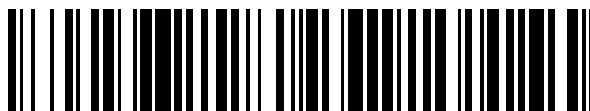


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 458**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 16153038 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3031928**

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

30 Prioridad:

**01.03.2010 FR 1051441**

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

**21.07.2020**

73 Titular/es:

**BIO-RAD EUROPE GMBH (100.0%)  
Holbeinstrasse 75  
4051 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DALLENNE, CAROLINE y  
FAVIER, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

**ES 2 774 458 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento rápido de detección de enzimas y de microorganismos

5 **[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos rápidos de detección de enzimas y de microorganismos.

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

10

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

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

15

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

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

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

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

20

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

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

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

**[0005]** Se usan diferentes técnicas para identificar con precisión estos microorganismos y sus posibles fenotipos de resistencia, pero los resultados solo se obtienen generalmente al cabo de un periodo relativamente largo.

**[0006]** Se han realizado así tomas de muestras en medio con sangre fresca y medio con sangre calentada, a los que pueden añadirse otros medios en función de los resultados de los estudios microscópicos.

55 **[0007]** Para cada matraz positivo, se procede a:

- la determinación de la morfología de las colonias,

- las pruebas de oxidasa y catalasa,

- una identificación bioquímica y antigénica para identificar el microorganismo,

60

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

**[0008]** Se ha mostrado que era posible efectuar un antibiograma directamente a partir de un hemocultivo positivo realizando un inóculo equivalente a 0,5 McF a partir del caldo de hemocultivo. Se inocula una gelosa Mueller-Hinton por técnica "de inundación". En el 95% de los casos se encontrará la correlación con el antibiograma normalizado. El resultado aparece así, como pronto, 16 h después de la revelación del hemocultivo positivo (Antibiotics

In Laboratory Medicine, Victor Lorian, M.D. Editor, 5ª edición; Doern y col., 1981, Antimicrob Agents Chemother. 20(5): 696-698. Antimicrobial Agents).

5 **[0009]** Existe así una necesidad importante de nuevos procedimientos más rápidos de detección de microorganismos, y/o de sus posibles resistencias asociadas, en una muestra biológica, debiendo estos procedimientos conservar una sensibilidad y una especificidad satisfactorias.

10 **[0010]** Las  $\beta$ -lactaminas representan la familia de antibióticos más importante debido al gran número de moléculas de las que forman parte y a sus propiedades farmacológicas y de espectros asociados que permiten combatir la mayor parte de las especies bacterianas. Las  $\beta$ -lactaminas son con razón los antibióticos más prescritos en medicina general. Su espectro de actividad es variable en función de su clase (penicilinas o cefalosporinas) y a veces en función de las moléculas en cada clase. Así, las penicilinas G y V son bastante activas en los cocos grampositivos y las bacterias anaerobias, mientras que el espectro de las aminopenicilinas se extiende a algunos bacilos gramnegativos. La adición de un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas permite además observar una actividad en ciertas bacterias que producen estas  $\beta$ -lactamasas. Las cefalosporinas extienden aún más el espectro de actividad hacia los bacilos gramnegativos, pero son algo menos activas en los cocos grampositivos.

20 **[0011]** Entre las  $\beta$ -lactaminas, las cefalosporinas representan la categoría de antibióticos prescrita más a menudo. El uso habitual de las cefalosporinas ha conllevado la difusión de cepas resistentes frente a estas moléculas. Estas cepas llegan especialmente a sobrevivir a la presión de selección de las cefalosporinas con una actividad  $\beta$ -lactamasa. La detección de resistencias combinadas frente a las cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación (C3G) en las enterobacterias adquiere una importancia terapéutica de primer orden. De hecho, la resistencia de las enterobacterias a los antibióticos conoce una evolución mundial preocupante con un impacto creciente de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que se difunden principalmente en el sector comunitario. En 2002, menos del 1% de las cepas de enterobacterias tenían una BLEE. En 2006, representaban del 1 al 5% de las cepas.

30 **[0012]** La resistencia a las C3G, con independencia de que se deba a las BLEE o a otras  $\beta$ -lactamasas (cefalosporinasa o carbapenemasa), está así en aumento y se ha convertido en significativa, sobre todo para *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La emergencia de estas enzimas se ha referido recientemente en los bacilos gramnegativos no fermentadores como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Por tanto, cada vez es más importante poder detectar estas BLEE.

40 **[0013]** La detección de las BLEE en las enterobacterias es sencilla de implementar en la mayor parte de los casos: se objetiva por una sinergia entre la mezcla [amoxicilina + ácido clavulánico (AMC)] y una C3G (la ceftazidima es la más sensible) o aztreonam. No obstante, la obtención de un resultado requiere mucho tiempo. La prueba de sinergia se realiza disponiendo los discos de AMC y de la C3G elegida (o aztreonam) a 30 mm de distancia, centro con centro. Por el contrario, la detección de las BLEE es más difícil en las cepas hiperproductoras también de cefalosporinasa (AmpC) como *Enterobacter*. En este último caso, es más fácil visualizar la sinergia entre AMC y cefepima o ceftiproma. Finalmente, en ciertas especies tales como *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* y *Providencia rettgeri*, las BLEE se expresan débilmente y por tanto son todavía más difíciles de detectar. En estos casos, la prueba de sinergia se optimiza colocando los discos a una distancia de 40-45 mm, en lugar de 30 mm, según las recomendaciones del CA-SFM (Comité del antibiograma de la Société Française de Microbiologie) en 2007. Los autómatas de bacteriología para identificación y antibiograma se usan cada vez más (Mini-Api® comercializado por bioMérieux Clinical Diagnostics, Phoenix® comercializado por BD Diagnostics, MicroScan® comercializado por Siemens, Vitek®, Vitek-2® y Vitek Compact® comercializado por bioMérieux). De una forma general, estos autómatas detectan relativamente bien las BLEE en las cepas que normalmente no hiperproducen cefalosporinas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxitoca*). Para las demás especies (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, etc.), su sensibilidad y sobre todo su especificidad son un poco menos buenas que las de los procedimientos manuales. En tal caso se demuestra necesario realizar pruebas complementarias.

50 **[0014]** La detección de cepas resistentes a las C3G puede simplificarse así para ciertas resistencias relacionadas con determinadas especies, pero, de una forma general, no hay ningún procedimiento que posea el 100% de sensibilidad ni que permita obtener un resultado rápido.

55 **[0015]** Se han propuesto numerosas mejoras para acelerar el procedimiento de detección e identificación de los microorganismos presentes en particular en los hemocultivos. En primer lugar, las mejoras de los medios de cultivo y de las técnicas de crecimiento han reducido los tiempos de cultivo. La última generación de autómatas puede detectar incluso un bajo crecimiento bacteriano. Independientemente de las técnicas clásicas, cuando el crecimiento es detectado por el autómata, es posible igualmente efectuar una identificación directa de las bacterias por biología molecular (amplificación y secuenciación, FISH, chips de ADN o sondas específicas, ...). No obstante, la mayor parte de estos sistemas no suelen ser abiertos y permiten solo la detección de un único microorganismo o de un bajo número de microorganismos específicos. Además, no pueden suministrar información sobre la susceptibilidad o la resistencia supuesta frente a un antibiótico. Por otra parte, estos procedimientos son eficaces pero caros y/o exigen cualificaciones elevadas de los técnicos de laboratorio.

65

- [0016]** Se han descrito intentos de acelerar la detección más específica de los microorganismos resistentes a una familia de antibióticos. Así, Weinbren y Borthwick (Weinbren y Borthwick, 2005, J. Antimicrob. Chemother. 55:131-132) han descrito un procedimiento de detección no cromogénica de microorganismos que producen BLEE, en un hemocultivo, donde se tomó una muestra del hemocultivo y se aplicó en un medio de gelosa, para a continuación aplicar discos de cefpodoxima y cefpodoxima-clavulanato en el medio. No obstante, esta etapa de cultivo en medio de gelosa necesita una espera suplementaria mínima de 3,5 h a 6 h antes de poder obtener un primer resultado después del fin del tratamiento en hemocultivo.
- [0017]** Navon-Venezia y col. (Navon-Venezia y col., 2005, J. Clin. Microb. 43:439-441) han descrito un procedimiento de detección de bacterias que producen BLEE a partir de hemocultivos positivos que consiste en tomar una muestra del caldo de hemocultivo y sembrarla directamente en un medio Mueller-Hinton que contiene discos de cefpodoxima y cefpodoxima + clavulanato, sin pasar por una etapa de aislamiento en medio de gelosa. En este procedimiento no interviene ningún agente cromogénico, que necesita una etapa de cultivo de 16 h a 18 h según las recomendaciones preconizadas en el referente estadounidense CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee on Clinical Laboratory Standards).
- [0018]** Chapin y Musgnug (2003) (Chapin y Musgnug, 2003, J. Clin Microb. 41:4751-4754) han descrito un procedimiento directo de prueba de la sensibilidad a antimicrobianos a partir de hemocultivos positivos, que consiste en centrifugar 10 ml del hemocultivo inoculado en un tubo separador de suero que contenía un gel. Los microorganismos que quedan en la superficie del gel son recuperados a continuación y puestos en suspensión con el fin de inocular microplacas que comprenden diferentes diluciones de antibióticos específicos. Sin embargo, el resultado solo se obtiene de 18 a 24 h después de la inoculación.
- [0019]** Chen y col. (2008) (Chen y col., 2008, J. Microbiol. Immunol. Infect. 41:259-264) han descrito un procedimiento de identificación de sensibilidad de microorganismos a un grupo de antibióticos a partir de hemocultivos positivos, consistente en tomar un hemocultivo positivo, eliminar los hematíes por lisis y centrifugación, poner en suspensión el depósito bacteriano en una solución salina y probarlo en sistema Vitek-2® o AST (antimicrobial susceptibility testing). No obstante, es necesario esperar entre 2h30 y 16h15 después de la carga en el sistema Vitek-2® o AST antes de poder observar los primeros resultados.
- [0020]** El equipo de Jain y col. (Jain y col., 2007, J. Antimicrob. Chemother. 60:652-654) ha descrito igualmente un procedimiento relativamente rápido de detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por tinción a partir de sobrenadante de caldo de hemocultivo después de centrifugación. Debido a los problemas de hemólisis que interfieren con el cambio de color del agente cromogénico, los autores han propuesto efectuar previamente en la prueba un subcultivo en un medio nuevo, prolongando así la duración del procedimiento.
- [0021]** Estas técnicas que detectan los microorganismos resistentes después de una etapa de subcultivo siguen siendo así relativamente largas.
- [0022]** Lupetti y col. (2010) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 29:89-95 describen una prueba de identificación y de determinación de perfiles de sensibilidad a los antibióticos de bacterias grampositivas, directamente a partir de muestras de hemocultivos.
- [0023]** Lupetti y col. (2009) Clin. Microbiol. Infect. 16:986-991 describen un procedimiento de identificación y de detección de sensibilidad a los antibióticos de bacterias grampositivas que provienen de hemocultivos.
- [0024]** La solicitud internacional WO 2009/051838 describe además un procedimiento de detección de  $\beta$ -lactamasas que comprende etapas de puesta en contacto de una muestra biológica con un sustrato cromóforo que puede ser el compuesto HMRZ-86, y diferentes inhibidores, que permiten así la discriminación de las diferentes  $\beta$ -lactamasas.
- [0025]** Los autores de la invención han puesto a punto un procedimiento de detección más rápido, que permite detectar fenotipos de resistencias precisas tales como las conferidas a las bacterias gramnegativas frente a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, directamente a partir de la muestra clínica, o después de una etapa de subcultivo, pero sin pasar por una etapa de selección de aislado en medio de gelosa, y usando un sustrato cromogénico o fluorogénico.
- [0026]** La presente solicitud describe un procedimiento de detección *in vitro* de una enzima de un microorganismo a partir de una muestra biológica que comprende las etapas que consisten en:
- a1) concentrar los microorganismos presentes en la muestra biológica, opcionalmente después de una etapa a0) de cultivo de los microorganismos;
  - b1) poner en suspensión los microorganismos concentrados en la etapa a1) en una solución que comprende al menos un sustrato cromogénico o fluorogénico susceptible de liberar un cromóforo o un fluoróforo después de hidrólisis por la enzima que se va a detectar;

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

siendo la liberación del cromóforo o fluoróforo detectada en la etapa c1) indicativa de la presencia de la enzima que se va a detectar.

