

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 172**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/10 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2018 PCT/GB2018/052255**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2019 WO19030519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2018 E 18758681 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.07.2021 EP 3665299**

54 Título: **Detección de especies de pseudomonas, acinetobacter y enterobacteriales productoras de carbapenemasas utilizando un cromógeno**

30 Prioridad:

07.08.2017 GB 201712671

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

16.03.2022

73 Titular/es:

**MAST GROUP LIMITED (100.0%)
Mast House Derby Road Bootle
Liverpool, Merseyside L20 1EA, GB**

72 Inventor/es:

**HOBSON, JONATHAN ANTHONY;
COLEBORN, MATILDA MAY;
DAVIES, MYA y
ANYAKWO, ANDREW CHUKA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 900 172 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

Detección de especies de *pseudomonas*, *acinetobacter* y enterobacteriales productoras de carbapenemasas utilizando un cromógeno

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacteriales productoras de carbapenemasas en una muestra y kits para su uso en dichos métodos.

Antecedentes

Las carbapenemasas son un grupo de β -lactamasas que presentan actividad frente a varios antibióticos, incluidos los carbapenémicos. Las carbapenemasas pertenecen a tres clases de β -lactamasas, a saber, la clase A de Ambler, la clase B de Ambler y la clase D de Ambler. Estas tres clases de carbapenemasas confieren, en bacterias de importancia clínica, resistencia a los carbapenémicos o una menor susceptibilidad a los mismos. Por lo tanto, las bacterias que producen carbapenemasas son de interés clínico y se necesitan métodos para su detección temprana con el fin de evitar su propagación y reducir la resistencia a múltiples fármacos o a todos los fármacos.

Hay dos pruebas ampliamente utilizadas en la práctica clínica para detectar bacterias productoras de carbapenemasas: la prueba Etest®, otros productos de tiras para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la prueba de Hodge modificada. En la prueba Etest®, un carbapenémico indicador y un carbapenémico junto con agentes antimicrobianos inhibidores de enzimas frente a un microorganismo problema se proporcionan en gradientes predefinidos opuestos sobre agar y se utilizan para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente antimicrobiano y el cociente de concentraciones inhibitorias. En la prueba de Hodge modificada, las bacterias productoras de carbapenemasas se detectan cuando las bacterias indicadoras proliferan hacia una placa que contiene carbapenémicos, produciendo un patrón característico de proliferación en forma de "hoja de trébol" alrededor de la placa. Este fenómeno puede estar mediado por las enzimas que inactivan los carbapenémicos producidas por la colonia aislada en la prueba. También se han utilizado técnicas de detección molecular de genes de carbapenemasas. Sin embargo, las tres pruebas tienen sus inconvenientes. El Etest® y la prueba modificada de Hodge no son lo suficientemente sensibles ni específicos, mientras que las técnicas de detección molecular son complicadas y caras. Además, los tres métodos de detección llevan mucho tiempo, siendo de hasta 24 horas el espacio de tiempo habitual para determinar si una muestra contiene bacterias productoras de carbapenemasas. Ello resulta insatisfactorio a la hora de controlar las infecciones hospitalarias y la transferencia de resistencia a fármacos.

Recientemente se han desarrollado técnicas acido-colorimétricas para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas que, según se ha notificado, reducen significativamente el tiempo de ensayo en comparación con la prueba Etest®, la prueba modificada de Hodge y las técnicas de detección molecular. En la patente WO2012/175637 se describe un método de este tipo en el que, concretamente, se notifican tiempos de ensayo inferiores a 2 horas. Sin embargo, las pruebas fenotípicas rápidas actuales muestran una escasa sensibilidad y especificidad en la detección de *Pseudomonas* (Heinrichs *et al.*, 2015) y *Acinetobacter* productoras de carbapenemasas en una muestra. En particular, podrían darse falsos negativos.

Asimismo, la detección rápida de Enterobacteriales productoras de carbapenemasas es clave para limitar la propagación de estos organismos y, aunque existen métodos fenotípicos y moleculares para detectarlas, ningún método de detección ha demostrado ser ideal para todas las situaciones (Lutgring et Limbago, 2016). Según el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST, 2018), los estudios taxonómicos recientes han acotado la definición de la familia de Enterobacteriales. En consecuencia, las Enterobacteriales son un orden de bacterias gramnegativas que incluye una sola familia; Enterobacteriales. Por lo tanto, la presente invención hará referencia al orden Enterobacteriales.

En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar un método para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacteriales productoras de carbapenemasas en una muestra que no solo sea sumamente específica y sensible, sino que también se pueda usar fácilmente en la práctica clínica.

Antecedentes de la técnica adicionales

[0007] En la patente EP1557473 se da a conocer una composición de reactivos destinada a ser utilizada para la detección de β -lactamasas que incluye como sustrato de detección de β -lactamasas ácido 3-[2,4-dinitroestiril]-7-(2-tienilacetamido)-3-cefem-4-carboxílico, o el ácido 7-[2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino)acetamido]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, y al menos un inhibidor de β -lactamasas seleccionado del grupo que consiste en ácido clavulánico, aztreonam, ácido etilendiaminotetraacético y cloxacilina, cuya composición puede detectar β -lactamasas rápida y fácilmente con una sensibilidad elevada. La presente invención también proporciona un kit de detección que incluye la composición de reactivos de detección. Además, la presente invención proporciona un método de detección de β -lactamasas en el que una muestra líquida que contiene una sustancia de interés a analizar se pone en contacto con la composición.

En la patente FR2956866 se da a conocer un método destinado a ser utilizado para detectar la presencia de una enzima que comprende cefalosporinas, β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y carbapenemasas, que comprende: (a) suspender las bacterias en una composición líquida que comprende un sustrato cromógeno o fluorógeno con capacidad de liberar un cromóforo o fluoróforo tras la hidrólisis por la enzima a detectar; y (b) detectar la posible liberación del cromóforo o fluoróforo, donde la detección de la liberación del cromóforo o fluoróforo en el paso (b) indica la presencia de una enzima, como cefalosporinas, BLEA y carbapenemasas.

