaciones aún más preferidas, más de un gen o familia de genes o más de una subvariante génica, o todos los genes o familias de genes o subvariantes de genes se detectan en una reacción.

10 En otra realización preferida adicional de la invención, los cebadores oligonucleotídicos están diseñados para la detección de genes o de familias de genes o sus subvariantes seleccionados del grupo que comprende: grupo de OXA-23, grupo de _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY 1, -10,11 SFC-1, NDM-1 y SIM-1.

15 De acuerdo con una realización más preferida, al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes se detecta en una reacción. En realizaciones aún más preferidas, más de un gen o familia de genes o más de una subvariante génica, o todos los genes o familias de genes o subvariantes de genes se detectan en una reacción.

20 NDM-1 es una nueva metalo-β-lactamasa (MBL) de India y Pakistán, que comparte muy poca identidad con otras MBL, con las MBL más similares que son VIM-1NIM-2, con las que tiene solo el 32,4 % de identidad. NDM-1 puede hidrolizar todas las β-lactamas excepto aztreonam. En comparación con VIM-2, NDM-1 muestra una unión más fuerte a la mayoría de las cefalosporinas, en particular, cefuroxima, cefotaxima y cefalotina, y también a las penicilinas. NDM-1 puede conjugarse *in vivo* con las otras especies bacterianas, lo que es mediado por un plásmido transconjugante.

25 Aunque el resultado más fiable de la resistencia a las carbapenemasas en una muestra biológica se puede obtener mediante el estudio de la presencia de muchos genes de carbapenemasas, los genes más importantes (o familias de genes o subvariantes de genes) que se detectarán se seleccionan del grupo que comprende: KPC 1-7, OXA-48, VIM 1-22, GES 1-10 y/o IMP1-24. El más importante de detectar es KPC 1-7, los segundos más importantes son OXA-48 y/o VIM 1-22, los terceros más importantes son GES 1-10, y los cuartos más importantes son IMP1-24.

30 Asimismo, también es importante detectar los genes (o familias de genes o subvariantes de genes) SME 1-3, GIM-1, SPM y/o IMI1-3/NMC-A

35 También es importante detectar los genes (o familias de genes o subvariantes de genes) del grupo de OXA-23, grupo de _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-58 y/o NDM-1. Asimismo, también son importantes los genes (o familias de genes o subvariantes de genes) CMY-1,-10, -11, SFC-1 y/o SIM-1. También se pueden detectar los genes (o familias de genes o subvariantes de genes) OXA-55, OXA-60 y/o OXA-62.

40 Sin embargo, los genes que son más importantes de detectar también dependen del área geográfica, es decir, de la frecuencia de ciertos genes de resistencia y/o bacterias en ese área geográfica.

45 Todos los genes mencionados anteriormente se han descrito en la bibliografía. Se ha validado la prueba, además de con cepas de control positivo, también con más de 250 cepas ESBL clínicas, con más de 50 cepas multirresistentes de *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, y con otras 60 cepas de control negativo (especificidad) que engloban los bacilos aeróbicos clínicos más importantes.

En una realización de la invención, los oligonucleótidos tienen o contienen preferentemente las siguientes secuencias:

50

Gen diana para el diseño de cebadores	directos 5'-3'	Secuencia	Genes diana confirmados
OXA-48	F_oxa48_003	TTACTGAACATAAATCACAGG (SEQ ID NO:1)	
	R_oxa48_003	ATTATTGGTAAATCCTTGCTGCTTATTCTC (SEQ ID NO:2)	
SME	F_sme_006	CAGATGAGCGGTTCCCTTTATGC (SEQ ID NO:3)	1-3
	R_sme_006	CAGAAGCCATATCACCTAATGTCATACC (SEQ ID NO:4)	
GIM-1	F_gim_001	CGAATGGGTTGGTAGTTCTGGATAATAAT C (SEQ ID NO:5)	