5 **[0027]** La presente invención se refiere a un procedimiento de detección *in vitro* de una enzima de un microorganismo a partir de una muestra biológica, estando la enzima que se va a detectar seleccionada entre el grupo constituido por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- 10 a1) concentrar los microorganismos presentes en la muestra biológica, opcionalmente después de una etapa a0) de cultivo de los microorganismos;  
 b1) poner en suspensión los microorganismos concentrados en la etapa a1) en una solución que comprende al menos un sustrato cromogénico o fluorogénico susceptible de liberar un cromóforo o un fluoróforo después de hidrólisis por la enzima que se va a detectar, siendo dicho sustrato cromogénico o fluorogénico un sustrato o  
 15 derivado de sustrato de una enzima elegida en el grupo constituido por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas;  
 c1) detectar la posible liberación del cromóforo o fluoróforo obtenida en la etapa b1);

siendo la liberación del cromóforo o fluoróforo detectada en la etapa c1) indicativa de la presencia de la enzima que se va a detectar;

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

- 25 - una etapa de lisis de los hematíes presentes en la muestra biológica antes de la etapa b1) de puesta en suspensión o antes de la etapa a1) de concentración y/o  
 - una etapa a') de preparación de la muestra biológica antes de la etapa a1), comprendiendo esta etapa a):

- 30 (i) la aglutinación de los hematíes, y  
 (ii) la separación de los hematíes aglutinados de los microorganismos presentes en la muestra.

**[0028]** La presente solicitud describe igualmente un procedimiento de preparación *in vitro* de una muestra de hemocultivo que contiene microorganismos, que comprende las etapas que consisten en:

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

40 **[0029]** La presente solicitud describe además un procedimiento de detección *in vitro* de microorganismos a partir de una muestra biológica que implementa el procedimiento de detección de enzimas mostrado anteriormente.

#### Descripción detallada de la invención

45 **[0030]** En el contexto de la invención, una "muestra biológica" hace referencia a una sustancia de origen biológico. Preferentemente, la muestra biológica es una muestra de un fluido biológico. Los ejemplos de muestras biológicas comprenden, pero no se limitan a, la sangre y sus componentes, la orina, las heces, el líquido cefalorraquídeo u otros líquidos de punción. Preferentemente, la muestra biológica según la invención se selecciona  
 50 entre el grupo constituido por una muestra de sangre y una muestra de orina.

#### *Enzimas*

55 **[0031]** En el contexto de la invención, la expresión "enzima de un microorganismo" hace referencia a una macromolécula de naturaleza proteica expresada por un microorganismo, y que se caracteriza por su actividad catalítica que rige las reacciones bioquímicas específicas dentro del microorganismo o en el exterior del microorganismo cuando esta enzima es secretada por el microorganismo.

60 **[0032]** Preferentemente, la enzima descrita aquí se selecciona entre el grupo constituido por glucosidasas, esterases, fosfatasas,  $\beta$ -lactamasas, en particular penicilinasas, cefalosporinasas, carbenicilinasas, oxacilinasas, carbapenemasas, metalo- $\beta$ -lactamasas y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. De forma más preferida, la enzima descrita aquí se selecciona entre el grupo constituido por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas, carbapenemasas, glucosidasas y esterases. La enzima según la invención se selecciona entre el grupo constituido por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas. Preferentemente, la enzima es una  
 65 enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación.

**[0033]** Por "glucosidasa" u "osidasa", se entiende aquí una enzima del grupo de las hidrolasas que actúa sobre la unión glucosídica de los oligósidos y los glucósidos. Como es bien conocido para el experto en la materia, la especificidad de una glucosidasa es función de la naturaleza del azúcar ligado por unión glucosídica. En la nomenclatura de las enzimas, las glucosidasas pertenecen a la clase 3 (correspondiente a las hidrolasas), subclase 2 (código EC3.2). Las glucosidasas comprenden en particular glucosidasas, xilanasas, galactosidasas, lactasas, amilasas, quitinasas, fructosidasas, maltasas, neuraminidasas, invertasas, hialuronidasas y lisozimas. Más en particular, las glucosidasas se seleccionan entre el grupo constituido por N-acetil-e-galactosaminidasa, N-acetil-p-glucosaminidasa,  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -arabinosidasa,  $\beta$ -celobiosidasa,  $\beta$ -quitobiosidasa,  $\alpha$ -fucosidasa,  $\beta$ -fucosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\alpha$ -maltosidasa,  $\beta$ -maltosidasa,  $\alpha$ -mannosidasa,  $\beta$ -mannosidasa y  $\beta$ -xilosidasa.

**[0034]** Por "esterasa", se entiende aquí una enzima del grupo de las hidrolasas que escinde los ésteres de ácido y alcohol. Como es bien conocido para el experto en la materia, las esterases difieren según su especificidad al sustrato, su estructura proteica y su función biológica. En la nomenclatura de las enzimas, las esterases pertenecen a la clase 3 (correspondiente a las hidrolasas), subclase 1 (código EC3.1). Las esterases comprenden en particular hidrolasas de monoéster trifosfórico, sulfatasas, hidrolasas de monoéster difosfórico, hidrolasas de triéster fosfórico, exodesoxirribonucleasas, exorribonucleasas, exonucleasas, desoxirribonucleasas, ribonucleasas, endodesoxirribonucleasas y endorribonucleasas.

**[0035]** Por "fosfatasa", se entiende aquí una enzima que elimina un grupo fosfato de una molécula simple o de una macromolécula biológica, hidrolizando los monoésteres de ácido fosfórico en un ion fosfato y una molécula con un grupo hidroxilo libre. En la nomenclatura de las enzimas, las fosfatasas pertenecen a la clase 3 (correspondiente a las hidrolasas), subclase 1.3 (código EC3.1.3). Como es bien conocido para el experto en la materia, las fosfatasas difieren según su especificidad al sustrato. Las fosfatasas comprenden en particular tirosina fosfatasas, serina/treonina fosfatasas, fosfatasas de doble especificidad, histidina fosfatasas y lípido fosfatasas.

**[0036]** Por " $\beta$ -lactamasa", se entiende aquí una enzima que hidroliza las  $\beta$ -lactaminas con apertura del núcleo  $\beta$ -lactama y producción de derivados inactivos. Las  $\beta$ -lactamasas son secretadas generalmente en el medio exterior en las bacterias grampositivas, y en el espacio periplásmico en las bacterias gramnegativas. Agrupan entre otras las cefalosporinasas, las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y las carbapenemasas. Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican según dos clasificaciones principales:

- la clasificación de Bush, elaborada en 1989 y reactualizada en 1995 y después en 2009, clasifica las  $\beta$ -lactamasas en función de su sustrato preferente en penicilina, oxacilina, carbenicilina, cefaloridina, cefotaxima e imipenem, y en función de su sensibilidad al ácido clavulánico, un inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas;
- la clasificación de Ambler, propuesta en 1980, se basa en la secuencia proteica de las  $\beta$ -lactamasas. Se compone de cuatro clases de enzimas: A, B, C y D. Las  $\beta$ -lactamasas de las clases A, C y D incluyen una serina en el sitio activo, que forma un enlace covalente transitorio con la  $\beta$ -lactamina, lo que conlleva la apertura del núcleo  $\beta$ -lactama. Estas  $\beta$ -lactamasas también se denominan serina  $\beta$ -lactamasas. La clase B agrupa de por sí metalo-enzimas que necesitan un ion zinc para hidrolizar el núcleo  $\beta$ -lactama.

**[0037]** Las  $\beta$ -lactamasas son numerosas y diversificadas, en función de sus propiedades. Son responsables de la resistencia a las  $\beta$ -lactaminas como las penicilinas, las cefalosporinas, las monobactames, las cefamicinas y los carbapenemes. Inactivan estos antibióticos por hidrólisis del núcleo  $\beta$ -lactama. Entre las  $\beta$ -lactamasas, la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 está muy extendida en las diferentes especies bacterianas. Hidroliza con mucha eficacia las penicilinas, pero no las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, y es sensible a la inhibición por el ácido clavulánico. Las bacterias que producen  $\beta$ -lactamasas de esta categoría son así tratadas fácilmente por las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación (C3G). Por el contrario, las BLEE, algunas cefalosporinasas y carbapenemasas, cuando son producidas por bacterias, las hacen resistentes a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación (C3GR).

**[0038]** Las secuencias de aminoácidos de las  $\beta$ -lactamasas son muy próximas unas a otras dentro de una misma familia. Así, basta con sustituir un pequeño número de aminoácidos para permitir que las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM-1, inicialmente inactivas, hidrolicen las cefalosporinas ( $\beta$ -lactamasas de tipo BLEE, por ejemplo), o se vuelvan resistentes a los inhibidores.

**[0039]** La **tabla 1** siguiente describe las propiedades de los diferentes tipos de  $\beta$ -lactamasas, en particular las cefalosporinasas, las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y las carbapenemasas.

**Tabla 1:** Tabla sintética y no exhaustiva que describe las propiedades de las  $\beta$ -lactamasas principales que confieren (C3GR) o no resistencia a las C3G.