En la patente WO2009/051838 se dan a conocer métodos y composiciones destinados a la detección de β -lactamasas específicas, incluidas carbapenemasas de serina de clase A, metalo- β -lactamasas, β -lactamasas de tipo AmpC y β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA). Se dice que los métodos incluyen métodos destinados a permitir la detección de la presencia de β -lactamasas específicas en muestras bacterianas en un plazo de 2 a 10 minutos.

En la patente WO2017/098206 se da a conocer un método para determinar si un microorganismo produce una p -lactamasa que hidroliza carbapenémicos o penémicos, que comprende: proporcionar una composición de reactivos que comprende un antibiótico que contiene una p -lactama, un inhibidor de p -lactamasas de espectro ampliado y/o un inhibidor de AmpC a los que la p -lactamasa que hidroliza carbapenémicos o penémicos es resistente, y un agente permeabilizador de la membrana que es ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), que permeabiliza la membrana externa del microorganismo; poner en contacto el microorganismo del que se sospecha que produce una p -lactamasa con la composición de reactivos; y cultivar el microorganismo con la composición de reactivos en un medio de cultivo que comprende un microorganismo indicador, donde una prueba positiva se determina por un aumento en la proliferación del microorganismo indicador. En esta patente también se da a conocer un sistema de ensayo enzimático y un kit para su uso en dicho método.

En la patente EP1325923 se da a conocer un compuesto cefémico, o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, diseñado para ser eficaz en la detección de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) para las que los antibióticos cefémicos de tercera generación son ineficaces. Más específicamente, en la presente patente se da a conocer un compuesto cefémico, o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, que se pretende utilizar para la detección de bacterias productoras de BLEA.

Sumario de la invención

Los inventores han descubierto que mediante la realización de un ensayo fenotípico que utiliza una cefalosporina cromógena, a saber, ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, es posible detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacterales productoras de carbapenemasas en espacios de tiempo muy breves.

En particular, el proceso de detección descubierto por los inventores no requiere la preexposición de las colonias aisladas a ningún agente que pudiera inducir o inhibir la expresión antes de comprobar la presencia de carbapenemasas, y que por lo tanto requiere un periodo adicional para obtener la información.

En un aspecto, los inventores han descubierto que es posible detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacterales productoras de carbapenemasas en muestras de pacientes de los que se sospecha que presentan una infección por dichas bacterias utilizando una cefalosporina cromógena, a saber, ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacterales productoras de carbapenemasas en una muestra de un paciente, que comprende: hacer reaccionar una muestra de la que se sospecha que tiene *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas con una solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, y detectar un cambio de color en el medio de reacción, donde un cambio de color de amarillo a rojo indica la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas en la muestra problema.

Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso del ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacterales productoras de carbapenemasas en una muestra.

Según un tercer aspecto, la presente invención también proporciona un kit para determinar si un microorganismo produce una β -lactamasa que hidroliza carbapenémicos, que comprende una placa de ensayo impregnada con ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, y un inhibidor de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), un inhibidor de AmpC o una mezcla de los mismos.

La invención también se refiere a una placa de microtitulación que comprende un pocillo o una serie de pocillos que comprenden ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-

carboxílico, o una sal del mismo, y su uso para detectar la presencia de productores de carbapenemasas en una muestra problema.

5 [0019] También se dan a conocer viales o tubos de microcentrifuga que comprenden ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, y su uso para detectar la presencia de productores de carbapenemasas en una muestra problema.

Descripción detallada de la invención

10 Los métodos que permiten la detección rápida de bacterias productoras de carbapenemasas son necesarios para adoptar las medidas necesarias para evitar la propagación de la resistencia a los antibióticos y conservar la eficacia de antibióticos, como los penémicos y los carbapenémicos. El método de la presente invención aborda esta necesidad proporcionando a un usuario resultados interpretables para determinar de una manera rápida y fiable si una muestra tiene bacterias productoras de carbapenemasas.

15 En particular, el método puede ser adecuado para proporcionar una prueba fenotípica rápida y fiable para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* spp. y Enterobacterales productoras de carbapenemasas. Por consiguiente, la presente invención proporciona de manera ventajosa un método adecuado para proporcionar una prueba fenotípica rápida y fiable para detectar la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas, como
20 *Pseudomonas aeruginosa*, que es posible que no se puedan analizar de forma rápida y fiable mediante otros métodos y/o pruebas conocidas. En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacterales productoras de carbapenemasas en una muestra, que comprende: hacer reaccionar una muestra de la que se sospecha que tiene *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas con una solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, y detectar un cambio de color
25 en el medio de reacción cuando las *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas están presentes en la muestra problema.

30 El método de la presente invención puede tener una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100% en la detección de la producción de carbapenemasas en Enterobacterales, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* spp.

35 El método de la invención se basa en el concepto de que el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, puede ser hidrolizado por una β -lactamasa, como una carbapenemasa. La hidrólisis del ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico da lugar a un cambio de color observable de amarillo a rojo.

40 Preferentemente, el método de la presente invención se lleva a cabo en muestras obtenidas a partir de un sujeto del que se sospecha que presenta una infección con bacterias productoras de carbapenemasas. La muestra puede ser cualquier muestra biológica obtenida a partir de un sujeto, como fluidos, tejidos o muestras celulares. Preferentemente, la muestra puede proceder de un cultivo celular aislado o ser una muestra de orina. La muestra se puede obtener mediante métodos conocidos a partir del sujeto, que puede ser un mamífero. Preferentemente, el sujeto del que se obtiene la muestra es una persona.

45 El método de la presente invención se puede utilizar para detectar cualquier bacteria productora de carbapenemasas, como Enterobacterales, *Pseudomonas* o *Acinetobacter*. Preferentemente, las bacterias productoras de carbapenemasas son de importancia clínica, como bacterias responsables de infecciones hospitalarias o extrahospitalarias.

50 Normalmente, la concentración de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, sustrato utilizado en el método de la invención, es de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml, más preferentemente de 1 mg/ml a 5 mg/ml y aún más preferentemente, de 2 mg/ml a 3 mg/ml.