ES 2 711 534 T3

Gen diana para el diseño de cebadores	directos 5'-3'	Secuencia	Genes diana confirmados
	R_gim_001	ATGTGTATGTAGGAATTGACTTTGAATTTA GC (SEQ ID NO:6)	
SIM-1	F_sim_001	CTGCTGGGATAGAGTGGCTTAATAC (SEQ ID NO:7)	
	R_sim_001	T CAAT AGT GATGCGTCTCCGA TTTC (SEQ ID NO:8)	
VIM	F_vim_03	GTGTTTGGTCCGATATCGCAAC (SEQ ID NO:9)	1-22
	R_vim_03	GCTGTATCAATCAAAGCAACTCATC (SEQ ID NO:10)	
SPM	F_spm_001	CCTACAATCTAACGGCGACCAAG (SEQ ID NO:11)	
	R_spm_001	AACGGCGAAGAGACAATGACAAC (SEQ ID NO:12)	
GES	F_ges_001	ACACCTGGCGACCTCAGAGATAC (SEQ ID NO:13)	1-10
	R_ges_001	ACTTGACCGACAGAGGCAACTAATTC (SEQ ID NO:14)	
KPC	F_kpc_001	CAGCGGCAGCAGTTTGTGATTG (SEQ ID NO:15)	1-7
	R_kpc_001	CCAGACGACGGCATAGTCATTTG (SEQ ID NO:16)	
IMI-1-3/NMC-A	F_imi1_001	AAACAAGGGAATGGGTGGAGACTG (SEQ ID NO:17)	1-3 +1
	R_imi1_001	AAGGTATGCTTTGAATTTGCGTTGAAC (SEQ ID NO:18)	
IMP-10	F_imp_10	AATAATGACGCCTATCTAATTGACTCC (SEQ ID NO:19)	IMP 1-24
	R_imp_10	ATCCACCCGTA CTGTGCTATG (SEQ ID NO:20)	
IMP-11,21,22	F_imp_11	TGACGCCTATCTGATTGACTCC (SEQ ID NO:21)	IMP 1-24
	R_imp_11	GCTGTGCTATGGAAATGTGAGG (SEQ ID NO:22)	
OXA-25	F_oxa25_001	CCAGTACAAGAAGTTAATTTTGCCGATG (SEQ ID NO:23)	OXA-25, -26, -40, -24, -72
	R_oxa25_001	CCCAACCAGTCAACCAACCTACC (SEQ ID NO:24)	
OXA-27	F_oxa27_001	ATATTTTACTTGCTATGTGGTTGCTTCTC (SEQ ID NO:25)	OXA-23, -27
	R_oxa27_001	TCTCCAATCCGATCAGGGCATTTC (SEQ ID NO:26)	
OXA-50	F_oxa50_001	AGTGCCCTTCTCCTGCTTTCC (SEQ ID NO:27)	OXA-50
	R_oxa50_001	CCTCGTCGGCGGATCTAACC (SEQ ID NO:28)	
OXA-51	F_oxa51_001	AATTTATTTAACGAAGCACACTACGG (SEQ ID NO:29)	OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -75, -76, -77, -78, -83, -84, -86, -87, -88, -89, -92, -94, -95
	R_oxa51_001	GCACGAGCAAGATCATTACCATAGC (SEQ ID NO:30)	
OXA-55	F_oxa55_02	TGTGCTGTGTTATCTGAC (SEQ ID NO:31)	OXA-55
	R_oxa55_02	GTGTTTCTGGACTTCTTTAC (SEQ ID NO:32)	
OXA-58	F_oxa58_02	GACAATTACACCTATAACAAGAAG (SEQ ID NO:33)	OXA-58
	R_oxa58_02	CGCTCTACATAACAACATCTC (SEQ ID NO:34)	
OXA-60	F_oxa60_02	TTCGACGTTCAAGATTCC (SEQ ID NO:35)	OXA-60
	R_oxa60_02	TTCGAAAGCGGAAATCTC (SEQ ID NO:36)	
OXA-62	F_oxa62_02	TGTCATGCCTGCCCTGCTATC (SEQ ID NO:37)	OXA-62
	R_oxa62_02	ACGAAGTCCACCTGCTCACG (SEQ ID NO:38)	

Gen diana para el diseño de cebadores	directos 5'-3'	Secuencia	Genes diana confirmados
CMY-1,10	F_cmy_01	CAGGTGCTCTTCAACAAG (SEQ ID NO:39)	CMY-1, 10,-11
	R_cmy_01	CGCCCTCTTTCTTTCAAC (SEQ ID NO:40)	
SFC-1	F_sfc_01	CCTGGTGATGATAGAGATAC (SEQ ID NO41)	SFC-1
	R_sfc_01	ATAATCGTTGGCTGTACC (SEQ ID NO:42)	

Los oligonucleótidos tienen o contienen las secuencias como se ha presentado anteriormente, excepto que los siguientes genes diana se detectan preferentemente con los siguientes oligonucleótidos:

Gen diana para el diseño de cebadores	directos 5'-3'	Secuencia	Genes diana confirmados
OXA-48	F_oxa48_003	TTACTGAACATAAATCACAGGGCGTAG (SEQ ID NO:49)	
	R_oxa48_003	ATTATTGGTAAATCCTTGCTGCTTATTCTC (SEQ ID NO:2)	
Grupo OXA-24	F_oxa24_02	ACTTTAGGTGAGGCAATG (SEQ ID NO:43)	OXA-24,-25,-26, -40, -72
	R_oxa24_02	TAACTTCTTGACTGGTGTA (SEQ ID NO:44)	
grupo de OXA-51 con promotor ISabal	F_IS51_01	GTCATAGTATTCGTCGTTAGA (SEQ ID NO:45)	OXA-51, -64, -65, -66, -68,-69, -70,-71, -75, -76, -77,-78, -83,-84, -86,-87, -88,-89, -92, -94, -95
	R_IS51_01	GTAAGAGTGCTTTAATGTTTCATA (SEQ ID NO:46)	
NDM-1	F_ndm_01	CGATCAAACCGTTGGAAG (SEQ ID NO: 47)	NDM-1
	R_ndm_01	AAGGAAAACCTTGATGGAATTG (SEQ ID NO:48)	

5 En una realización preferida de la invención, los siguientes genes, familias de genes o subvariantes de genes se pueden detectar en una (primera reacción): OXA-48, SME 1-3, GIM-1, VIM 1-22, SPM, GES 1-10, KPC 1-7, IMI 1-3/NMC-A, I y/o IMP1-24.

10 Preferentemente, en otra (segunda) reacción se pueden detectar los siguientes genes, familias de genes o subvariantes de genes: grupo OXA-23, grupo _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY-1.-10, -11, SFC-1, NDM-1 y/o SIM-1.

15 El grupo OXA-23 puede detectar tanto OXA-23 como OXA-27. OXA-51 se ha reemplazado con el sitio de ligadura de ISAbal-OXA-51. OXA-51 se puede encontrar en todas las bacterias *Acinetobacter baumannii* y es clínicamente significativo, cuando está en conexión con la región del gen ISAbal que mejora la lectura del gen. Los cebadores diseñados para OXA-24 pueden detectar OXA-24, -25,26, -40 y -72.

20 Las condiciones de reacción en las reacciones de multiplexación pueden ser las mismas.

En una realización preferida de la invención, la reacción de amplificación se lleva a cabo como una reacción de PCR usando un programa de PCR, que comprende una amplificación génica típica en dos etapas y una detección en tiempo real en la etapa de hibridación/extensión y, posteriormente, un análisis de la temperatura de disociación. El equipo es preferentemente Strata-gene MxPro 3005P.