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

*Microorganismos*

5 **[0040]** Por "microorganismo", se entiende aquí un organismo vivo que presenta una estructura celular eucariota o procariota, o que es acariota, y que se caracteriza por la unicelularidad, un tamaño microscópico o ultramicroscópico y un potencial metabólico y de reproducción. Los microorganismos según la invención comprenden en particular bacterias, principalmente bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas, y hongos, principalmente levaduras (por ejemplo, del género *Candida*). Más en concreto, puede tratarse de una bacteria seleccionada entre el grupo constituido por:

- Enterobacteriaceae tales como las cepas del género *Klebsiella*, en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxitoca*; las cepas del género *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*; las cepas del género *Enterobacter*, en particular *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* y *Enterobacter aerogenes*; las cepas del género *Citrobacter*, en particular *Citrobacter freundii* y *Citrobacter koseri*; las cepas del género *Proteus*, en particular *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Proteus rettgeri*; las cepas del género *Serratia*, en particular *Serratia marcescens*; las cepas del género *Salmonella*, las cepas del género *Providencia*, las cepas del género *Shigella* y las cepas del género *Kluyvera*, *Morganella morganii* y *Hafnia alvei*;
- bacilos gramnegativos no fermentantes tales como las cepas del género *Acinetobacter*, en particular *Acinetobacter baumannii*; las cepas del género *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas aeruginosa*, las cepas del género *Stenotrophomonas*, y las cepas del género *Burkholderia*;
- bacterias gramnegativas anaerobias tales como *Bacteroides fragilis*;
- cocobacilos o cocos gramnegativos tales como *Haemophilus influenzae*, *Bordetella* y *Neisseria spp*;
- bacilos o cocos grampositivos tales como las cepas del género *Lactobacillus*; las cepas del género *Enterococcus*; las cepas del género *Streptococcus*; las cepas del género *Staphylococcus*, en particular las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes o no a la metilicina; las cepas del género *Listeria*; y las cepas del género *Clostridium*.

30 **[0041]** De forma preferida, los microorganismos según la invención se seleccionan entre el grupo constituido por microorganismos portadores o que pueden adquirir una resistencia a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación. En particular, los microorganismos según la invención se seleccionan entre el grupo constituido por *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxitoca*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Morganella morganii* y *Providencia sp*.

35 **[0042]** De forma más preferida, los microorganismos según la invención son microorganismos resistentes a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación.

40 **[0043]** Preferentemente, cuando el microorganismo según la invención es resistente a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, y por tanto en general resistente también a las cefalosporinas de 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> generación y a las penicilinas, la enzima tal como se define anteriormente se selecciona entre el grupo constituido por β-lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas.

**[0044]** Preferentemente, cuando el microorganismo según la invención es resistente a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, la enzima es una enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación. De forma preferida entre todas, cuando el microorganismo según la invención es resistente a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, la enzima según la invención es una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido.

5

**[0045]** En el contexto de la invención, la expresión "microorganismo resistente a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación" hace referencia a microorganismos que, aparte de la actividad específica de su o sus  $\beta$ -lactamasas, siguen multiplicándose y/o que no mueren cuando se cultivan en presencia de una concentración clásicamente inhibidora de cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación.

10

**[0046]** Preferentemente, los "microorganismos resistentes a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación" según la presente invención se seleccionan entre el grupo constituido por *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxitoca*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Morganella morgani* y *Providentia sp.*

15

*Sustrato cromogénico o fluorogénico*

**[0047]** En el contexto de la invención, la expresión "sustrato cromogénico" hace referencia a una molécula que puede ser escindida o modificada por una enzima y que comprende o está acoplada a un cromóforo.

20

**[0048]** Por "cromóforo", se entiende aquí una agrupación de átomos dentro de una molécula que es responsable de las propiedades de absorción y/o de emisión de luz en el dominio del ultravioleta, del visible o del infrarrojo de esta molécula. Estas propiedades proceden de una capacidad de absorber la energía de fotones en una gama del espectro visible mientras que las otras longitudes de onda son transmitidas o difundidas.

25

**[0049]** El sustrato cromogénico según la invención puede estar coloreado o ser incoloro. Este sustrato cromogénico libera su cromóforo bajo la acción de una enzima específica.

30

**[0050]** En el contexto de la invención, la expresión "sustrato fluorogénico" hace referencia a una molécula que puede ser escindida o modificada por una enzima y que comprende o está acoplada a un fluoróforo. Este sustrato fluorogénico libera su fluoróforo bajo la acción de una enzima específica.

**[0051]** Por "fluoróforo", se entiende aquí una agrupación de átomos dentro de una molécula que es responsable de la capacidad de esta molécula de emitir la luz de fluorescencia después de una excitación. Se trata en general de sustancias compuestas por varios núcleos aromáticos conjugados o incluso de moléculas planas y cilíndricas que poseen uno o varios enlaces  $\pi$ .

35

**[0052]** Los cromóforos o fluoróforos son bien conocidos por el experto en la materia y se usan habitualmente en el laboratorio desde hace muchos años (véase por ejemplo Vinazzer (1975) *Haemostasis* 4:101-9, Manafi (2000) *Int. J. Food Microbiol.* 60:205-218, Orega y col. (2009) *J. Microbiol. Methods* 79:139-155).

40

**[0053]** El cromóforo puede corresponder por ejemplo a un derivado de indoxilo (por ejemplo, 3-indolil-R, 5-bromo-3-indolil-R, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil o 6-cloro-3-indoxil), a un derivado de indol (por ejemplo, 7-amido-5-bromoindol), a nitrofenol o uno de sus derivados (por ejemplo, paranitrofenol, ortonitrofenol u ortofluorofenol), a clorofenol o uno de sus derivados (por ejemplo, 4-amino-2,6-dicloro- fenol), a naftol o uno de sus derivados (por ejemplo, 1-naftol o 2-naftilamida), a 5-(4-hidroxi-3- metoxifenilmetileno)-2-tioxotiazolidin-4-ona-3-etanoato, 3,4-ciclohexenoscutetina, 2-alizarina o 7- amido-1-pentil-fenoxacin-3-ona.

45

**[0054]** El fluoróforo puede corresponder por ejemplo a la cumarina o uno de sus derivados (por ejemplo, hidroxicumarina, aminocumarina, 7-amido-4-metilcumarina, metoxicumarina, ácido 7-nitrocumarina-3-carboxílico), ficoeritrina, fluoresceína o uno de sus derivados (por ejemplo, 5-dodecanoilaminofluoresceína), 4-metil-umbeliferilo, resofurina, rodamina, alofococianina, 2-(5'-cloro-2'-hidroxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona.

50

**[0055]** En el contexto de la invención, la expresión "sustrato cromogénico o fluorogénico susceptible de liberar un cromóforo o fluoróforo después de hidrólisis por la enzima que se va a detectar" hace referencia a un sustrato cromogénico o fluorogénico tal como se define anteriormente que, cuando se pone en contacto con la enzima de la que es específico, libera el cromóforo o fluoróforo que comprende o con el que está acoplado.

55

**[0056]** La liberación del cromóforo o fluoróforo puede deberse directa o indirectamente a la hidrólisis del sustrato por la enzima que se va a detectar. Así, la enzima que se va a detectar puede hidrolizar el enlace que acopla el sustrato al cromóforo o fluoróforo, liberando así el cromóforo o fluoróforo del sustrato. Esta acción directa de la enzima se observa normalmente con los sustratos acoplados a un cromóforo o fluoróforo. La enzima que se va a detectar puede hidrolizar igualmente un dominio del sustrato que no implica al cromóforo o fluoróforo.

60



**[0057]** En consecuencia, la detección de la liberación del cromóforo o fluoróforo del sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención indica que este sustrato ha sido hidrolizado por una enzima específica.

5 **[0058]** Preferentemente, la liberación del cromóforo o fluoróforo conlleva un cambio de color del sustrato cromogénico o de emisión de fluorescencia del sustrato fluorogénico. En consecuencia, la detección de la liberación del cromóforo o fluoróforo puede implementarse en particular observando el cambio de color del sustrato cromogénico o de emisión de fluorescencia del sustrato fluorogénico.

10 **[0059]** Preferentemente, el sustrato cromogénico o fluorogénico aquí descrito es un sustrato o un derivado de un sustrato de una enzima tal como se define anteriormente. En particular, un sustrato cromogénico o fluorogénico aquí descrito es un sustrato o un derivado de un sustrato de una enzima seleccionada en el grupo constituido por glucosidasas, estererasas, fosfatasas,  $\beta$ -lactamasas, en particular penicilinasas, cefalosporinasas, carbenicilinasas, oxacilinasas, carbapenemasas entre ellas metalo- $\beta$ -lactamasas, y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Un sustrato  
15 cromogénico o fluorogénico según la invención es un sustrato o un derivado de un sustrato de una enzima seleccionada entre el grupo constituido por cefalosporinasas, carbapenemasas entre ellas metalo- $\beta$ -lactamasas, y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

**[0060]** Por "derivado de un sustrato de una enzima", se entiende aquí un compuesto obtenido de un sustrato  
20 de una enzima, susceptible de ser hidrolizado por las mismas enzimas que el sustrato a partir del cual se ha producido. Preferentemente, un derivado de un sustrato de una enzima según la invención es un sustrato modificado de manera que contenga o esté acoplado a un cromóforo o un fluoróforo.

**[0061]** Los sustratos específicos de enzimas son bien conocidos por el experto en la materia. Los ejemplos de  
25 sustratos de glucosidasas comprenden así glucósidos, ácidos urónicos, aminoazúcares y azúcares acetilados. Los ejemplos de sustratos de estererasas comprenden en particular butiratos, palmitatos, estearatos, oleatos, lauratos y caprilatos. Los ejemplos de sustratos de fosfatasas comprenden en particular ésteres de fosfato de alcohol de alquilo, ésteres de fosfato de arilo, ésteres de fosfato de arilalquilo, fosfatos de enol, fosfatos de arilo, fosfatos de diarilo, pirofosfato inorgánico, pirofosfato orgánico, fosfamidas y tioésteres. Los ejemplos de sustratos de penicilinasas  
30 comprenden así penicilinas y nitrocefina. Los sustratos de cefalosporinasas comprenden por ejemplo nitrocefina, penicilinas, cefalosporinas de 1<sup>a</sup> generación y ciertas cefalosporinas de 2<sup>a</sup> generación y de 3.<sup>a</sup> generación (tales como las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación definidas a continuación). Los ejemplos de sustratos de carbenicilinasas incluyen nitrocefina, carbenicilinas, penicilinas y cloxacilinas. Los ejemplos de sustratos de oxacilinasas incluyen nitrocefina, cloxacilinas, penicilinas y carbenicilinas. Los ejemplos de sustratos de carbapenemasas incluyen penicilinas,  
35 cefalosporinas, carbapenemes y nitrocefina. Los ejemplos de sustratos de metalo- $\beta$ -lactamasas comprenden en particular nitrocefina, penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Los ejemplos de sustratos de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido incluyen nitrocefina, penicilinas y cefalosporinas, en particular cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación tal como se definen a continuación.

40 **[0062]** En una realización preferida, cuando la enzima que se va a detectar se selecciona entre el grupo constituido por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, el sustrato cromogénico o fluorogénico comprende un núcleo  $\beta$ -lactama.

**[0063]** Por "núcleo  $\beta$ -lactama", se entiende aquí una estructura cíclica heteroatómica, consistente en tres  
45 átomos de carbono y uno de nitrógeno. Preferentemente, el núcleo  $\beta$ -lactama del sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención es hidrolizado por la enzima que se va a detectar.

**[0064]** De forma preferida, además, cuando la enzima que se va a detectar se selecciona entre el grupo  
50 constituido por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, el sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención es un derivado de  $\beta$ -lactamina.