55 Según algunas realizaciones, las bacterias productoras de carbapenemasas se lisan antes de la reacción con el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo. La lisis de las bacterias se puede realizar mediante cualquier técnica conocida. Opcionalmente, una cantidad de Enterobacterales, *Pseudomonas* o *Acinetobacter* spp. se puede resuspender en un tampón/reactivo de extracción de proteínas en un tubo de microcentrifuga o un vial antes de mezclar. El mezclado se puede realizar mediante un agitador vorticial durante un periodo adecuado de tiempo para garantizar un mezclado completo.
60 Preferentemente, el mezclado se puede lograr agitando la muestra en un agitador vorticial durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 segundos, por ejemplo, durante 5 segundos. A continuación, el tubo se puede incubar durante un periodo de entre 5 y 30 minutos a una temperatura adecuada. Opcionalmente, el tubo se puede incubar durante un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos. Las temperaturas adecuadas pueden ser de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 45 °C. Preferentemente, el tubo se puede incubar de
65 aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C.

En algunas realizaciones, la lisis de la muestra se facilita mediante la combinación de una polimixina, un glucopéptido y un antibiótico polipeptídico.

La reacción de la muestra, que puede ser una muestra lisada, con ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo se puede llevar a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para observar un cambio de color. Preferentemente, el cambio de color se debe observar en menos de 1 hora. Más preferentemente, el cambio de color se puede observar en menos de 30 minutos. Aún más preferentemente, se puede observar un cambio de color en un tiempo comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 minutos.

La reacción de la muestra con ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se puede llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada. Preferentemente, la reacción se puede llevar a cabo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 40 °C. Por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, como, por ejemplo, a temperatura ambiente. Preferentemente, la reacción se puede llevar a cabo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C, y aún más preferentemente, a 35 °C.

El ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico (una cefalosporina cromógena), o una sal del mismo, es también susceptible a hidrolizarse por β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y AmpC. Sin embargo, el efecto de las enzimas BLEA y AmpC se puede eliminar mediante la adición de compuestos inhibidores adecuados. Por consiguiente, cuando dichos inhibidores están presentes, un cambio de color indica la presencia de una carbapenemasa.

Por consiguiente, en una realización, el método además comprende un inhibidor de β -lactamas de espectro ampliado (BLEA), un inhibidor de AmpC o una mezcla de los mismos. Se puede utilizar cualquier inhibidor adecuado. Algunos inhibidores adecuados son el ácido clavulánico, la cloxacilina y mezclas de los mismos. Opcionalmente, el inhibidor comprende al menos uno de ácido clavulánico a una concentración de aproximadamente 30 μ g/ml a aproximadamente 50 μ g/ml y cloxacilina a una concentración de aproximadamente 300 μ g/ml a aproximadamente 500 μ g/ml. Cuando el inhibidor comprende ácido clavulánico y cloxacilina, éstos se pueden mezclar en partes iguales para obtener la mezcla de inhibidores. Como otra posibilidad, se pueden utilizar cantidades diferentes y/o componentes adicionales. Además, se podría utilizar cualquier carbapenémico o penémico solo o en combinación, con los inhibidores de BLEA y AmpC para eliminar aún más la actividad de BLEA y AmpC.

La selección de inhibidores que inhiben β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y AmpC permite visualizar el espectro completo de expresión de las carbapenemasas.

En una realización de la presente invención, el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se puede disolver en una solución que comprende al menos uno de un disolvente orgánico, un ácido orgánico y sulfato de zinc. Opcionalmente, el disolvente orgánico puede ser un disolvente aprótico polar. Un disolvente adecuado puede ser el DMSO. El ácido orgánico puede ser cualquier ácido orgánico adecuado. Los ácidos orgánicos adecuados pueden incluir los del grupo de los ácidos dicarboxílicos saturados lineales, como el ácido oxálico, el ácido malónico, el ácido succínico, el ácido glutárico, el ácido adípico, el ácido pimélico, el ácido subérico, el ácido azelaico o el ácido sebáico.

Se entenderá que la reacción de la muestra se puede llevar a cabo utilizando una secuencia secuencial de pasos, por ejemplo, incluyendo al menos alguno de mezclar una mezcla de inhibidores, disolver ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo en una solución que comprende al menos uno de un disolvente orgánico, un ácido orgánico y sulfato de zinc, suspendiendo una cantidad de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacteriales productoras de carbapenemasas en una cantidad de reactivo extractor de proteínas, para textear y/o calentar las *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacteriales productoras de carbapenemasas suspendidas a fin de producir una muestra viva, y añadir el lisado a la muestra a la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico (o una sal del mismo) con una cantidad de la mezcla inhibidora.

En otras realizaciones, el proceso de reacción se puede llevar a cabo mediante un proceso de reacción no secuencial, en el que tres o más o de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, un disolvente orgánico, un ácido orgánico, sulfato de zinc se añaden a una muestra de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacteriales productoras de carbapenemasas y se lisan *in situ* simultáneamente con el proceso de reacción.

Por ejemplo, la reacción de la muestra se puede llevar a cabo utilizando una técnica de síntesis "en un solo recipiente" (*one-pot*) en la que una muestra no lisada se puede hacer reaccionar con ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, un disolvente orgánico y una sal orgánica. Opcionalmente, el disolvente orgánico puede ser DMSO y el ácido orgánico puede ser un ácido dicarboxílico saturado lineal, como el ácido succínico.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas en una muestra.

5 El ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, puede estar opcionalmente en forma de polvo. El ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se puede disolver en una
 10 mezcla de DMSO y ácido succínico, seguido de la adición de sulfato de zinc. Por ejemplo, el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitrostyryl)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se puede disolver en 1 parte de DMSO por 3-20 partes de ácido succínico, seguido de la adición de sulfato de zinc para dar una concentración final de 0,1 mM a 10 mM. Preferentemente, el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se puede disolver en 1 parte
 15 de DMSO por 5-9 partes de ácido succínico. Opcionalmente, el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se puede disolver en una parte de DMSO por 7 partes de ácido succínico, seguido de la adición de sulfato de zinc para dar una concentración final de 1 mM.