25

Fase	Temperatura °C	Duración
1. Desnaturalización/activación inicial	95	10 min
2. Desnaturalización	95	20s
3. Hibridación/extensión	58	30s
4. Fases de repetición 2-3. 34 (o 35 veces)		
5. Extensión final	58	60s

6. Desnaturalización	95	30s
7. Temperatura de disociación/fusión	58-95	automático (o 5 s)

5 Dentro del alcance de la invención también hay realizaciones, en las que las condiciones de la PCR han sido ligeramente modificadas. Es competencia de un experto en la materia descubrir las condiciones en las que la temperatura aumenta con 1, 2 o 3 C en las fases 1 a 8 o la duración de las etapas de reacción se acorta o se alarga con de 1 a 5 o de 1 a 3 minutos en la fase 1 o con de 1 a 5 o de 1 a 3 segundos en las fases 2 a 8.

La cantidad de los cebadores oligonucleotídicos de la mezcla de reacción puede ser igual o la cantidad de cada oligonucleótido puede elegirse para que sea la más óptima para la reacción.

10 La amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana en una muestra biológica se controla en tiempo real, comprendiendo dicho método las etapas de: amplificar la secuencia diana mediante la reacción en cadena de la polimerasa en presencia de una cantidad de SYBR.TM Green I, comprendiendo dicha reacción en cadena de la polimerasa las etapas de añadir el SYBR.TM Green I, una polimerasa termoestable, y cebadores para la secuencia de ácido nucleico diana a la muestra biológica para crear una mezcla de amplificación y ciclar térmicamente la mezcla de amplificación entre al menos una temperatura de desnaturalización y una temperatura de elongación durante una pluralidad de ciclos de amplificación; iluminar la mezcla con luz a una longitud de onda absorbida por el SYBR.TM Green I en al menos una parte de la pluralidad de ciclos de amplificación; y detectar una emisión fluorescente del SYBR.TM Green I tras la iluminación de la muestra, estando dicha emisión fluorescente relacionada con la cantidad de ácido nucleico diana amplificado en la muestra. La muestra se ilumina y se detecta la fluorescencia a medida que aumenta la temperatura, para generar una curva de fusión.

20 Un método adecuado para controlar la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana en tiempo real se describe, por ejemplo, en el documento US 6.569.627.

25 La invención tiene muchas ventajas. Permite identificar rápidamente las cepas que amenazan la higiene de los hospitales y el seguimiento continuo. Esto es solo parcialmente posible usando métodos bioquímicos. El uso de métodos de biología molecular solos o en combinación con métodos bioquímicos es una notable mejora frente a la técnica anterior.

30 El conocimiento inequívoco y preciso del mecanismo genético hace posible usar el tratamiento correcto, incluyendo la elección óptima de antibióticos (Poirel L *et al.*, *Future Microbiol.* 2007, 2(5), 501-512).

En particular, la PCR en tiempo real se adapta técnicamente de manera excelente a los diagnósticos clínicos rutinarios, porque es fácil de usar y el riesgo de contaminación es bajo (sistema cerrado).

35 En una realización preferida de la invención, no se necesitan sondas marcadas, se prefiere la química SYBR Green o EVA Green.

40 Como se describe en el ejemplo, mediante el uso del nuevo ensayo de detección de alto rendimiento, se identificó un gen de *E. cloacae* que alberga el gen IMI-2. *E. cloacae* con el gen IMI-2 ha sido publicado previamente aparentemente solo una vez, en China.

45 Los métodos bioquímicos se han considerado insuficientes para identificar los mecanismos de resistencia a los carbapenemas (Giske *et al.*, 2009). La presente invención proporciona, en su realización preferida, un método de identificación basado en PCR de multiplexación en tiempo real para la detección de genes de resistencia a los carbapenemas clínicamente significativos (genes de carbapenemasas), en particular, entre *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas* sp.

50 Cada uno de los siguientes párrafos numerados define sucintamente uno o más ejemplos de las variaciones de la divulgación:

1. Un método de detección de genes de carbapenemasas en una muestra biológica, que comprende las etapas:

55 - llevar a cabo una reacción de amplificación en presencia de un molde de ácido nucleico de la muestra biológica y cebadores, teniendo dichos cebadores una longitud de 15 a 50 nucleótidos y teniendo al menos parte o comprendiendo una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO:1-49;

- analizar las curvas de disociación de los productos; y

60 - determinar la presencia de polinucleótidos responsables de los genes de carbapenemasas causantes de resistencia, lo que indica que la muestra biológica comprende genes de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas.

2. El método de acuerdo con el párrafo 1, método que comprende llevar a cabo la amplificación como una reacción en cadena de la polimerasa en presencia de un molde de ácido nucleico de la muestra biológica, enzima polimerasa y tampón de PCR, una mezcla de monómeros de nucleósidos trifosfato y cebadores de PCR.
- 5 3. El método de acuerdo con el párrafo 1 o 2, método que comprende que los productos de la reacción estén secuenciados.
4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 3, método que comprende pares de cebadores seleccionados del grupo que comprende
- 10 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 1 o 49 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 2;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 3 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 4;
- 15 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 5 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 6;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 7 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 8;
- 20 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 9 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 10;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 11 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 12;
- 25 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 13 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 14;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 15 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 16;
- 30 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 17 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 18;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 19 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 20;
- 35 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 21 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 22;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 23 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 24;
- 40 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 25 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 26;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 27 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 28;
- 45 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 29 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 30;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 31 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 32;
- 50 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 33 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 34;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 35 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 36;
- 55 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 37 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 38;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 39 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 40;
- 60 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 41 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 42;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 43 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 44;
- 65 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 45 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 46;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 47 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 48.
5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que la reacción se lleva a cabo mediante PCR en tiempo real, preferentemente basándose en la identificación química de SYBR® Green.
6. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 5, en el que la reacción se lleva a cabo en dos reacciones de multiplexación separadas que tienen condiciones de amplificación comúnmente compatibles.
7. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 6, en el que la primera reacción de

multiplexación es capaz de detectar uno o más genes o familias de genes seleccionados del grupo que comprende:

KPC 1-7, OXA-48, VIM 1-22, GES 1-10 e IMP1-24 en una sola reacción.