**[0065]** Por " $\beta$ -lactamina", se entiende aquí un antibiótico que contiene un núcleo  $\beta$ -lactama en su estructura  
molecular. Como es bien conocido para el experto en la materia, las  $\beta$ -lactaminas engloban por ejemplo los derivados de la penicilina, las cefalosporinas, las monobactamas y los carbapenemes.

55 **[0066]** De manera más preferida, cuando la enzima que se va a detectar se selecciona entre el grupo constituido por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasas y carbapenemasas, el sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención es un derivado de cefalosporina.

60 **[0067]** Por "derivado de cefalosporina", se entiende aquí una molécula compuesta, por una parte, por un grupo obtenido de una cefalosporina, o parte de cefalosporina, susceptible de ser hidrolizada por una  $\beta$ -lactamasa, y, por otra parte, por un grupo cromóforo o fluoróforo. Preferentemente, el derivado de cefalosporina según la invención es una cefalosporina modificada de manera que contenga o esté acoplada a un cromóforo.

**[0068]** Las cefalosporinas se clasifican habitualmente en cefalosporinas de primera, de segunda, de tercera generación o de cuarta generación basándose en su espectro de actividad y de su mayor o menor resistencia o estabilidad frente a las  $\beta$ -lactamasas. Esta clasificación es bien conocida para el experto en la materia (véase por ejemplo Thompson (1987) Mayo Clin Proc. 62:821-34; Gustaferro y Steckelberg (1991) Mayo Clin Proc. 66:1064-73; y Barber y col. (2004) Adv Biochem Eng Biotechnol. 88:179-215). Los ejemplos de cefalosporinas de 1ª generación incluyen en particular cefazolina, cefalotina, cefapirina, cefaloridina, cefalexina Keforal®, cefradina Zeefra® y cefradoxil Oracefal®. Los ejemplos de cefalosporinas de 2ª generación incluyen entre otros cefamandol, cefuroxima Zinnat®, cefonicida, ceforanida, cefatrizina, cefotiam, cefprocil, loracarbef, cefotetano, cefotixina y cefaclor Alfatil®. Los ejemplos de cefalosporinas de 4ª generación incluyen en particular cefepima y cefpiroma.

10

**[0069]** De manera preferida entre todas, el sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención es un derivado de cefalosporina de 3.ª generación.

**[0070]** Por "derivado de cefalosporina de 3.ª generación", se entiende aquí un derivado de cefalosporina tal como se define anteriormente susceptible de ser hidrolizado por las mismas enzimas que las cefalosporinas de 3.ª generación. Preferentemente, un derivado de cefalosporina de 3.ª generación según la invención es una cefalosporina de 3.ª generación, o una parte de una cefalosporina de 3.ª generación, modificada de manera que contenga o esté acoplada a un cromóforo o un fluoróforo. De forma más preferida, el derivado de cefalosporina de 3.ª generación según la invención es una cefalosporina de 3.ª generación, o una parte de una cefalosporina de 3.ª generación, modificada de manera que contenga o esté acoplada a un cromóforo.

**[0071]** Las cefalosporinas de 3.ª generación incluyen principalmente los compuestos cuyas denominaciones en inglés son las siguientes: Cefcapene (Referencia CAS: 135889-00-8), Cefcapene Pivoxil (Referencia CAS: 105889-45-0), Cefcapene Pivoxil Hydrochloride (Referencia CAS: 147816-23-7), Cefcapene Pivoxil Hydrochloride Monohydrate (Referencia CAS: 147816-24-8), Cefdaloxime (Referencia CAS: 80195-36-4), Cefdaloxime Pivoxil, Cefdinir (Referencia CAS: 91832-40-5), Cefditoren (Referencia CAS: 104146-53-4), Cefditoren Sodium (Referencia CAS: 104146-53-4), Cefditoren Pivoxil (Referencia CAS: 117467-28-4), Cefetamet Pivoxil Hydrochloride, Cefetamet Pivoxyl (Referencia CAS: 65243-33-6), Cefetamet (Referencia CAS: 65052-63-3), Cefixime (Referencia CAS: 79350-37-1), Cefixime Trihydrate, Cefmenoxime Hydrochloride (Referencia CAS: 75738-58-8), Cefmenoxime (Referencia CAS: 65085-01-0), Cefodizime Sodium (Referencia CAS: 86329-79-5), Cefodizime (Referencia CAS: 69739-16-8), Cefoperazone Sodium (Referencia CAS: 62893-20-3), Cefoperazone A, Cefoperazone (Referencia CAS: 62893-19-0), Cefotaxime Sodium (Referencia CAS: 64485-93-4), Cefotaxime S-oxide, Cefotaxime (Referencia CAS: 63527-52-6), Benzathine Cefotaxime, Desacetylcefotaxime, Cefpimizole Sodium, Cefpimizole, Cefpiramide Sodium (Referencia CAS: 74849-93-7), Cefpiramide (Referencia CAS: 70797-11-4), Cefpodoxime Proxetil (Referencia CAS: 87239-81-4), Cefpodoxime (Referencia CAS: 80210-62-4), Cefpodoxime Hydrate, Cefsulodin Sodium, Cefsulodin, Ceftazidime Pentahydrate (Referencia CAS: 78439-06-2), Ceftazidime (Referencia CAS: 72558-82-8), Cefteram, Cefteram Pivaloyloxymethyl Ester, Ceftibuten, Trans-ceftibuten, Ceftiofur, Ceftiofur Sodium (Referencia CAS: 80370-57-6), Ceftiofur Hydrochloride, Ceftiofur Sodium, Desfuroylceftiofur, Ceftiolene, Ceftizoxime Alapivoxil, Ceftizoxime Sodium, Ceftizoxime, Ceftriaxone Disodium (Referencia CAS: 74578-69-1), Ceftriaxone Sodium, Ceftriaxone (Referencia CAS: 73384-59-5) y las sales de estos compuestos. La estructura y la denominación IUPAC de estos compuestos puede encontrarse por ejemplo en el sitio [chemicalland21.com](http://chemicalland21.com).

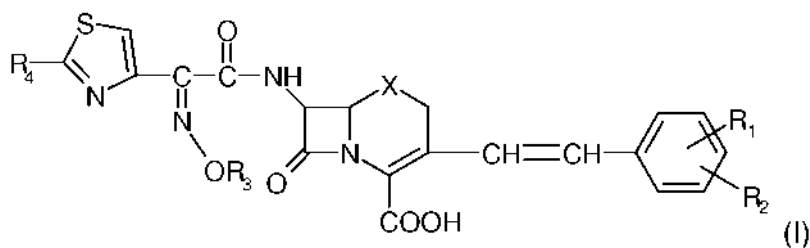
**[0072]** En una realización particular, la cefalosporina de 3.ª generación se elige entre ceftriaxona (Rhocéphine®), cefotaxima (Claforan®), ceftacídima (Fortum®), cefixima (Oroken®), cefpodoxima proxetil (Orelox®), cefotiam o cefotiam hexetil (Takétiam®), Cefpiroma (Cefrom®), Cefepima (Axéxim®), Cefsu-yodo (Pyocefal®), cefatamet, ceftizoxima, cefoperazona, cefsulodin, ceftibuteno y las sales de estos compuestos.

**[0073]** Los ejemplos de sustratos cromogénicos específicos de  $\beta$ -lactamasas son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen en particular nitrocefina (ácido (3-[2,4-dinitrostiril]-7-(2-tienilacetamido)3-cefem-4-carboxílico), PADAC® (Piridinio-2-azo-*p*-dimetilaniolina cromóforo), CENTA™, HMRZ-86 (trifluoroacetato de ácido (7R)-7[2-aminotiazol-4-il]-(z)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido)-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico, isómero E) y cefesona o S1 (3-(2,4-dinitrostiril)-(6*R*,7*R*)-7-fenilacetamido-cef-3-em-4-carboxilato).

**[0074]** Los ejemplos de sustratos fluorogénicos específicos de  $\beta$ -lactamasas son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen en particular la Fluorocilina Green 495/525 y la Fluorocilina Green 345/350 Live Blazer™-FRET B/G.

**[0075]** En una realización de la invención, el derivado de cefalosporina de 3.ª generación que contiene o está acoplado a un cromóforo es uno de los compuestos descritos en la solicitud de patente europea n.º 1325923. Estos compuestos se representan mediante la fórmula (I):

60



donde:

- 5 - R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser idénticos o diferentes y representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo nitro o ciano;
- R<sub>3</sub> representa un grupo alquilo en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido por un grupo carboxilo;
- R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo amino;
- X representa -S- o -SO-; y
- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> no pueden representar simultáneamente un átomo de hidrógeno.

10

**[0076]** Así, el derivado de cefalosporina de 3.<sup>a</sup> generación que contiene o está acoplado a un cromóforo puede ser por ejemplo el compuesto:

- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxi-imino)acetamido]-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 15 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxi-imino)acetamido]-3-(2,6-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxi-imino)acetamido]-3-(4-nitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxi-imino)acetamido]-3-(2,4-dicianostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxi-imino)acetamido]-3-(4-cianostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 20 - ácido 7-[2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)-2-(tiazol-4-il)acetamido]-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 1-óxido-7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxi-imino)acetamido]-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(4-nitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2,4-dicianostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 25 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2,6-dicianostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-metoxiiminoacetamido]-3-(2-cianostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiimino-acetamido]-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiimino-acetamido]-3-(2,6-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiimino-acetamido]-3-(4-nitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 30 - ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiimino-acetamido]-3-(2-nitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiimino-acetamido]-3-(2,4-dicianostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiimino-acetamido]-3-(4-cianostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiimino-acetamido]-3-(2-cianostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- ácido [2-carboximetoxiimino-2-(tiazol-4-il)acetamido]-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,
- 35 - ácido 1-óxido-7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-carboximetoxiimino-acetamido]-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico,

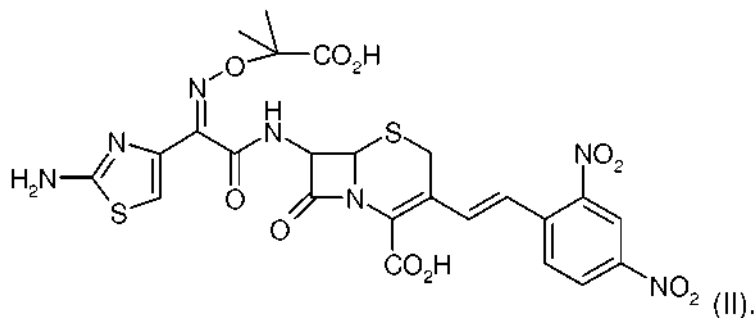
o una sal de los mismos,

tal como se describe en la solicitud de patente europea n.º 1325923.