Se puede añadir una cantidad de muestra de células lisadas o enteras en partes aproximadamente iguales a la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-
 20 carboxílico o una sal del mismo. La muestra de células lisadas o enteras se puede añadir a la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitrostilico)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, a temperatura ambiente. Opcionalmente, se pueden utilizar de aproximadamente 20 µl a aproximadamente 100 µl de la muestra lisada y la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitrostilico)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo.

25 También se puede añadir una cantidad de inhibidor. Se puede utilizar cualquier inhibidor adecuado o mezclas de los mismos en cantidades de 20 µl a aproximadamente 200 µl. Preferentemente, se pueden utilizar de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 150 µl de inhibidor. Opcionalmente, se pueden añadir aproximadamente 100 µl de un inhibidor que comprenda ácido clavulánico y cloxacilina en partes iguales hasta una concentración final de
 30 aproximadamente 40 µg/ml y 400 µg/ml.

Como otra posibilidad, se puede añadir un inhibidor o mezcla de inhibidores diferentes, o proporciones de los mismos, a una concentración final equivalente.

35 El contenido de la solución resultante se puede vigilar durante un período de hasta una hora, y preferentemente, durante hasta 30 minutos, para determinar si se produce un cambio de color. Preferentemente, la solución sólo se debe vigilar durante un período de tiempo de entre 5 y 30 minutos.

40 La aparición de un cambio de color de amarillo a naranja/rojo puede indicar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas en la muestra problema.

Para comprobar si una *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas está presente en una muestra problema, se puede suspender una cantidad de Enterobacterales, *Pseudomonas* o
 45 *Acinetobacter* spp. en un tampón/reactivo de extracción de proteínas. La solución se puede mezclar e incubar para producir una muestra lisada. Una porción de la muestra lisada se puede añadir a una cantidad de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitrostilico)-3-cefem-4-carboxílico o a una sal del mismo y, opcionalmente, a una cantidad de la mezcla de inhibidores, verificándose un ensayo positivo al observarse un cambio de color.

50 La cantidad de Enterobacterales, *Pseudomonas* o *Acinetobacter* spp. utilizada puede ser de aproximadamente 0,1 µl a aproximadamente 10 µl. Por ejemplo, se pueden utilizar aproximadamente 0,2 µl, 0,5 µl, 1 µl, 2 µl o 5 µl. La cantidad utilizada de reactivo de extracción de proteínas puede estar comprendida entre 50 µl y 250 µl. Por ejemplo, se pueden utilizar aproximadamente 50 µl, 75 µl, 100 µl o 150 µl. Preferentemente, se puede utilizar aproximadamente 1 µl de Enterobacterales, *Pseudomonas* o *Acinetobacter* spp. y aproximadamente 100 µl de tampón/reactivo de extracción de
 55 proteínas. Se puede utilizar cualquier tampón/reactivo de extracción de proteínas adecuado.

El mezclado se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica adecuada, incluidas, entre otras, agitación, sacudida y mezclado en agitador vorticial. Por ejemplo, la solución se puede mezclar en un agitador vorticial durante un período de aproximadamente 1 a 60 segundos, por ejemplo, durante aproximadamente 5 segundos. El mezclado puede tener
 60 lugar antes y/o durante la incubación para producir una muestra lisada. La incubación se puede realizar a cualquier temperatura adecuada y durante cualquier período de tiempo adecuado. Por ejemplo, la incubación se puede realizar a una temperatura de aproximadamente 30 a 45 °C, preferentemente de aproximadamente 35 a 37 °C, durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos, preferentemente durante aproximadamente 10 minutos.

65 Opcionalmente, la prueba se puede llevar a cabo con una muestra que no esté lisada.

Se puede añadir cualquier porción adecuada de la muestra lisada (o no lisada) a cualquier cantidad adecuada de la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitrostilico)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, opcionalmente con una cantidad de la mezcla de inhibidores. Opcionalmente, se pueden añadir de aproximadamente 10 µl a aproximadamente 100 µl, por ejemplo, aproximadamente 50 µl, de una muestra lisada (o no lisada) a aproximadamente 20-100 µl, por ejemplo, aproximadamente 50 µl, de la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, opcionalmente además de a aproximadamente 20-200 µl, por ejemplo, aproximadamente 100 µl, de la mezcla de inhibidores.

Preferentemente, la muestra, la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo y, opcionalmente, la mezcla de inhibidores, se pueden añadir a temperatura ambiente.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un kit para determinar si un microorganismo produce una β-lactamasa que hidroliza carbapenémicos, puede comprender una placa de ensayo impregnada con ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, y un inhibidor de β-lactamas de espectro ampliado (BLEA), un inhibidor de AmpC o una mezcla de los mismos.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un dispositivo microfluídico o un dispositivo de detección electroquímica para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas, donde el dispositivo comprende un sustrato que es ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo.

El dispositivo microfluídico puede ser cualquier dispositivo que dé resultados que se puedan leer fenotípicamente. Por ejemplo, el dispositivo microfluídico podría ser una película microcapilar.

El dispositivo de detección electroquímica podría ser cualquier dispositivo que dé una señal tras la hidrólisis del ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo. Por ejemplo, el dispositivo de detección electroquímica podría ser un electrodo, un chip, un kit o una membrana cargada con hierro.

La reacción de una muestra lisada con un kit de reactivos se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para observar un cambio de color en la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo cuando hay *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas en la muestra problema. Normalmente, el cambio de color se observa en menos de 1 hora y más preferentemente en menos de 30 minutos contados a partir del momento en que la muestra se mezcla con el tampón/reactivo. Normalmente, la reacción de la muestra con el kit de reactivos se lleva a cabo a una temperatura que va de 5 °C a 40 °C, preferentemente de 15 °C a 30 °C, y más preferentemente, a temperatura ambiente.

El kit de reactivos se puede utilizar para proporcionar una forma muy rápida de identificar una infección por *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas con una elevada fiabilidad y exactitud según el método de la presente invención.

Figuras

En la Figura 1 se muestran los resultados fenotípicos correspondientes a *Pseudomonas* spp.

En la Figura 2 se muestran los resultados fenotípicos correspondientes a *Acinetobacter baumannii*.

En la Figura 3 se muestran pruebas comparativas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* spp. utilizando un método de la presente invención y la técnica estándar.