- 5 8. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 7, en el que la primera reacción de multiplexación es capaz de detectar uno o más genes o familias de genes seleccionados del grupo que comprende:
KPC 1-7, OXA-48, VIM 1-22, GES 1-10, IMP 1-24, SME 1-3, GIM-1, SPM, IMI 1-3/NMC-A, en una sola reacción.
- 10 9. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 7, en el que la primera reacción de multiplexación es capaz de detectar uno o más genes o familias de genes seleccionados del grupo que comprende:
VIM 1-22, IMP 1-24, OXA-48, KPC 1-7, GES 1-10, SPM, NMC-A, IMI 1-2, SME 1-3, GIM-1 y SIM-1 en una sola reacción.
- 15 10. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 7 a 9, en el que la primera reacción de multiplexación es capaz de detectar al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes en una sola reacción.
- 20 11. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 7 a 10, en el que la primera reacción de multiplexación es capaz de detectar todos los genes, familias de genes y/o subvariantes de genes en una sola reacción.
- 25 12. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 11, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar uno o más genes o familias de genes seleccionados del grupo que comprende:
OXA-24, -25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51, 64-71, 75-78, 83-89, -92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, SFC-1 y CMY-1,-10, -11 en una sola reacción.
- 30 13. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 11, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar uno o más genes o familias de genes seleccionados del grupo que comprende:
grupo de OXA-23, grupo de _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-58 y NDM-1.
- 35 14. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 11, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar uno o más genes o familias de genes seleccionados del grupo que comprende:
grupo OXA-23, grupo _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY-1.-10, SFC-1, NDM-1 y SIM-1.
- 40 15. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 14, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes en una sola reacción.
- 45 16. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 15, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar todos los genes, familias de genes y/o subvariantes de genes en una sola reacción.
- 50 17. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 16, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar al menos uno de cada uno de los genes OXA o familias de genes en una sola reacción, preferentemente, todos los genes OXA, familias de genes y/o subvariantes de genes en una sola reacción.
- 55 18. Un kit que comprende un conjunto de pares de cebadores para identificar genes de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas en bacterias, teniendo dichos cebadores una longitud de 15 a 50 nucleótidos y teniendo al menos parte o comprendiendo una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO:1-49 o una de sus formas modificadas.
- 60 19. El kit de acuerdo con el párrafo 12, kit que comprende un par de cebadores seleccionados del grupo que comprende
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 1 o 49 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 2;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 3 y un segundo cebador oligonucleotídico SEQ ID NO: 4;
un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 5 y un segundo cebador oligonucleotídico
- 65

- SEQ ID NO: 6;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 7 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 8;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 9 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 10;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 11 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 12;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 13 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 14;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 15 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 16;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 17 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 18;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 19 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 20;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 21 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 22;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 23 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 24;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 25 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 26;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 27 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 28;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 29 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 30;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 31 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 32;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 33 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 34;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 35 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 36;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 37 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 38;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 39 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 40;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 41 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 42;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 43 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 44;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 45 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 46;
 un primer cebador oligonucleotídico que comprende SEQ ID NO: 47 y un segundo cebador oligonucleotídico
 SEQ ID NO: 48.
19. El kit de acuerdo con el párrafo 12 o 13, kit que comprende pares de cebadores para identificar uno o más de los genes o familias de genes o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende: KPC 1-7, OXA-48, VIM 1-22, GES 1-10 e IMP1-24 en una sola reacción.
20. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 14, kit que comprende pares de cebadores para identificar uno o más de los genes o familias de genes o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende: KPC 1-7, OXA-48, VIM 1-22, GES 1-10, IMP 1-24, SME 1-3, GIM-1, SPM, IMI 1-3/NMC-A, en una sola reacción.
21. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 14, kit que comprende pares de cebadores para identificar uno o más de los genes o familias de genes o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende: VIM 1-22, IMP 1-24, OXA-48, KPC 1-7, GES 1-10, SPM, NMC-A, IMI 1-2, SME 1-3, GIM-1 y SIM-1 en una sola reacción.
22. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 16, kit que comprende pares de cebadores para una primera reacción de multiplexación capaz de detectar al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes en una sola reacción.
23. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 17, kit que comprende pares de cebadores para una primera reacción de multiplexación capaz de detectar todos los genes, familias de genes y/o subvariantes de genes en una sola reacción.

24. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 18, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar uno o más de los genes o familias de genes o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende:
5 OXA-24, -25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51, 64-71, 75-78, 83-89, -92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, SFC-1 y CMY-1,-10, -11 en una sola reacción.
25. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 18, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar uno o más de los genes o familias de genes o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende:
10 grupo de OXA-23, grupo de _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-58 y NDM-1 en una sola reacción.
26. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 20, en el que la segunda reacción de multiplexación es capaz de detectar uno o más de los genes o familias de genes o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende:
15 grupo de OXA-23, grupo de _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY-1.-10, SFC-1, NDM-1 y SIM-1.
- 20

27. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 21, kit que comprende pares de cebadores para una segunda reacción de multiplexación capaz de detectar al menos uno de cada uno de los genes o familias de genes en una sola reacción.
- 5 28. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 22, kit que comprende pares de cebadores para una segunda reacción de multiplexación capaz de detectar todos los genes, familias de genes y/o subvariantes de genes en una sola reacción.
- 10 29. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 12 a 23, kit que comprende pares de cebadores para una segunda reacción de multiplexación capaz de detectar al menos uno de cada uno de los genes OXA o familias de genes en una sola reacción, preferentemente, todos los genes OXA, familias de genes y/o subvariantes de genes en una sola reacción.
- 15 30. Un cebador oligonucleotídico para identificar genes resistentes a los carbapenemas, en el que el oligonucleótido tiene al menos parte o comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 1-49 o una de sus formas modificadas.
31. Un oligonucleótido seleccionado del grupo que comprende SEQ ID NO: 1-49.
- 20 32. Una disposición para la identificación de genes de carbapenemasas, que comprende una primera y una segunda reacción de multiplexación, en la que, en la primera reacción de multiplexación, se detectan uno o más o todos los genes o familias de genes y/o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende KPC 1-7, OXA-48, SME 1-3, GIM-1, VIM 1-22, SPM, GES 1-10, IMP 1-24, NMC-A/ IMI 1-2 y SIM-1; o KPC 1-7, OXA-48, SME, GIM-1, VIM 1-22, SPM, GES 1-10, IMP 1-24 e IMI 1-3/NMC-A; y
- 25 en la segunda reacción de multiplexación, se detectan uno o más o todos los genes o familias de genes y/o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende OXA-24, -25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51, 64-71, 75-78, 83-89,-92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62; o seleccionados del grupo que comprende
- 30 grupo OXA-23, grupo _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, NDM-1 y SIM-1.
33. La disposición de acuerdo con el párrafo 27, en la que, en la segunda reacción de multiplexación, se detectan además uno o más o todos los genes, o familias o subvariantes de genes de SFC-1, CMY-1.-10, -11.
- 35 34. Un método de detección de genes de carbapenemasas en una muestra biológica, que comprende las etapas:
- llevar a cabo una reacción de amplificación en presencia de un molde de ácido nucleico de la muestra biológica y cebadores, teniendo dichos cebadores una longitud de 15 a 50 nucleótidos y teniendo al menos parte o comprendiendo una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 15 y 16, 1, 49, 2, 9, 10, 13, 14, 19, 20, 21, 22, o secuencias modificadas de dichas secuencias;
 - analizar las curvas de disociación de los productos; y
 - determinar la presencia de los genes KPC, OXA-48, VIM, GES e/o IMP o sus subvariantes responsables de la resistencia a los carbapenemas, lo que indica que la muestra biológica comprende genes de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas en bacterias.
- 45 35. El método de acuerdo con el párrafo 34, en el que dicha secuencia de cebador es capaz de detectar la secuencia polinucleotídica diana, el gen de carbapenemasa.
- 50 36. El método de acuerdo con el párrafo 34 o 35, método que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 17 y 18, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de los genes SME, GIM-1, SIM-1, SPM, NMC-A e/o IMI o sus subvariantes.
- 55 37. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 34 a 36, método que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 11, 12, 17 y 18, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de los genes SME, GIM-1, SPM e/o IMI /NMC-A.
- 60 38. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 34 a 37, método que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,32, 33 y 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de uno o más de los genes OXA -24, 25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51,64-71,75-78, 83, 84, 86-89, -
- 65 92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, SFC-1 y/o CMY-1-10, o sus subvariantes.

39. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 34 a 38, método que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 25, 26, 43, 44, 45, 46, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 47 y 48, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de uno o más de los genes del grupo de OXA-23, grupo de _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY-1.-10, SFC-1, NDM-1 y/o SIM-1, o sus subvariantes.

40. El método de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 34 a 39, en el que la reacción se lleva a cabo en dos reacciones de multiplexación separadas que tienen condiciones de amplificación comúnmente compatibles.

41. Un kit que comprende un conjunto de pares de cebadores para identificar genes de carbapenemasas, teniendo dichos cebadores una longitud de 15 a 50 nucleótidos y teniendo al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 15, 16, 1 o 49, 2, 9, 10, 13, 14, 19, 20, 21 y 22, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de los genes KPC, OXA-48, VIM, GES e/o IMP o sus subvariantes.

42. El kit de acuerdo con el párrafo 41, kit que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 17 y 18, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de los genes SME, GIM-1, SIM-1, SPM, NMC-A e/o IMI o sus subvariantes.

43. El kit de acuerdo con el párrafo 41 o 42, kit que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende 3, 4, 5, 6, 11, 12, 17 y 18, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de los genes SME, GIM-1, SPM e/o IMI 1-3/NMC-A.

44. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 41 a 43, kit que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,32, 33 y 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de genes OXA -24, 25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51, 64-71, 75-78, 83, 84, 86-89, -92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, SFC-1 y/o CMY-1-10, o sus subvariantes.

45. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 41 a 44, kit que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo 25, 26, 43, 44, 45, 46, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 47 y 48, o una de sus formas modificadas para determinar la presencia de uno o más de los genes del grupo de OXA-23, grupo de _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY-1.-10, SFC-1, NDM-1 y SIM-1, o sus subvariantes.

46. Un oligonucleótido para la identificación de genes de carbapenemasas, oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 15, 16, 1, 49, 2, 9, 10, 13, 14, 19, 20, 21 y 22.

47. Una disposición para la identificación de genes de carbapenemasas, que comprende una primera y una segunda reacción de multiplexación, en la que, en la primera reacción de multiplexación, se detecta uno o más o todos los genes, familias de genes y/o subvariantes de genes de KPC, OXA-48, VIM, GES e/o IMP en una sola reacción; llevándose a cabo dicha detección con el uso de cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 15, 16, 1, 2, 9, 10, 13, 14, 19, 20, 21 y 22, o una de sus formas modificadas.

48. La disposición de acuerdo con el párrafo 47, en la que, en la segunda reacción de multiplexación, se detecta uno o más o todos los genes, familias de genes y/o subvariantes del grupo OXA-23, grupo _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-58 y/o NDM-1, en una sola reacción, llevándose a cabo dicha detección con el uso de cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen al menos parte o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 24, 25, 43, 44, 45, 46, 47, 33, 34 y 48, o una de sus formas modificadas.