40

**[0077]** En una realización preferida de la invención, el sustrato cromogénico es el compuesto HMRZ-86 (trifluoroacetato del ácido (7R)- 7-[2-(aminotiazol-4-il)-(z)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico, isómero E) (Hanaki y col. (2004) Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53:888-889). Este compuesto se representa por la fórmula (II) siguiente:

45



*Etapa de cultivo*

- [0078]** En algunas realizaciones de la invención, el número de microorganismos presentes en la muestra biológica es insuficiente para observar la liberación del cromóforo o fluoróforo del sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención. En consecuencia, puede ser necesario cultivar la muestra biológica de manera que permita el crecimiento de los microorganismos, antes de concentrar los microorganismos opcionalmente presentes y obtener un número de microorganismos suficiente para observar la liberación del cromóforo o fluoróforo del sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención.
- 10 **[0079]** Además, en un modo preferido de la invención, el procedimiento según la invención comprende una etapa previa a0) de cultivo de los microorganismos. Esta etapa previa a0) de cultivo de los microorganismos se hace en condiciones apropiadas para permitir el crecimiento de los microorganismos.
- 15 **[0080]** Por "condiciones apropiadas para permitir el crecimiento de los microorganismos", se entiende aquí condiciones de temperatura, oxigenación y agitación apropiadas, un medio apropiado y un período apropiado para que los microorganismos presentes en la muestra biológica puedan multiplicarse. Las condiciones apropiadas para permitir el crecimiento de los microorganismos dependen de los microorganismos que se van a detectar y son bien conocidas por el experto en la materia. Normalmente, la etapa de cultivo tiene lugar en un medio de cultivo no selectivo, preferentemente un medio de cultivo líquido, tal como el medio tripto-caseína-soja (TCS), a 37°C, durante un período que permite obtener una concentración final que permite la realización de la prueba.
- 20 **[0081]** Preferentemente, cuando la muestra biológica es una muestra de sangre, la etapa a0) de cultivo es una etapa de hemocultivo.
- 25 **[0082]** Por "hemocultivo", se entiende aquí el cultivo de una muestra de sangre circulante. Las condiciones de cultivos en hemocultivo son bien conocidas para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en "Hémocultures, Garnier F. y Denis F., In: Bactériologie médicale: techniques usuelles (2007) Ed. Masson 11:107-116". Normalmente, la muestra de sangre se pone en cultivo en un medio líquido no selectivo tal como medio corazón-cerebro, medio tripticasa soja o caldo de tipo medio de Wilkins Chalgren, suplementado con nutrientes y factores de crecimiento (por ejemplo, vitaminas, hemina, hidratos de carbono, cisteína, etc.), que comprende opcionalmente un anticoagulante tal como el polianetolsulfonato de sodio (SPS) y/o un neutralizador de antibióticos tal como resinas adsorbentes de cationes o carbón activo. De forma preferida, el hemocultivo se realiza en un sistema automatizado. Los sistemas automatizados de hemocultivo son bien conocidos por el experto en la materia y comprenden por ejemplo Bactec® comercializado por Becton-Dickinson y BacT/ALERT® comercializado por bioMérieux. Estos sistemas garantizan de forma continua la supervisión, agitación e incubación de los hemocultivos. Durante su crecimiento, el microorganismo produce CO<sub>2</sub> que induce un descenso del pH, que será detectado por el autómata con ayuda de un sensor, ya sea por fluorescencia o por reflectometría. El aparato avisa de cualquier resultado positivo gracias a una alarma visual y/o sonora, cuando la concentración en microorganismos alcanza una concentración umbral.
- 30 **[0083]** Debe observarse que los procedimientos según la invención son especialmente ventajosos para detectar la presencia de una enzima de un microorganismo en una muestra de sangre después de una etapa de hemocultivo. De hecho, los procedimientos según la invención permiten realizar la detección de una resistencia en solo 30 min después de la etapa de hemocultivo mientras que los procedimientos del estado de la técnica solo permiten obtener un resultado 16 h como mínimo después de la etapa de hemocultivo. Esta reducción del tiempo de espera en los procedimientos según la invención proviene en parte del hecho de que no contiene etapa de cultivo en medio de gelosa.

*Etapa de concentración*

- 50 **[0084]** Por "concentrar" o "concentración", se entiende aquí la operación consistente en reducir el volumen de una solución que contiene microorganismos por eliminación de la parte acuosa, de manera que aumenta su riqueza en microorganismos. Las técnicas de concentración son bien conocidas para el experto en la materia e incluyen por ejemplo la centrifugación y el filtrado. Preferentemente, la etapa de concentración comprende la centrifugación de la muestra biológica y después la eliminación del sobrenadante obtenido. Normalmente, la centrifugación se realiza a una velocidad de aproximadamente 3.000 g durante 2 a 10 min de manera que se obtiene un depósito bacteriano. A continuación, se elimina el sobrenadante obtenido de la centrifugación. El filtrado se realiza por ejemplo a través de una membrana donde el tamaño de los poros es inferior a 1 µm (por ejemplo, 0,45 µm). A continuación, los microorganismos se concentran y se recuperan de la membrana. La etapa de concentración puede realizarse asimismo en un tubo con gel separador de suero, tal como el tubo con separador de suero comercializado por Becton Dickinson. Después de la centrifugación, normalmente a 1.300 g durante 10 min, los microorganismos se recuperan en la superficie del gel.
- 55 **[0085]** Además, la concentración de microorganismos puede realizarse por centrifugación después de una lisis y/o una aglutinación de células sanguíneas y/o un filtrado que permite el paso de los microorganismos.

65

**[0086]** Los microorganismos concentrados pueden además ser objeto de uno o varios lavados en medio tamponado (por ejemplo, en tampón de fosfato).

*Etapas de lisis*

5

**[0087]** Cuando la muestra biológica es una muestra que contiene sangre o hematíes, la etapa de concentración puede estar precedida por una etapa de lisis de los hematíes presentes en el hemocultivo. Esta etapa de lisis debe permitir eliminar los hematíes sin que los microorganismos experimenten lisis. Las condiciones apropiadas de lisis de los hematíes son bien conocidas para el experto en la materia y comprenden por ejemplo la puesta en contacto de la muestra biológica con un tampón de lisis de glóbulos rojos tal como el tampón de lisis RBC (Red Blood Cells lysis buffer: 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,01 mM EDTA) durante un periodo apropiado, por ejemplo 10 min, a una temperatura apropiada, por ejemplo, entre 15 y 40°C, para permitir la lisis de los glóbulos rojos. Otros tampones de lisis que pueden usarse en este caso son conocidos para el experto en la materia (Chen y col., (citado anteriormente); Moreau y col., 2002, J Drug Target. 10(2):161-73).

15

**[0088]** Esta etapa de lisis puede renovarse o seguirse de una etapa de lavado antes de la etapa de concentración.

*Etapas de aglutinación*

20

**[0089]** Cuando la muestra biológica es una muestra que contiene sangre o hematíes, la etapa de concentración puede estar precedida por una etapa a) de preparación de la muestra biológica que comprende:

- (i) la aglutinación de los hematíes, y
- (ii) la separación de los hematíes aglutinados de los microorganismos presentes en la muestra.

25

**[0090]** Por "aglutinar" o "aglutinación", se entiende aquí la operación consistente en hacer precipitar células, en particular células sanguíneas, y de forma preferida hematíes.

**[0091]** Preferentemente, la aglutinación se implementa poniendo la muestra biológica en contacto con al menos un agente de aglutinación.

**[0092]** Por "agente de aglutinación" se entiende aquí una molécula que induce la aglutinación de células. El agente de aglutinación según la invención se elige preferentemente entre el grupo constituido por lectinas, que incluyen concanavalina A, abrina, ricina y aglutininas tales como aglutinina de germen de trigo y aglutininas de soja; aminoácidos poliméricos tales como polilisina y poliarginina; polímeros catiónicos tales como polietilenoimina; polímeros hidrosolubles naturales o sintéticos tales como bromuro de hexadimetirina, polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicoles (PEG); policationes tales como sulfato de protamina; gelatinas, dextranos, fibrinógeno, urea, glicerol, cloruro de sodio y anticuerpos.

40

**[0093]** Preferentemente, el agente de aglutinación usado en el marco de la invención es un polietilenglicol (PEG).

**[0094]** Las técnicas de aglutinación de los hematíes que aplican un agente de aglutinación tal como se define anteriormente son bien conocidas para el experto en la materia y se describen por ejemplo en las solicitudes WO 03/025207 y US 4.753.776. Normalmente, la muestra biológica que se va a preparar se pone en contacto con el PEG a una concentración suficiente y durante un periodo suficiente para permitir la aglutinación de los hematíes presentes en la muestra biológica, por ejemplo, durante 1 a 30 min, preferentemente entre 5 y 15 min.

**[0095]** En el contexto de la invención, la etapa de "separación de los hematíes aglutinados de los microorganismos presentes en la muestra" consiste en eliminar los hematíes aglutinados y conservar los microorganismos presentes en la muestra tratada. Dichas técnicas de separación son bien conocidas para el experto en la materia y comprenden, por ejemplo, el filtrado, la centrifugación y/o la decantación.

**[0096]** El filtrado consiste por ejemplo en poner en contacto la muestra biológica y el agente aglutinante en la superficie del filtro antes de la centrifugación con el fin de separar los hematíes aglutinados (que quedan en el filtro) de los microorganismos que se encuentran en el filtrado.

**[0097]** La decantación consiste por ejemplo en poner en contacto la muestra biológica y el agente aglutinante y recoger el sobrenadante después de aglutinación y decantación.

**[0098]** Preferentemente, la separación de los hematíes aglutinados se realiza usando filtros para centrifugar.

**[0099]** La etapa a) de preparación de la muestra biológica tal como se define anteriormente puede además estar precedida o seguida por una o varias etapas de lisis de los hematíes tal como se define en la sección "Etapas de

65

*lisis*" anterior.

*Etapas de puesta en suspensión*

5 **[0100]** Los protocolos según la presente invención se caracterizan en particular por el hecho de que los microorganismos, después de la concentración, son puestos en suspensión en una solución que comprende al menos un sustrato cromogénico o fluorogénico tal como se define anteriormente. Así, el sustrato cromogénico o fluorogénico se pone en contacto en una solución con los microorganismos concentrados, y no en medio sólido, tal como medio de gelosa.

10 **[0101]** Por "poner en suspensión los microorganismos", se entiende aquí el hecho de disminuir los agregados bacterianos por recolocación en una solución, de manera que los agregados bacterianos provienen de una sedimentación natural o de una sedimentación realizada voluntariamente, por ejemplo, por centrifugación. La finalidad de la puesta en suspensión de los microorganismos según la presente invención es tender hacia una solución donde  
15 los microorganismos están todos separados unos de otros.

**[0102]** La solución donde los microorganismos se vuelven a poner en suspensión comprende al menos un sustrato cromogénico o fluorogénico tal como se define anteriormente. Puede contener además al menos un agente de lisis. El agente de lisis según la invención puede ser un agente de lisis bacteriano o fúngico. Preferentemente, el  
20 agente de lisis lisa la pared bacteriana o fúngica sin hidrolizar el sustrato cromogénico o fluorogénico.

**[0103]** Dicho al menos un agente de lisis puede seleccionarse entre el grupo constituido por un detergente, una enzima que degrada la pared bacteriana o fúngica, un antibiótico activo en la pared bacteriana tal como una polimixina y combinaciones de los mismos. Ventajosamente, el agente de lisis puede combinarse con, o sustituirse por, un medio  
25 de lisis mecánica, por ejemplo, bolas o ultrasonidos.

**[0104]** En el contexto de la invención, un "detergente" o "surfactante" es un compuesto químico dotado de propiedades tensioactivas.