En la Figura 4 se muestran los resultados fenotípicos correspondientes a la detección de Enterobacterales productoras de carbapenemasas.

La invención se ilustrará adicionalmente con los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Se preparó una solución problema que comprendía una mezcla de inhibidores y ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, y se utilizó para determinar la presencia de *Pseudomonas* o *Acinetobacter* productoras de carbapenemasas en una serie de muestras problema, como se indica en las Tablas 1 y 2.

La solución problema se preparó de la siguiente manera:

1) El ácido clavulánico y la cloxacilina se llevaron a una concentración final de 40 µg/ml y 400 µg/ml y se mezclaron en partes iguales para formar la mezcla de inhibidores.

2) El ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-

carboxílico, o una sal del mismo, en forma de polvo se disolvió en 1 parte de DMSO por 7 partes de ácido dicarboxílico, seguido de la adición de sulfato de zinc hasta una concentración final de 1 mM.

3) Un asa llena de 1 µl de *Pseudomonas* o *Acinetobacter* spp se suspendió en 100 µl de un tampón/reactivo de extracción de proteínas disponible en el mercado o en 100 µl de un tampón de extracción que comprende Tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM y Triton X100 al 1% en un tubo de microcentrífuga.

4) Las *Pseudomonas* o *Acinetobacter* spp. suspendidas se mezclaron con un agitador vorticial durante un periodo de 5 segundos antes de calentar la muestra en la microcentrífuga a 35-37 °C e incubarla durante un periodo de tiempo de 10 minutos para producir una muestra lisada.

5) Se añadieron 50 µl de la muestra lisada a 50 µl de la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, y 100 µl de la mezcla de inhibidores en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos a temperatura ambiente.

6) El contenido del pocillo se mezcló mediante pipeteado durante la adición del lisado celular.

7) La muestra se vigiló visualmente durante hasta 30 minutos, anotando el color de la solución a los 5, 10, 20 y 30 minutos contados a partir del mezclado de la muestra con la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo.

Tabla 1: Panel de *Pseudomonas* spp y resultado obtenido con el sustrato cromógeno candidato

Organismo	Resistencia a carbapenemasas	A TCC/ NCTC	10-100 µl de inhibidores			
			Resultado: Rojo/naranja = +(pos) Amarillo = -(neg)			
			Tiempo transcurrido tras la adición del sustrato, CX y CLV (minutos)			
			5	10	20	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	ATCC 27853 NCTC 12903	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	ATCC 25668 NCT 10662	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	NDM-1	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> spp.	NDM-1	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NDM-1	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	IMP-1	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	NDM-1	-	+	+	+	+

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-4	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIN-10	NCTC 13437	+	+	+	+

Como se muestra en la Tabla 1, el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, detectó satisfactoriamente las 9 *Pseudomonas* spp productoras de carbapenemasas. La sensibilidad del método de la presente invención fue del 100 %, al igual que la especificidad.

Los resultados fenotípicos correspondientes a *Pseudomonas* spp. se muestran en la Figura 1.

Estas pruebas muestran que el método de la presente invención es muy sensible en la detección de NDM-1, IMP y VIM en *Pseudomonas* spp. Además, se observa que, tras la adición de muestras bacterianas lisadas a temperatura ambiente, el color amarillo de la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo experimenta un cambio significativo a un color rojo en 5 minutos. Aunque se puede desarrollar un color rojo más intenso durante más tiempo, el cambio de color a los 5 minutos es suficiente para mostrar una reacción positiva.

Tabla 2: Panel de *Acinetobacter* spp y resultado obtenido con el sustrato cromógeno candidato

Organismo	Productor de carbapenemasas	A TCC/ NCTC	10-100 µl de inhibidores			
			Resultado: Rojo/naranja = +(pos) Amarillo = -(neg)			
			Tiempo transcurrido tras la adición del sustrato, CX y CLV (minutos)			
			5	10	20	30
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	ACTC 15309 NCTC 5866	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	MBL	-	+	+	+	+
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	No	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i>	OXA-23	NCTC	+	+	+	+

<i>baumanii</i>		13301				
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-25	NCTC 13302	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-26	NCTC 13303	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-27	NCTC 13304	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-58	NCTC 13305	+	+	+	+

Como se muestra en la Tabla 2, el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo detectó satisfactoriamente los 5 *Acinetobacter baumannii* que producían carbapenemasas. La sensibilidad del método de la presente invención fue del 100%, al igual que la especificidad.

Los resultados fenotípicos correspondientes a *Acinetobacter baumannii* se muestran en la Figura 2.

Estas pruebas muestran que el método de la presente invención es muy sensible en la detección de OXA en *Acinetobacter* spp. Además, se observa que, tras la adición de muestras bacterianas lisadas a temperatura ambiente, el color amarillo de la solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo experimenta un cambio significativo a un color rojo en 5 minutos. Aunque se puede desarrollar un color rojo más intenso durante más tiempo, el cambio de color a los 5 minutos es suficiente para mostrar una reacción positiva.

Ejemplo 2

Se preparó una solución problema según el método del Ejemplo 1 y se utilizó para evaluar cinco colonias aisladas de *Pseudomonas*; de estas, 4 colonias aisladas eran resistentes a los carbapenémicos y 1 no producía carbapenemasas. De las 4 colonias aisladas de *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas, 2 eran NDM-1, mientras que las 2 restantes eran VIM. También se analizaron seis colonias aisladas de *Acinetobacter*, de estas, 5 eran resistentes a los carbapenémicos y 1 no producía carbapenemasas. Las 5 colonias aisladas de *Acinetobacter* productoras de carbapenemasas eran OXA.

Las pruebas correspondientes a cada una de las colonias aisladas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* también se evaluaron utilizando la prueba colorimétrica disponible en el mercado para detectar cepas con una menor susceptibilidad a los carbapenémicos, conocida por el experto en la materia. Siguiendo las instrucciones estándar, las pruebas comparativas basadas en la técnica colorimétrica se realizaron a 35-37 °C, mientras que las pruebas realizadas según el método de la presente invención se realizaron a temperatura ambiente.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 3 y los cambios de color observados se muestran en la Figura 3.