Bibliografía

1. Queenan A. M., Bush K. "Carbapenemasas: the Versatile β -Lactamases", *Clinical Microbiology Reviews*, 2007 20(3), 440-458.
2. Poirrel L, Pitout J. D., Nordman P. "Carbapenemasas: molecular diversity and consequences", *Future Microbiol.* 2007 2(5), 501-512.
3. Giske C. G., "Redefining extended-spectrum {beta}-lactamases: balancing science and clinical need". *J Antimicrob Chemother.* 2009 63(1),1-4. Epub 2008 Oct 28.

Ejemplos

Métodos

- 5 El diseño del ensayo de PCR en tiempo real se dividió en dos reacciones de multiplexación. La primera multiplexación se diseñó para detectar los genes VIM 1-22, IMP 1-24, OXA-48, KPC 1-7, GES 1-10, SPM, NMC-A, IMI 1-2, SME 1-3, GIM-1 y SIM-1. La otra multiplexación se diseñó para los genes OXA con propiedades de carbapenemasas solamente, incluyendo OXA-24, -25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51, 64-71, 75-78, 83-89, -92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60 y OXA-62. Se escogió la química de SYBR Green para permitir la
- 10 detección de numerosos genes en una sola reacción. Se usó un análisis de la curva de fusión para identificar preliminarmente el supuesto mecanismo molecular de las muestras positivas, que se confirmaron con secuenciación con cebadores de referencia. Este ensayo se usó para detectar sistemáticamente las supuestas cepas de ESBL. Por otra parte, el ensayo de detección forma parte de los diagnósticos rutinarios para detectar supuestas especies de *Enterobacteriaceae* con susceptibilidad reducida (diámetro del disco de meropenem < 23 mm) o CIM reducida (I/R) a meropenem, imipenem o ertapenem de acuerdo con las normas NLSI.
- 15

Resultados

- 20 Se seleccionaron sistemáticamente más de 250 supuestas cepas de ESBL para evaluar la frecuencia de cepas productoras de carbapenemasas, pero estas no se detectaron. Por el contrario, se aisló una cepa de *Enterobacter cloacae* altamente resistente a los carbapenemas que albergaba el gen IMI-2 de un paciente de una unidad de cuidados intensivos. La cepa positiva en IMI-2 resultó ser altamente resistente a meropenem (CIM > 32), a imipenem (CIM > 32) y a ertapenem (CIM > 256), pero, sin embargo, curiosamente, no resultó ser resistente a las cefalosporinas de tercera generación ni a trimetoprim/sulfa. Además, el ensayo se ha usado con éxito para identificar
- 25 más de treinta aislados clínicos de *Acinetobacter* que albergan el grupo OXA-23 y/o el grupo OXA-51, o carbapenemasas de VIM-2.

Ejemplo 2

- 30 Se repitieron los métodos como los descritos en el Ejemplo 1 para detectar, en la primera reacción de multiplexación, OXA-48, SME, GIM-1, VIM, SPM, GES, KPC, IMI 1-3/NMC-A, IMP-10, IMP-11, y, en la segunda reacción de multiplexación, el grupo de OXA-23, grupo de OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY-1.-10, SFC-1, NDM-1 y SIM-1.

- 35 En estos experimentos, se encontraron cuatro cepas de *Klebsiella pneumoniae* con el gen KPC, una cepa de *E. coli* con OXA-48, tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con GES y seis cepas de *Pseudomonas aeruginosa/putida* con el gen IMP.

- 40 También se encontraron más de cincuenta cepas del complejo de *Acinetobacter baumannii* con diferentes combinaciones de genes OXA-23, OXA-24, OXA-58.

Listado de secuencias

- 45 <110> Licentia Oy
- <120> Un método y un kit de detección de bacterias resistentes a antibióticos
- <130> BP202517
- 50 <160> 49
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 55 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 60 <223> Cebador
- <400> 1
- ttactgaaca taaatcacag g 21
- 65 <210> 2
- <211> 30

ES 2 711 534 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 2
 attattgga aatccttgct gcttattctc 30

10 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

<400> 3
 20 cagatgagcg gttcccttta tgc 23

<210> 4
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador

<400> 4
 30 cagaagccat atcaccta atgcataacc 28

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

<400> 5
 40 cgaatgggtt ggtagtctg gataataatc 30

<210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 6
 50 atgtgtatgt aggaattgac tttgaattta gc 32

<210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador

<400> 7
 60 ctgctgggat agagtggtt aatac 25

65 <210> 8
 <211> 25

ES 2 711 534 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 8
 tcaatagtgga tgcgtctccg atttc 25

 10 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 9
 20 gtgtttggtc gcatatcgca ac 22

 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 10
 30 gctgtatcaa tcaaaagcaa ctcac 26

 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> cebador

 <400> 11
 40 cctacaatct aacggcgacc aag 23

 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 12
 aacggcgaag agacaatgac aac 23

 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> cebador
 60
 <400> 13
 acacctggcg acctcagaga tac 23

 <210> 14
 <211> 26
 65

ES 2 711 534 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 14
 acttgaccga cagaggcaac taattc 26

 10 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 15
 20 cagcggcagc agttgtga ttg 23

 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 16
 30 ccagacgacg gcatagtcattg 23

 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 17
 40 aaacaagga atgggtggag actg 24

 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 18
 aaggatgct ttgaattgc gttgaac 27

 <210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 60
 <400> 19
 aataatgacg cctatctaat tgacactcc 29

 <210> 20
 <211> 23
 65

ES 2 711 534 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 20
 attccacccg tactgtcgct atg 23

 10 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 21
 20 tgacgcctat ctgattgaca ctcc 24

 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 22
 30 gctgtcgcta tggaaatgtg agg 23

 <210> 23
 <211> 28
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 23
 40 ccagtacaag aagttaattt tgccgatg 28

 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 24
 cccaaccagt caaccaacct acc 23

 <210> 25
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 60
 <400> 25
 atattttact tgctatgtgg ttgcttctc 29