30 **[0105]** Los ejemplos de detergente son bien conocidos para el experto en la materia y comprenden en particular los descritos en la página de la empresa Sigma (<http://www.sigmaldrich.com/life-science/life-science-catalog/product-catalog.html?TablePage=20964389>) y los compuestos siguientes: ácido quenodesoxicólico; sal de sodio del ácido quenodesoxicólico; ácido cólico; ácido deshidrocólico; ácido desoxicólico; éster de metilo del ácido desoxicólico; digitonina; digitoxigenina; óxido de N,N-dimetildodecilamina; docusato de sodio; sal de sodio del ácido  
35 glicoquenodesoxicólico; hidrato del ácido glicocólico; sal de sodio de hidrato del ácido glicocólico; monohidrato del ácido glicodesoxicólico; sal de sodio del ácido glicodesoxicólico; sal disodio 3-sulfato del ácido glicolítico; éster de etilo del ácido glicolítico; sarcosil, sal de sodio de N-lauroilsarcosina; N-lauroilsarcosina; dodecilsulfato de litio; solución de lugol; Niaproof 4 Tipo 4 (es decir, sal de sodio de 7-etil-2-metil-4-undecilsulfato); sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico; 1-butanosulfonato de sodio; 1-decanosulfonato de sodio; 1-dodecanosulfonato; 1-heptanosulfonato  
40 de sodio anhidro; 1-nonanosulfonato de sodio; monohidrato de 1-propanosulfonato de sodio; 2-bromoetanosulfonato de sodio; hidrato de colato de sodio; coleato de sodio; desoxicolato de sodio; monohidrato de desoxicolato de sodio; dodecilsulfato de sodio; hexanosulfonato de sodio anhidro; octilsulfato de sodio; pentanosulfonato de sodio anhidro; taurocolato de sodio; taurodesoxicolato de sodio; sal de sodio del ácido tauroquenodesoxicólico; monohidrato de sal de sodio del ácido taurodesoxicólico; hidrato de sal de sodio del ácido taurodesoxicólico; sal de disodio del ácido 3-sulfato  
45 taurolítico; sal de sodio del ácido taurodesoxicólico; Trizma® dodecilsulfato (es decir, tris(hidroximetil)aminometano laurilsulfato); ácido ursodesoxicólico, bromuro de alquiltrimetilamonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; cloruro de bencildimetiltetradecilamonio; bromuro de bencildodecildimetilamonio; tetracloroyodato de benciltrimetilamonio; bromuro de cetiltrimetilamonio; bromuro de dimetildiodecildimetilamonio; bromuro de dodeciletildimetilamonio; bromuro de dodeciltrimetilamonio; bromuro de  
50 etilhexadecildimetilamonio; reactivo T de Girard; bromuro de hexadeciltrimetilamonio; N,N',N'-polioxietileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano; bromuro de tonzonio; bromuro de trimetil(tetradecil)amonio, BigCHAP (N,N-bis[3-(D-gliconamido)propil]colamida); bis(polietilenglicol bis[imidazoilcarbonil]); alcoholes polioxietilénicos, como por ejemplo Brij® 30 (éter laurílico de polioxietileno(4)), Brij®35 (éter laurílico de polioxietileno(23)), Brij® 35P, Brij® 52 (éter cetílico de polioxietileno 2), Brij® 56 (éter cetílico de polioxietileno 10), Brij® 58 (éter cetílico de polioxietileno 20), Brij® 72  
55 (éter estearílico de polioxietileno 2), Brij® 76 (éter estearílico de polioxietileno 10), Brij® 78 (éter estearílico de polioxietileno 20), Brij® 78P, Brij® 92 (éter oleílico de polioxietileno 2); Brij® 92V (éter oleílico de polioxietileno 2), Brij® 96V, Brij® 97 (éter oleílico de polioxietileno(20)), Brij® 58P y Brij® 700 (éter estearílico de polioxietileno(100)); Cremophor® EL (polioxietilengliceroltriricinoleato 35; aceite de ricino polioxil 35); éster monododecílico de decaetilenglicol; éster monohexadecílico de decaetilenglicol; éster monotridecílico de  
60 decaetilenglicol; N-decanoil-N-metilglucamina; n-decil-alfa-D-glicopiranosido; decil-beta-D-maltopiranosido; digitonina; n-dodecanoil-N-metilglucamida; n-dodecil-alfa-D-maltósido; n-dodecil beta-D-maltósido; éster monododecílico de heptaetilenglicol; éster monododecílico de heptaetilenglicol; éster monotetradecílico de heptaetilenglicol; n-hexadecil beta-D-maltósido; éster monododecílico de hexaetilenglicol; éster monohexadecílico de hexaetilenglicol; éster monoctadecílico de hexaetilenglicol; éster monotetradecílico de hexaetilenglicol; Igepal® CA-630 (nonilfenil-  
65 polietilenglicol, (octilfenoxi)polietoxietanol, octilfenil-polietilenglicol); metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-alfa-D-

glicopiranosido; éter monododecílico de nonaetilenglicol; N-nonanoil-N-metilglucamina; éter monododecílico de octaetilenglicol; éter monododecílico de octaetilenglicol; éter monohexadecílico de octaetilenglicol; éter mono-octadecílico de octaetilenglicol; éter monotetradecílico de octaetilenglicol; octil-beta-D-glicopiranosido; éter monododecílico de pentaetilenglicol; éter monododecílico de pentaetilenglicol; éter monohexadecílico de pentaetilenglicol; éter monohexílico de pentaetilenglicol; éter mono-octadecílico de pentaetilenglicol; éter mono-octílico de pentaetilenglicol; éter diglicídico de polietilenglicol; éter de polietilenglicol W-1; éter tridecílico de polioxietileno 10; estearato de poli-oxietileno 100; éter isohexadecílico de polioxietileno 20; éter oleílico de polioxietileno 20; estearato de polioxietileno 40; estearato de polioxietileno 50; estearato de polioxietileno 8; polioxietileno bis(imidazolilcarbonil); estearato de polioxietileno 25 propilenglicol; saponina de corteza de quillay; ésteres del ácido graso sorbitano, por ejemplo Span® 20 (monolaurato de sorbitano), Span® 40 (monopalmitato de sorbitano), Span® 60 (monoestearato de sorbitano), Span® 65 (triestearato de sorbitano), Span® 80 (monooleato de sorbitano) y Span® 85 (trioleato de sorbitano); los diferentes éteres alquílicos de polietilenglicoles, como por ejemplo Tergitol® Tipo 15-S-12, Tergitol® Tipo 15-S-30, Tergitol® Tipo 15-S-5, Tergitol® Tipo 15-S-7, Tergitol® Tipo 15-S-9, Tergitol® Tipo NP-10 (etoxilato de nonilfenol), Tergitol® Tipo NP-4, Tergitol® Tipo NP-40, Tergitol® Tipo NP-7, Tergitol® Tipo NP-9 (éter de nonilfenolpolietilenglicol), Tergitol® MIN FOAM IX, Tergitol® MIN FOAM 2X, Tergitol® Tipo TMN-10 (éter polietilenglicoltrimetilnonílico), Tergitol® Tipo TMN-6 (éter polietilenglicoltrimetilnonílico), Triton® 770, Triton® CF-10 (éter bencil-polietilenglicol-terc-octilfenílico), Triton® CF-21, Triton® CF-32, Triton® DF-12, Triton® DF-16, Triton® GR-5M, Triton® N-42, Triton® N-57, Triton® N-60, Triton® N-101 (éter nonilfenílico de polietilenglicol; éter nonilfenílico de polioxietileno ramificado), Triton® QS-15, Triton® QS-44, Triton® RW-75 (éter mono(hexadecil/octadecílico de polietilenglicol 260) y 1-octadecanol), Triton® SP-135, Triton® SP-190, Triton® W-30, Triton® X-15, Triton® X-45 (éter 4-terc-octilfenílico de polietilenglicol; 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton® X-100 (t-octilfenoxipolietoxietanol; éter terc-octilfenílico de polietilenglicol; 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton® X-102, Triton® X-114 (éter terc-octilfenílico de polietilenglicol; (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Triton® X-165, Triton® X-305, Triton® X-405 (éter isooctilciclohéxico de polioxietileno(40); éter terc-octilfenílico de polietilenglicol), Triton® X-705-70, Triton® X-151, Triton® X-200, Triton® X-207, Triton® X-301, Triton® XL-80N y Triton® XQS-20; tetradecil-beta-D-maltósido; éter monododecílico de tetraetilenglicol; éter monododecílico de tetraetilenglicol; éter monotetradecílico de tetraetilenglicol; éter monododecílico de trietilenglicol; éter monododecílico de trietilenglicol; éter monohexadecílico de trietilenglicol; éter mono-octílico de trietilenglicol; éter monotetradecílico de trietilenglicol; ésteres del ácido graso polioxietileno sorbitano, por ejemplo TWEEN® 20 (monolaurato de polietilenglicol sorbitano), TWEEN® 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), TWEEN® 21 (monolaurato de polioxietileno (4) sorbitano), TWEEN® 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitano), TWEEN® 60 (monoestearato de polietilenglicol sorbitano; monoestearato de polioxietileno (20) sorbitano), TWEEN® 61 (monoestearato de polioxietileno (4) sorbitano), TWEEN® 65 (triestearato de polioxietileno (20) sorbitano), TWEEN® 80 (monooleato de polietilenglicol sorbitano; monooleato de polioxietileno (20) sorbitano), TWEEN® 81 (monooleato de polioxietileno (5) sorbitano) y TWEEN® 85 (trioleato de polioxietileno (20) sorbitano); tiloxapol; n-undecil-beta-D-glicopiranosido, CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato); CHAPSO (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato); N-dodecilmaltósido; alfa-dodecilmaltósido; beta-dodecilmaltósido; sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato (SB3-10), sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato (SB3-10), sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato (SB3-12), sal interna de 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato (SB3-14), sal interna de 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato (SB3-16), sal interna de 3-(N,N-dimetil-octadecilamonio)propanosulfonato (SB3-18); MEGA-8; MEGA-9; MEGA-10; metilheptilcarbamoil glicopiranosido; N-nonanoil N-metilglucamina; octilglicopiranosido; octil-tioglicopiranosido; octil-beta-tioglicopiranosido; 3-[N,N-dimetil(3-miristoilaminopropil)amonio]propanosulfonato o amidosulfobetaina-14 (ASB-14); amidosulfobetaina-16 (ASB-16); EMPIGEN® BB; Cymal-1, Cymal-2, Cymal-5, Cymal-6 y ácido desoxicólico.

**[0106]** Preferentemente, en los procedimientos según la invención, el detergente se selecciona entre el grupo constituido por CHAPS, Tween 20, Tween 80, c7bzo, octilglucósido, octiltioglicopiranosido, ASB-14, SB3-10, dodecilsulfato de sodio, digitonina, sarcosil y tergitol.

**[0107]** El agente de lisis puede ser asimismo una enzima que degrada la pared bacteriana tal como lisozima, lisostafina, acromopeptidasa, mutanolisina, labiasa, quitinasa, gluconasa, glucosaminidasa, muramidasa, transglucosilasa lítica, amidasa y endopeptidasa.