La prueba incluía colonias aisladas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* como control negativo que consistía en una *Pseudomonas aeruginosa* sin carbapenemasas y una colonia aislada de *Acinetobacter lwoffii*. Todas las demás colonias aisladas producían carbapenemasas.

Tabla 3: Comparación de la mezcla de la solución problema que comprende el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, frente a una prueba colorimétrica disponible en el mercado para detectar cepas con una menor susceptibilidad a los carbapenémicos

5

Organismo	Produce carbapenemasas	ATCC/ NCTC	Ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo				Técnica estándar				
			Tiempo tras la adición del sustrato, CX, CLV (minutos)				Tiempo tras la adición de R1 y R2 (minutos)				
			5	10	20	30	5	10	20	30	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	ATCC 27853 NCTC 12903	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	NDM-1	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> spp.	NDM-1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-10	NCTC 13437	-	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	NO	ATCC 15309 NCTC 5866	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	NCTC 13301	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-25	NCTC 13302	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-26	NCTC 13303	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-27	NCTC 13304	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-58	NCTC 13305	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Como se muestra en la Tabla 3, de los 11 organismos evaluados durante la comparación del ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, y un método diagnóstico dependiente del pH disponible en el mercado, el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, detectó satisfactoriamente las nueve colonias aisladas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* productoras de carbapenemasas, mientras que las pruebas realizadas con la técnica estándar no detectaron la producción de carbapenemasas en una colonia aislada de *Acinetobacter* (resaltado en la tabla). El falso negativo que se identificó erróneamente con la prueba estándar fue un OXA-27.

En consecuencia, se demuestra que la técnica estándar tiene una especificidad del 100%, pero solo una sensibilidad del 89%, mientras que el método según la invención reivindicada tiene una sensibilidad y una especificidad del 100%. El método de la presente invención proporciona, por lo tanto, un método rápido para detectar la presencia de *Pseudomonas* o *Acinetobacter* productoras de carbapenemasas en la muestra problema, con una mayor sensibilidad en comparación con la de las técnicas conocidas.

Ejemplo 3

Se prepararon dos soluciones problema según el método del Ejemplo 1. Una de las soluciones era exactamente como la descrita en el Ejemplo 1 y la otra solución utilizaba la cefalosporina cromógena HMRZ-86 en lugar de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo.

A continuación, se utilizaron ambas soluciones problema para analizar 68 colonias aisladas de *Pseudomonas*; de estas, 8 eran resistentes a los carbapenémicos y 60 no producían carbapenemasas. De las 8 colonias aisladas de *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas, 4 eran NDM-1, 2 eran VIM y las 2 restantes eran IMP.

Ambas soluciones problema, utilizando HMRZ-86 o ácido (7*R*)-7-[(*Z*)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, se analizaron según un método de la presente invención (a temperatura ambiente). Los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 4.

5

Tabla 4: Comparación de la sensibilidad del ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, frente a HMRZ-86 en la detección de *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas utilizando la configuración de la presente invención

Organismo	Resistencia a carbapenemasas	ATCC/ NCTC	100 µl de inhibidores (HMRZ-98)					100 µl de inhibidores (HMRZ-86)										
			Resultado: Rojo/naranja = +(pos) Amarillo = -(neg)					Resultado: Rojo/naranja = +(pos) Amarillo = -(neg)										
			5 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos	30 minutos	5 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos	30 minutos						
<i>Pseudomonas spp.</i>	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	ATCC 25668 NCTC 10662	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Como se muestra en la Tabla 4, de los 8 organismos de *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas evaluados durante la comparación del ácido (7*R*)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico frente a HMRZ, el ácido (7*R*)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico detectó con éxito las ocho colonias aisladas de *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas, mientras que las pruebas realizadas con HMRZ-86 en lugar de ácido (7*R*)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico no detectaron dos colonias aisladas productoras de NDM-1 (destacadas en la Tabla 4).

Por consiguiente, se demuestra que la técnica de la presente invención tiene una sensibilidad y especificidad del 100%, mientras que el sustrato cromógeno candidato con HMRZ-86 aporta una sensibilidad del 75%. El método de la presente invención con el ácido (7*R*)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico presenta, por lo tanto, una mayor sensibilidad en la detección rápida de *Pseudomonas* o *Acinetobacter* productoras de carbapenemasas en las muestras problema.

15 Ejemplo 4

Se preparó una solución problema tamponada con un ácido dicarboxílico que comprendía ácido (7*R*)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, una mezcla de inhibidores, sulfato de zinc y una sustancia de relleno, y se utilizó para determinar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacteriales productoras de carbapenemasas en 147 colonias aisladas problema, como se indica en la Tabla 5.

La solución problema se preparó de la siguiente manera:

1) El ácido (7*R*)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, en forma de polvo, se disolvió en 1 parte de DMSO por 7 partes de ácido dicarboxílico.

2) A continuación, la solución del paso 1 anterior se tamponó mediante la suplementación adicional con un ácido dicarboxílico en la proporción de 1 parte de solución problema por 4 partes de ácido dicarboxílico.

3) El ácido clavulánico y la cloxacilina se llevaron a una concentración final de 40 µmg/ml y 400 µg/ml y se mezclaron en partes iguales para dar la mezcla inhibidora.

4) A la mezcla de inhibidores se añadieron sulfato de zinc y PEG 8000, en concentraciones finales de 1 mM y 0,5%, respectivamente.

5) También se disolvió una mezcla que contenía polimixina en una concentración de 2 mM, un glucopéptido en una concentración de 4 mM y un antibiótico polipeptídico en una concentración de 1,5 mM en la solución que contenía la mezcla de inhibidores.

6) La solución de 2,8 ml que contenía la mezcla de inhibidores, el sulfato de zinc, el PEG 8000 y la mezcla de antibióticos descrita en el paso 5 anterior se liofilizó formando pelets durante 72 horas.

Posteriormente, la determinación de la presencia de una carbapenemasa se llevó a cabo según se detalla a continuación:

(a) Reconstituir el pelet añadiendo 3,5 ml de la solución problema del paso 2 anterior.

(b) Dejar que el pelet se disuelva por completo a temperatura ambiente durante 1 minuto y mezclar el contenido agitando suavemente en un agitador vorticial durante 10 segundos.