 <210> 26
 <211> 23
 65

ES 2 711 534 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 26
 tctccaatcc gatcagggca ttc 23

10 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

20 <400> 27
 agtgcccttc tctgcttcc c 21

25 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 28
 cctcgtcggc ggatctaacc 20

35 <210> 29
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <400> 29
 aatttatta acgaagcaca cactacgg 28

45 <210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

<400> 30
 gcacgagcaa gatcattacc atagc 25

55 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador

<400> 31
 tgtgctgtgt tatctgac 18

65 <210> 32
 <211> 20

ES 2 711 534 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 32
 gtgttctgg actctttac 20

 10 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 33
 20 gacaattaca cctatacaag aag 23

 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 34
 30 cgctctacat acaacatctc 20

 <210> 35
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 40 <400> 35
 ttcgacgttc aagattcc 18

 <210> 36
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 50 <400> 36
 ttcgaaagcg gaaatctc 18

 <210> 37
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 60 <400> 37
 tgtcatgcct gccctgctat c 21

 65 <210> 38
 <211> 20

ES 2 711 534 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 38
 acgaagtcca cctgctcacg 20

10 <210> 39
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

<400> 39
 cagggtcctt tcaacaag 18

20 <210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador

<400> 40
 cgccctcttt ctttcaac 18

30 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

<400> 41
 cctggtgatg atagagatac 20

40 <210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Cebador artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 42
 ataatcgttg gctgtacc 18

50 <210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador

<400> 43
 actttaggtg aggcaatg 18

60 <210> 44
 <211> 21

ES 2 711 534 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 44
 taacttcttg tactgggta a 21

 10 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 45
 20 gtcatagtat tcgctgtag a 21

 <210> 46
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 46
 30 gtaagagtgc ttaatgttc ata 23

 <210> 47
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 47
 40 cgatcaaacc gttggaag 18

 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 48
 aaggaaaact tgatggaatt g 21

 <210> 49
 55 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> cebador

 <400> 49
 ttactgaaca taaatcacag ggcgtag 27

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de genes de carbapenemasas en una muestra biológica, que comprende las etapas:

- 5 - llevar a cabo una reacción de amplificación de multiplexación en presencia de un molde de ácido nucleico de la muestra biológica y cebadores, teniendo dichos cebadores una longitud de 15 a 50 nucleótidos y teniendo o comprendiendo una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 15 y 16, SEQ ID NO: 1 o 49 y 2, SEQ ID NO: 9 y 10, SEQ ID NO: 13 y 14, SEQ ID NO: 19 y 20, y SEQ ID NO: 21 y 22;
- 10 - analizar las curvas de disociación de los productos; y
- determinar, en una reacción, la presencia de más de uno de los genes KPC, OXA-48, VIM, GES e/o IMP, o sus subvariantes, responsables de la resistencia a los carbapenemas, lo que indica que la muestra biológica comprende genes de carbapenemasas causantes de resistencia a los carbapenemas en bacterias.

15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, método que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 17 y 18, para determinar la presencia de uno o más de los genes SME, GIM-1, SIM-1, SPM e/o IMI/NMC-A, o sus subvariantes.

20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, método que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 11, 12, 17 y 18, para determinar la presencia de uno o más de entre SME, GIM-1, SPM e/o IMI/NMC-A.

25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, método que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42, para determinar la presencia de uno o más de entre los genes OXA -24, 25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51, 64-71, 75-78, 83, 84, 86-89, -92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, SFC-1 y/o CMY- 1 -10,-11, o sus subvariantes.

30 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, método que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 25, 26, 43, 44, 45, 46, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 47 y 48, para determinar la presencia de uno o más de entre los genes del grupo de OXA-23, grupo de OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY-1.-10, -11, SFC-1, NDM-1 y/o SIM-1, o sus subvariantes.

35 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la reacción se lleva a cabo en dos o más reacciones de multiplexación separadas que tienen condiciones de amplificación comúnmente compatibles.

40 7. Un kit que comprende un conjunto de pares de cebadores para la identificación, en una reacción de multiplexación, de más de un gen de carbapenemasas causante de resistencia a los carbapenemas en bacterias, teniendo dichos cebadores una longitud de 15 a 50 nucleótidos y teniendo o comprendiendo una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 15 y 16, SEQ ID NO: 1 o 49 y 2, SEQ ID NO: 9 y 10, SEQ ID NO: 13 y 14, SEQ ID NO: 19 y 20, y SEQ ID NO: 21 y 22, para determinar la presencia de uno o más de entre los genes KPC, OXA-48, VIM, GES e/o IMP, o sus subvariantes.

45 8. El kit de acuerdo con la reivindicación 7, kit que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 17 y 18, para determinar la presencia de uno o más de entre los genes SME, GIM-1, SIM-1, SPM, IMI/NMC-A o sus subvariantes.

50 9. El kit de acuerdo con la reivindicación 7, kit que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 11, 12, 17 y 18, para determinar la presencia de uno o más de entre los genes SME, GIM-1, SPM e/o IMI/NMC-A o sus subvariantes.

55 10. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, kit que comprende además cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42, para determinar la presencia de uno o más de entre los genes OXA -24, 25, 26, -40, -72, OXA-23, -27, OXA-50, OXA-51, 64-71, 75-78, 83, 84, 86-89, -92, -94, -95, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, SFC-1 y/o CMY- 1 -10,-11, o sus subvariantes.

60 11. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, kit que comprende además cebadores que

tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo 25, 26, 43, 44, 45, 46, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 47 y 48, para determinar la presencia de uno o más de entre los genes del grupo de OXA-23, grupo de OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, CMY-1.-10, -11, SFC-1, NDM-1 y/o SIM-1, o sus subvariantes.