**[0108]** El agente de lisis puede ser un agente causante de la formación de poros en la pared bacteriana o la membrana celular como por ejemplo una polimixina, en particular una polimixina A, B, C, D, E (o colistina), F, K, M, P, S o T. Las polimixinas son antibióticos peptídicos cíclicos que actúan como detergentes catiónicos y se insertan entre los fosfolípidos de la pared bacteriana. Puede tratarse también de  $\beta$ -lactamas, glucopeptidos, fosfomicina, cicloserina, bacitracina, ácido fusídico o neomicina.

**[0109]** Durante la etapa b1) de puesta en suspensión, el sustrato cromogénico o fluorogénico puede ponerse además en presencia de al menos un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa. La solución donde los microorganismos se vuelven a poner en suspensión puede comprender así además al menos un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa, en particular al menos un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa seleccionado entre el grupo constituido por un inhibidor de cefalosporinasa, un inhibidor de serina  $\beta$ -lactamasa, un agente de quelación de metal y un inhibidor de BLEE.

**[0110]** Los ejemplos de inhibidores de  $\beta$ -lactamasa son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen en particular cloxacilina, compuesto syn2190, aztreonam, ácido borónico y derivados de los mismos tales como ácido 3-amino-fenilborónico, ácido fenilborónico, ácido benzo(b)tiofen-2-borónico, ácido meta-carboxifenilborónico; ácido clavulánico, sales del ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam; ácido dipicolínico (DPC), dietilditiocarbamato (DEDTC), N,N,N',N'-tetraquis-(2-piridilmetil)-etilendiamina (TPEM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS) y 1,10- fenantrolina; ceftazidima, una sal de ceftazidima, cefotaxima y una sal de cefotaxima; monobactama sidérforo BAL30072, 2-amino-4-tiazolil metoxiimino-penicilina (ATMO-penicilina); C-6-mercaptometil penicilinato; metilidenpenem BRL 42715; metilidenepenem BLI-489; alquilidenpenemes; metilidenpenemes tri- y bicíclicos; carbapenem tricíclico LK-157; 1-b-metilcarbapenem 225; sulfona de penamo Ro 48-1220; sulfona de penamo LN-1-255; la sal de sodio de trans-7-oxo-6-(sulfoxi)-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octan-2-carboxamida (NXL104); fosfonatos y derivados de los mismos tales como acilfosfonatos cíclicos; penicilinas tales como JDB/LN-I-255; cefalosporinas sulfónicas como JBB/DVR-II-214. Es conocido que la elección de uno o varios inhibidores para su uso puede depender del tipo de enzima que se desea detectar (WO2009/051838).

**[0111]** Preferentemente, los microorganismos se dejan en suspensión en la solución que comprende un sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención a una temperatura y durante un periodo apropiado para permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima y detectar una posible liberación del cromóforo o fluoróforo. Tales condiciones son bien conocidas para el experto en la materia y son funciones del sustrato cromogénico o fluorogénico usado. Normalmente, los microorganismos se dejan en incubación durante 5 min a 2 h, a una temperatura comprendida entre 15 y 42°C. La liberación del cromóforo o fluoróforo, que se caracteriza por un cambio de color del sustrato cromogénico o de emisión de fluorescencia del sustrato fluorogénico, puede observarse entonces directamente en solución.

**[0112]** Los procedimientos según la invención ofrecen la ventaja de que disminuyen de manera importante el tiempo al cabo del cual es posible detectar la presencia de una enzima de un microorganismo en una muestra biológica. Esta ganancia de tiempo proviene en particular del hecho de que los procedimientos según la invención no comprenden etapa de cultivo de los microorganismos en un medio selectivo que contiene un antibiótico específico. En particular, no comprenden etapa de selección ni de inducción de microorganismos en medio de gelosa.

**[0113]** Cuando la muestra biológica es una muestra que contiene sangre o hematíes, el procedimiento de detección según la invención puede comprender además una etapa de lisis de los hematíes presentes en la muestra biológica antes de la etapa de puesta en suspensión, como se describe en la sección "*Etapa de lisis*" anterior.

35 *Procedimiento de preparación de una muestra de hemocultivo*

**[0114]** La presente solicitud describe asimismo un procedimiento de preparación *in vitro* de una muestra de hemocultivo que comprende microorganismos, que comprende las etapas que consisten en:

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

**[0115]** Preferentemente, el procedimiento de preparación anterior permite obtener microorganismos en los que es posible aplicar la etapa a1) de los procedimientos de detección tal como se define anteriormente.

**[0116]** La etapa A) de lisis de los hematíes puede implementarse normalmente tal como se indica anteriormente en la sección "*Etapa de lisis*", poniendo en contacto la muestra de hemocultivo con un tampón de lisis de glóbulos rojos tal como el tampón de lisis RBC, durante un periodo apropiado, por ejemplo, entre 1 min y 10 min, a una temperatura apropiada, por ejemplo, a temperatura ambiente o a 37°C, para permitir la lisis de los hematíes.

**[0117]** La etapa A) de aglutinación de los hematíes puede implementarse normalmente tal como se indica anteriormente en la sección "*Etapa de aglutinación*" poniendo en contacto el hemocultivo con al menos un agente de aglutinación tal como se define anteriormente.

**[0118]** La etapa B) de separación de microorganismos presentes en la muestra de hemocultivo puede implementarse mediante cualquier técnica apropiada bien conocida por el experto en la materia. La etapa de separación de microorganismos puede implementarse en particular por centrifugación, filtrado o extracción de la fase acuosa, por ejemplo, después de decantación. Preferentemente, la etapa de separación de microorganismos se implementa por centrifugación.

**[0119]** La etapa opcional de lavado puede implementarse normalmente por resuspensión de los microorganismos separados en un tampón de lavado, tal como el tampón de lisis RBC, incubación durante un periodo



apropiado, a una temperatura apropiada, y nueva separación de los microorganismos, por ejemplo, por centrifugación.

*Procedimiento de detección in vitro de microorganismos*

5 **[0120]** Como se indica anteriormente, en los procedimientos de detección *in vitro* de enzimas según la invención, las enzimas que se van a detectar son producidas por microorganismos determinados. La presencia de la enzima que se va a detectar significa así que el microorganismo que produce esta enzima está presente en la muestra biológica.

10 **[0121]** En consecuencia, la presente solicitud describe asimismo un procedimiento de detección *in vitro* de microorganismos a partir de una muestra biológica que implementa el procedimiento de detección de enzimas tal como se define anteriormente.

**[0122]** En particular, la presente solicitud describe un procedimiento de detección *in vitro* de un microorganismo a partir de una muestra biológica que comprende las etapas que consisten en:

a1) concentrar los microorganismos presentes en la muestra biológica, opcionalmente después de una etapa a0) de cultivo de los microorganismos tal como se define anteriormente;

20 b1) poner en suspensión los microorganismos concentrados en la etapa a1) en una solución que comprende al menos un sustrato cromogénico o fluorogénico susceptible de liberar un cromóforo o un fluoróforo después de hidrólisis por una enzima del microorganismo que se va a detectar tal como se define anteriormente;

c1) detectar la posible liberación del cromóforo o fluoróforo obtenida en la etapa b1); siendo la liberación del cromóforo o fluoróforo detectada en la etapa c1) indicativa de la presencia del microorganismo que se va a detectar.

25 **[0123]** La detección de la liberación del cromóforo o fluoróforo del sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención es así indicativa de la presencia de microorganismos que expresan la enzima específica del sustrato cromogénico o fluorogénico según la invención.

**[0124]** Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

30

**Ejemplo 1: Detección de β-lactamasa que confiere a los microorganismos que la producen una resistencia a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, directamente a partir de orinas, sin etapa de crecimiento bacteriano**

**[0125]** Este ejemplo muestra que es posible identificar enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación (C3G) directamente a partir de orina.

35

**[0126]** Se recogieron dos orinas de sujetos sanos (un hombre y una mujer). Se inoculó cada una de estas orinas de forma separada por diferentes cargas de dos cepas de *Escherichia coli* (T434 = resistente a las C3G que tienen una actividad β-lactamasa importante; ATCC 25922 = sensible).

40

**[0127]** Brevemente, se inoculó 1 ml de orina con 1, 10 o 100 μL de una suspensión bacteriana a 0,5 McFarland (McF). Se centrifugaron los tubos a 3.000 g o 6.000 g opcionalmente con lavados.

**[0128]** Al depósito bacteriano obtenido se añadieron 20 μL de una solución que comprendía 0,8 g/L de sustrato HMRZ-86 y 20 μL de CHAPS a 20 g/L. Después de la mezcla en vórtice durante 10 segundos, se dejó el tubo durante 45 30 min a temperatura ambiente.

45

**[0129]** Los autores de la invención observaron una reacción positiva para el inóculo más fuerte. Así, fue visible un viraje del amarillo hacia el naranja con la cepa resistente cuando su número alcanzaba 6.10<sup>6</sup> ufc/mL mientras que 50 con la cepa sensible no fue visible ningún viraje.

**Ejemplo 2: Detección de β-lactamasa que confiere a los microorganismos que la producen una resistencia a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, con una etapa de crecimiento bacteriano**

55 **[0130]** Esta prueba se realizó en microplaca.

**[0131]** Cada pocillo contenía

- 50 μL de HMRZ-86 disueltos en medio TCS 60 g/L tamponado (tampón de fosfato 0,2 M pH 6)

60

- 40 μL de CHAPS o H<sub>2</sub>O

- 10 μL de una suspensión bacteriana densa (5 McF, > 10<sup>8</sup> ufc/ml).

**[0132]** Se observaron las microplacas cada hora para detectar un posible viraje de color.

65 **[0133]** Al cabo de 3 h, por ejemplo, en un panel de 8 cepas resistentes y 4 cepas sensibles, con 0,4 g/L de

HMRZ-86 y entre 10 y 20 g/L de CHAPS, y un inóculo fuerte, se obtuvieron los resultados que se presentan en la **tabla 2**.

**Tabla 2**

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

5

**[0134]** Al cabo de 3h30, en otro ejemplo, en un panel de 8 cepas resistentes y 4 cepas sensibles con 0,4 g/L de HMRZ-86, en presencia o no de 5 g/L de CHAPS y a partir de un inóculo fuerte, se obtuvieron los resultados presentados en la **tabla 3**.

10

**Tabla 3**

	Ausencia de CHAPS		Presencia de CHAPS	
	Cepa resistente	Cepa sensible	Cepa resistente	Cepa sensible
Viraje «significativo»	4		6	
Viraje dudoso	1	1		
Ausencia de viraje	3	3	2	4

**[0135]** Así, la presencia de CHAPS favorece la reacción en el caso de una etapa de crecimiento bacteriano previa.

**Ejemplo 3: Detección de  $\beta$ -lactamasa que confiere a los microorganismos que la producen una resistencia a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, directamente a partir de hemocultivo**

**[0136]** Este ejemplo muestra que es posible identificar enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación (C3G) directamente a partir de hemocultivo.