(c) La solución reconstituida debe ser amarilla. Si la solución es de otro color, no se puede utilizar.

(d) Dispensar 500 µl de la solución reconstituida en tubos de microcentrifuga. Un tubo por prueba.

(e) Utilizando un cultivo puro y reciente del organismo problema, añadir un asa llena de 1 µl de organismo al tubo de microcentrifuga y mezclar bien mediante un agitador vorticial durante 10 segundos.

(f) Incubar a 35-37 °C durante 10 minutos y registrar el color de la solución problema.

Tabla 5: Datos de evaluación externa e interna que muestran una elevada sensibilidad y especificidad en la detección de colonias aisladas de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* spp y Enterobacteriales productoras de carbapenemasas, con la presente invención.

Mecanismos de resistencia		Correctamente identificada (sin carbapenemasas)	Incorrectamente identificada (con carbapenemasas)
Organismos que no producen carbapenemasas	ESβL	26	0
	AmpC	17	0
	AmpC/PL	6	0
	Negativo	15	0
	Total	64	0
Mecanismos de resistencia		Correctamente identificada (con carbapenemasas)	Incorrectamente identificada (sin carbapenemasas)
Organismos productores de carbapenemasas	KPC	14	1
	MβL	39	0

	OXA-48	16	0
	OXA-48 y ESβL	1	0
	OXA-95 y AmpC	0	1
	OXA-23	4	0
	OXA-25	1	0
	OXA-26	1	0
	OXA-27	1	0
	OXA-23 y OXA-51	2	0
	OXA-58	1	0
	OXA-23 y OXA-27 y OXA-51	1	0
	Total	81	2

Sensibilidad	97,59%
Especificidad	100,00%

- 5 Se analizaron 110 Enterobacteriales; de ellas, 72 colonias aisladas eran productoras de carbapenemasas y 38 no producían carbapenemasas. De las colonias aisladas analizadas, 57 eran *Klebsiella* spp [12 ESBL, 5 AmpC, 10 OXA, 13 KPC y 17 MβL (6 NDM, 6 IMP y 5 VIM)], 24 eran *Escherichia coli* [8 ESBL, 5 AmpC, 5 OXA, 1 KPC y 5 MβL (2VIM, 2NDM y 1 IMP)], 23 eran *Enterobacter* spp [6 ESBL, 10 AmpC, 2 OXA, 4 MβL (2 VIM, 2 NDM y 1 KPC)], 3 eran *Citrobacter* spp [todos NDM], 1 era *Kluyvera* spp [productora de NDM] y 2 eran *Salmonella* spp; de las cuales ambas eran productoras de AmpC [no producían carbapenemasas]
- 10 - Se analizaron 23 colonias aisladas de *Pseudomonas* spp; de estas, 8 colonias aisladas producían carbapenemasas de tipo MβL que comprendían 2 NDM, 2 IMP y 4 VIM. Quince colonias aisladas de *Pseudomonas* no producían carbapenemasas [14 de estas no tenían ningún mecanismo mediado por enzimas, mientras que una colonia aislada producía AmpC].
- 15 - Se analizaron 14 colonias aisladas de *Acinetobacter* spp; de estas, 13 producían carbapenemasas y una no producía carbapenemasas. De las colonias aisladas productoras de carbapenemasas, había 12 que producían oxacilinasas [4 OXA-23, 1 OXA-25, 1 OXA-26, 1 OXA-27, 1 OXA-58 y coproductores, como 2 OXA-23 + OXA-51, 1 OXA-23 + OXA-27 + OXA-51 y 1 OXA-95 + AmpC]. Una de las colonias aisladas de *Acinetobacter* productoras de carbapenemasas producía MβL.

20 Como se muestra en la Tabla 5, del total de 147 colonias aisladas evaluadas, la presente invención detectó 81 de las 83 colonias aisladas de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacteriales productoras de carbapenemasas. Ello está correlacionado con una sensibilidad total del 97,59% y una especificidad del 100% para una amplia gama de bacterias gramnegativas. Mientras tanto, se ha considerado que un kit disponible en el mercado no es adecuado para su uso con *Pseudomonas aeruginosa* (Henrichs *et al.*, 2015), mientras que otro importante kit de la competencia que se cree que emplea el cromógeno HMRZ-86 mostró una sensibilidad de tan solo el 64,9% y una especificidad del 90% en la

25 detección de Enterobacteriales productoras de carbapenemasas (Mancini *et al.*, 2017). En consecuencia, en este momento, la presente invención es el único método rápido de detección colorimétrica de carbapenemasas, que no solo es adecuado para su uso con colonias aisladas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* spp, sino que también se puede aplicar a Enterobacteriales; con una sensibilidad y especificidad muy elevadas.

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacterales productoras de carbapenemasas en una muestra, que comprende:
- 5 hacer reaccionar una muestra de la que se sospecha que tiene *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas con una solución de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, y detectar un cambio de color en el medio de reacción cuando las *Pseudomonas*, *Acinetobacter* o Enterobacterales productoras de carbapenemasas están presentes en la muestra problema.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, donde la muestra es una muestra biológica, opcionalmente donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto, como la orina, o de un cultivo celular aislado.
- 15 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el método además comprende un paso de lisado de la muestra antes de, o al mismo tiempo que, la reacción con el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, donde la lisis de la muestra se produce en presencia de ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, opcionalmente donde la lisis de la muestra se facilita mediante la combinación de una polimixina, un glucopéptido y un antibiótico polipeptídico.
- 25 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la reacción de la muestra con ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para observar un cambio de color, preferentemente menos de 1 hora, más preferentemente menos de 30 minutos y aún más preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 minutos.
- 30 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la reacción de la muestra con ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 40 °C, más preferentemente de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 37 °C, y aún más preferentemente a 35 °C.
- 35 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el método además comprende un inhibidor de β-lactamas de espectro ampliado (BLEA), un inhibidor de AmpC o una mezcla de los mismos.
- 40 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se utiliza en combinación con un carbapenémico o penémico solo, o en combinación con un inhibidor de β-lactamas de espectro ampliado (BLEA), un inhibidor de AmpC o una mezcla de los mismos.
- 45 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, donde el inhibidor de espectro ampliado es ácido clavulánico y el inhibidor de AmpC es cloxacilina o una mezcla de los mismos.
- 50 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el inhibidor comprende al menos uno de ácido clavulánico en una concentración de entre aproximadamente 30 µg/ml y aproximadamente 50 µg/ml, y cloxacilina en una concentración de entre aproximadamente 300 µg/ml y aproximadamente 500 µg/ml.
- 55 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se disuelve en una solución que comprende al menos uno de un disolvente orgánico, un ácido orgánico y sulfato de zinc.
12. El método según la reivindicación 8, donde el disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar, preferentemente DMSO, y donde el ácido orgánico es un ácido dicarboxílico saturado lineal.
- 60 13. Uso del ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo para detectar la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y Enterobacterales productoras de carbapenemasas en una muestra.
- 65 14. Uso del ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo según la reivindicación 13, donde el ácido (7R)-7-[(z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico, o una sal del mismo, se utiliza junto con un carbapenémico o penémico solo, o en combinación con un inhibidor de β-lactamas de espectro ampliado (BLEA), un AmpC o una mezcla de los mismos.