- 5
12. Un método para la identificación, en una reacción, de más de un gen de carbapenemasas causante de resistencia a los carbapenemas en bacterias, que comprende una primera y una segunda reacción de multiplexación, en el que, en la primera reacción de multiplexación, se detecta más de uno o todos los genes, familias de genes y/o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende KPC, OXA-48, VIM, GES e/o
- 10 IMP en una sola reacción; llevándose a cabo dicha detección con el uso de cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden un par de cebadores seleccionados del grupo que comprende las SEQ ID NO: 15 y 16; SEQ ID NO: 1 o 49 y 2; SEQ ID NO: 9 y 10; SEQ ID NO: 13 y 14; SEQ ID NO: 19 y 20; y SEQ ID NO: 21 y 22.
- 15
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que, en la reacción de multiplexación, se detecta además uno o más o todos los genes, familias de genes y/o subvariantes seleccionados del grupo que comprende SME, GIM-1, SPM e/o IMI/NMC-A, en una sola reacción, llevándose a cabo dicha detección con el uso de cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden un par de cebadores seleccionados del
- 20 grupo que comprende las SEQ ID NO: 3 y 4, SEQ ID NO: 5 y 6, SEQ ID NO: 11 y 12; y SEQ ID NO: 17 y 18.
- 25
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que, en la segunda reacción de multiplexación, se detecta uno o más o todos los genes, familias de genes y/o subvariantes de genes seleccionados del grupo que comprende el grupo de OXA-23 y el grupo de _OXA-24, grupo de OXA-51 con promotor ISabal, NDM-1, OXA-58, CMY, SFC-1 y/o SIM-1 en una sola reacción, llevándose a cabo dicha detección con el uso de cebadores que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos y que tienen o que comprenden un par de cebadores seleccionados del grupo que comprende las SEQ ID NO: 23 y 24, SEQ ID NO: 25 y 26, SEQ ID NO: 43 y 44, SEQ ID NO: 45 y 46, SEQ ID NO: 47 y 48, SEQ ID NO: 33 y 34, SEQ ID NO: 39 y 40, SEQ ID NO: 41 y 42, y SEQ ID NO: 7 y 8.

Diagramas de amplificación

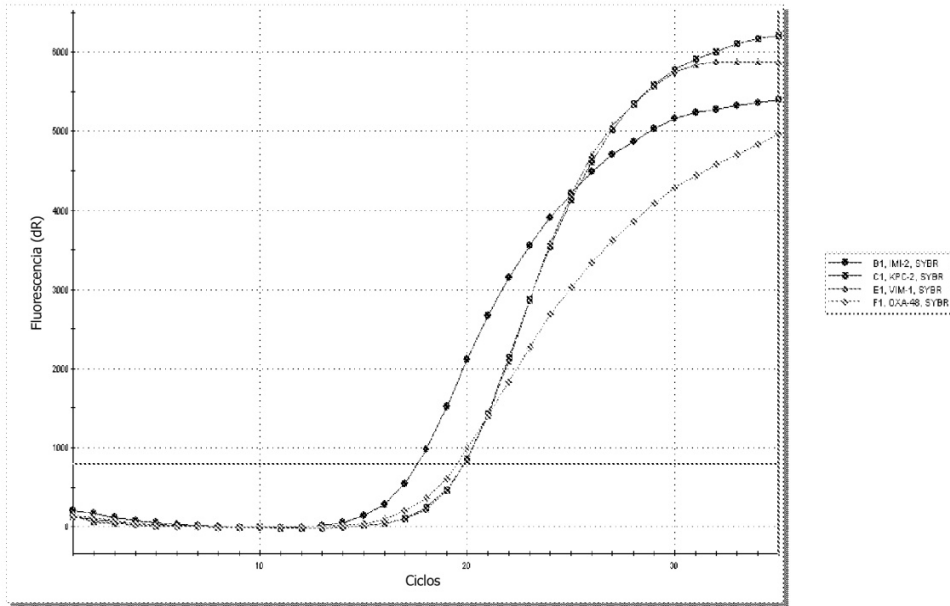


Fig. 1

Curva de disociación

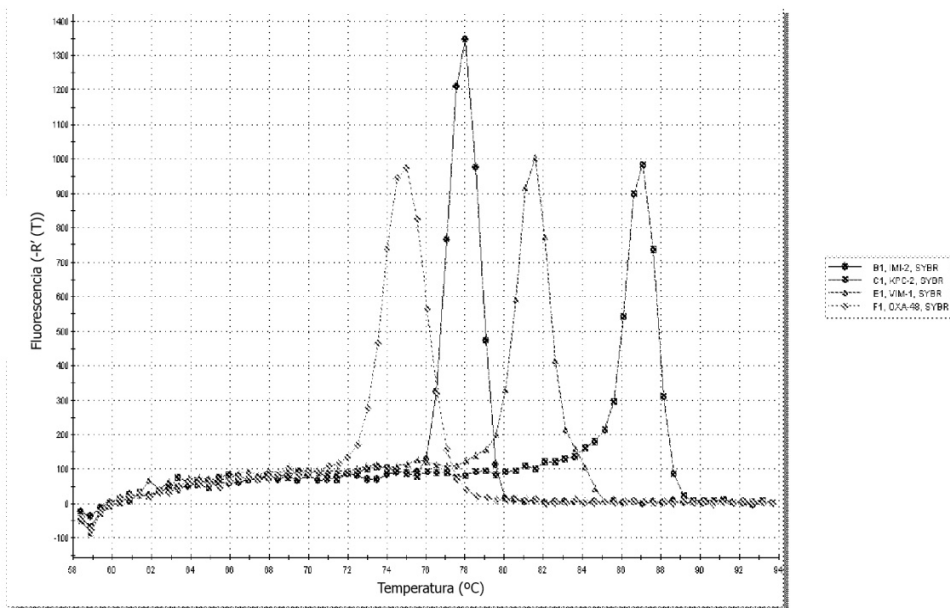


Fig. 2