**[0137]** Para estudiar la posibilidad de detección de cepas resistentes a las C3G en los hemocultivos, el protocolo adoptado fue el siguiente (nota: las variantes al protocolo que no conllevan variación en el rendimiento de los resultados se anotan entre paréntesis. Se han aplicado en 2 cepas, una sensible y una resistente. Se observó un viraje de color para la cepa resistente y no se observó ningún viraje para la cepa sensible): Se añadieron 7,5 mL de medio obtenido de matraz de hemocultivo (bacTAlert; ref 259791 o 259793) de 2,5 mL de sangre de cordero defibrinada. Se añadieron 25  $\mu$ L de una suspensión bacteriana a 0,5 McF. Después de homogeneización en vórtice e incubación durante 18-20 h a 37°C, se extrajeron 500  $\mu$ L. Se añadieron 0,5 mL [o 1 mL] de una solución de lisis de glóbulos rojos modificada que contenía principalmente NH<sub>4</sub>Cl pero no contenía EDTA (SL). Después de homogeneización en vórtice, se incubó el tubo 10 min a 37°C, [o 1 min a 37°C o 1 min a temperatura ambiente]. Se resuspendió un depósito, recuperado después de una centrifugación a 750 g durante 5 min [o 2 min], en 200  $\mu$ L de SL y se dejó durante 2 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 mL de PBS 0,1 M. Se volvió a centrifugar el tubo a 750 g durante 5 min [o 2 min], y se retomó el depósito en una solución que comprendía 50  $\mu$ L de sustrato HMRZ-86 (1,2 g/L) y 50  $\mu$ L de CHAPS (30 g/L). Después de homogeneización en vórtice, se puso el tubo en incubación durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 750 g durante 5 min [o 2 min], se observó el cambio de color.

**[0138]** La prueba se realizó en 4 cepas de las que 3 cepas eran resistentes a las C3G (de ellas 2 metalo- $\beta$ -lactamasas cuya reacción se inhibía en presencia del medio de cultivo), y una sensible.

**[0139]** Se realizó un ensayo en los dos medios de hemocultivo (aerobio y anaerobio) en un panel mayor. En medio aerobio, 17 cepas resistentes a las C3G de 18 respondieron positivamente a la prueba y 6 cepas sensibles de 8 no mostraron viraje significativo de tinción. En medio anaerobio, 16 cepas resistentes a las C3G de 18 respondieron positivamente a la prueba y 6 cepas sensibles de 8 no mostraron viraje significativo de tinción.

**[0140]** Se realizaron asimismo ensayos a partir de matraces de medio para hemocultivo suplementados con

sangre total humana.

**[0141]** Se siguieron diferentes protocolos:

- 5 Se añadieron 7,5 mL de medio obtenido del matraz de hemocultivo (bacTAlert; ref 259791 o 259793) de 2,5 mL de sangre total humana. Se añadieron 25  $\mu$ L de una suspensión bacteriana a 0,5 McF. Después de homogeneización en vórtice, se incubó el tubo durante 18-20 h a 37°C.

Protocolo de lisis

- 10 **[0142]** Se extrajeron 0,5 ml de hemocultivo y se añadieron 0,5 mL de tampón de lisis. Se dejó la mezcla en contacto durante 10 min y después se centrifugó 2 min a 750 g. El depósito se sometió a continuación dos veces al mismo protocolo (adición del tampón de lisis y después centrifugación). A continuación, se volvió a poner en una solución que comprendía 50  $\mu$ L de sustrato HMRZ-86 (1,2 g/L) y 50  $\mu$ L de CHAPS (30 g/L). Después de homogeneización en vórtice, se incubó el tubo durante 15 min a temperatura ambiente. Se anotó todo cambio de color  
15 después de centrifugación durante 2 min a 750 g.

Protocolo de «aglomeración - filtrado en filtro para centrifugar»

- [0143]** Se depositaron 50 mg de PEG en un filtro para centrifugar de tipo «Filtros para centrifugación Millipore  
20 Ultrafree MC centrifugal filter units 5  $\mu$ m». Se extrajeron 0,5 mL de hemocultivo y se depositaron en el filtro y se dejaron en contacto con el PEG durante 5 min. Después de una centrifugación de 5 min a 5.500 g (que permitió el filtrado) y de la eliminación del sobrenadante encima del filtro, se trató el filtrado con 1 mL de tampón de lisis durante 10 min. Se centrifugó el tubo durante 5 min a 5.500 g, se eliminó el sobrenadante.
- 25 **[0144]** A continuación, se volvió a colocar el depósito en una solución que comprendía 50  $\mu$ L de sustrato HMRZ-86 (0,8 g/L) y 50  $\mu$ L de CHAPS (20 g/L). Después de homogeneización en vórtice, se incubó el tubo durante 15 min a temperatura ambiente, y a continuación se anotaron todos los cambios de color.

Protocolo de «aglomeración - decantación»

- 30 **[0145]** Se extrajo 1 ml de hemocultivo y se añadieron 200 mg de PEG. Se dejó decantar la mezcla durante 15 min. Se colocaron 500  $\mu$ L de sobrenadante en otro tubo. Después de una centrifugación de 5 min a 5.500 g y de la eliminación del sobrenadante, se trató el depósito con 1 mL de tampón de lisis, y después de 10 min se sometió a una nueva centrifugación de 5 min a 5.500 g.  
35
- [0146]** A continuación, se volvió a colocar el depósito en una solución que comprendía 50  $\mu$ L de sustrato HMRZ-86 (0,8 g/L) y 50  $\mu$ L de CHAPS (20 g/L). Después de homogeneización en vórtice seguida de una incubación de 15 min a temperatura ambiente, se anotaron todos los cambios de color.
- 40 **[0147]** El conjunto de estos tres protocolos permite limitar la tinción roja debida al hemocultivo y la identificación rápida de las C3GR.

**[0148]** Se aplicaron a una cepa C3GR y una cepa C3GS: la prueba con la cepa C3GR mostraba una tinción roja intensa mientras que la prueba con la cepa C3GS seguía siendo amarilla anaranjada.

- 45 **Ejemplo 4: Detección de la actividad glucosidasa de *Candida tropicalis* (sustrato: 5-bromo 4-cloro 3-indolil  $\alpha$ -glucósido) de *Enterococcus faecalis* (sustrato: 5-bromo 4-cloro 3-indolil  $\beta$ -glucósido) y de la actividad esterasa de *Pseudomonas aeruginosa* o de *Salmonella enteritidis* (sustrato: 5-bromo 4-cloro 3-indolil butirato) directamente a partir de orina**

- 50 **[0149]** Se contaminaron artificialmente orinas provenientes de sujetos sanos. Para ello, se preparó una suspensión bacteriana a 0,5 McF (aproximadamente  $10^{7-8}$  ufc/ml) en agua fisiológica. Se centrifugó esta suspensión durante 5 min a 6-000 g y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se volvió a colocar el depósito en 1 mL de orina de manera que se obtuvo una concentración de aproximadamente  $10^{7-8}$  ufc/ml de orina. Se incubó la orina  
55 contaminada durante 15 a 30 min. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 6.000 g y se eliminó el sobrenadante. Se volvió a colocar el depósito en una solución que comprendía 50  $\mu$ L de sustrato cromogénico 2X y 50  $\mu$ L de detergente 2X. Se observó el viraje de color después de 30 min de incubación a temperatura ambiente.

- 60 **[0150]** Los resultados obtenidos en la prueba de detección de actividad glucosidasa se presentan en las **tablas 4 y 5**.

**Tabla 4**

	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750
Sustrato	X- $\alpha$ -glucósido
Tiempo de lectura	30 min
Tampón de fosfato 0,1 M pH 7 (Tp)	Blanco
Tp + Digitonina 0,5 g/L	<b><u>Azul</u></b>
Tp + OTG 5 g/L	<b><u>Azul</u></b>
(OTG = Octil- $\beta$ -tioglucopiranosido; X = 5-bromo 4-cloro 3-indolil).	

**Tabla 5**

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

5

[0151]  
y 7.

Los resultados obtenidos en la prueba de detección de actividad esterasa se presentan en las **tablas 6**

10

**Tabla 6**

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

**Tabla 7**

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

15

[0152]

Se ha ensayado la influencia de la temperatura y del tiempo de incubación (véase **tabla 8**).

**Tabla 8**

Sustrato	<i>P. aeruginosa</i> RDC 45		
	X-butilato		
Tiempo de lectura	1 h a TA	45 min a 37°C	1h15 a 37°C
Testigo negativo sin bacteria en Tp (Tampón de fosfato 0,1 M pH 7)	ND	Blanco	Blanco
Tp	ND	Blanco	Reflejo azul (RB)
Tp + CHAPS 10g/L	Blanco	Blanco	<b>RB</b>
Tp + PoliB 250mg/L	<b>RB-</b>	<b>Azul claro</b>	<b>Azul</b>
Tp + CHAPS + PoliB	<b>RB-</b>	<b>Azul claro</b>	<b>Azul -</b>

ND: no determinado

**Ejemplo 5: Detección de  $\beta$ -lactamasa que confiere a los microorganismos que la producen una resistencia a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación, directamente a partir de hemocultivos positivos a bacilos gramnegativos.**

5

**[0153]** Este ejemplo muestra que es posible detectar la resistencia a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación (C3G) en enterobacterias u otros bacilos gramnegativos como las *Pseudomonas* directamente a partir de hemocultivo.

**[0154]** El estudio se realizó de forma prospectiva a partir de hemocultivos positivos a bacilos gramnegativos aerobios. El protocolo mostrado a continuación se realizó el mismo día en que los hemocultivos se detectaron como positivos por medio del autómata (BacT/ALERT de Biomérieux).

Protocolo de lisis

15 **[0155]** Se extrajeron 0,5 ml de hemocultivo y se añadieron 0,5 mL de tampón de lisis. Se agitó la mezcla brevemente

en vórtice y a continuación se dejó en contacto durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó una etapa de centrifugación (2 min a 3.000 rpm) y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se sometió el depósito dos veces a las etapas siguientes: adición de 1 mL de tampón de lisis, breve agitación en vórtice, espera de 10 min, y después centrifugación de 2 min a 3.000 rpm y eliminación del sobrenadante. A continuación, se volvió a colocar el depósito en una solución que comprendía 50  $\mu$ L de sustrato HMRZ-86 (1,2 g/L) y 50  $\mu$ L de CHAPS (30 g/L). Después de homogeneización en vórtice, se incubó el tubo durante 15 min a temperatura ambiente. Se anotaron todos los cambios de color después de la centrifugación de 2 min a 3.000 rpm.

25

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

**Tabla 9**

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

30

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

**Tabla 10**

	<b>Cepas resistentes</b>	<b>Cepas sensibles</b>
Viraje «significativo»	4	1
Viraje dudoso	-	-
Ausencia de viraje	-	14

**[0158]** Este ejemplo muestra así que el protocolo de lisis permite la detección de  $\beta$ -lactamasa que confiere a los bacilos gramnegativos aerobios que la producen una resistencia a las cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> generación directamente a partir de hemocultivos positivos. Aparte de una cepa C3GS que se detectó como 'falso positivo', la prueba realizada con las cepas C3GS mostró una tinción de color amarillo claro a amarillo anaranjado mientras que la prueba con las cepas C3GR viró de amarillo a rojo intenso.

**REIVINDICACIONES**

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