- 5 15. Un kit para determinar si un microorganismo produce una β -lactamasa que hidroliza carbapenémicos, que comprende un vial que contiene ácido (7*R*)-7-[(*z*)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, una placa de microtitulación que tiene pocillos que están recubiertos con ácido (7*R*)-7-[(*z*)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico o una sal del mismo, o una placa de ensayo impregnado con HMRZ-98 (ácido (7*R*)-7-[(*z*)-2-(2-aminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoxiimino)acetamida]-3-(2,4-dinitroestiril)-3-cefem-4-carboxílico) o una sal del mismo, y un inhibidor de β -lactamas de espectro ampliado (BLEA), un inhibidor de AmpC o una mezcla de los mismos.

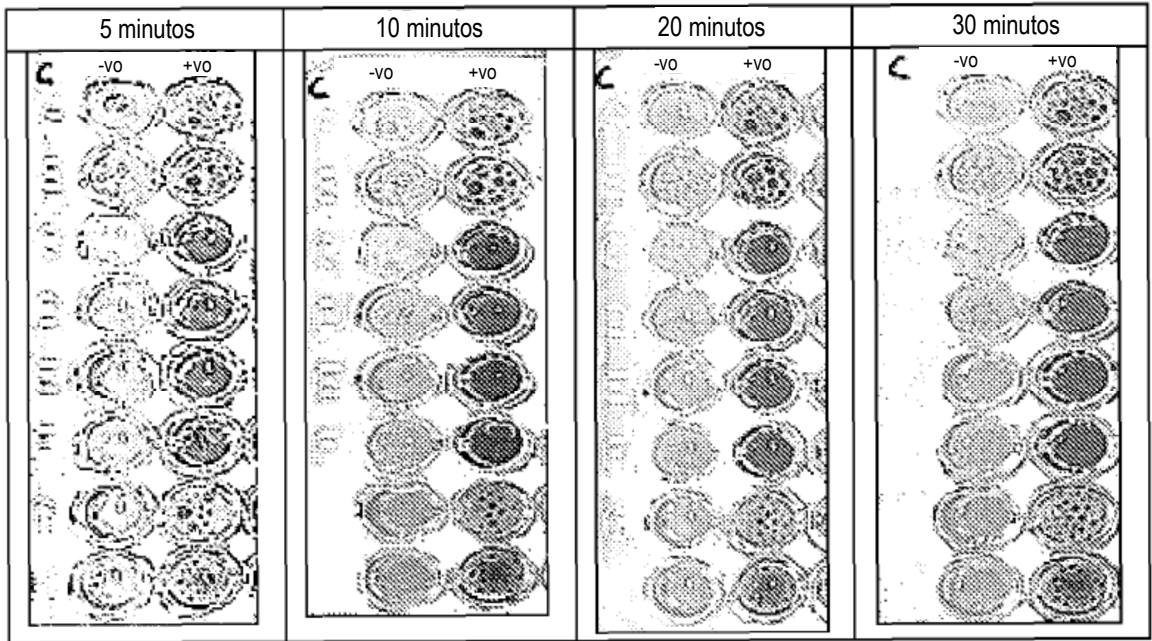


Figura 1

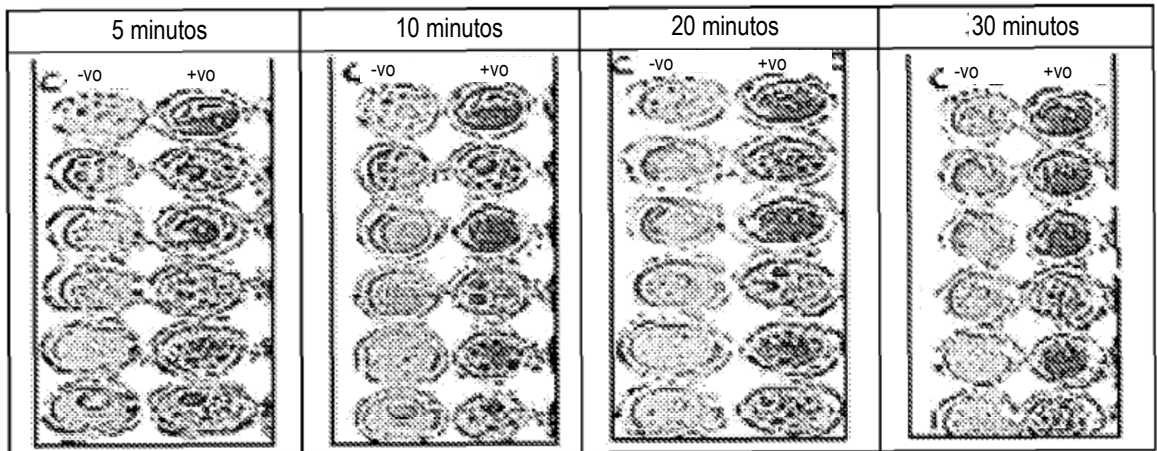


Figura 2

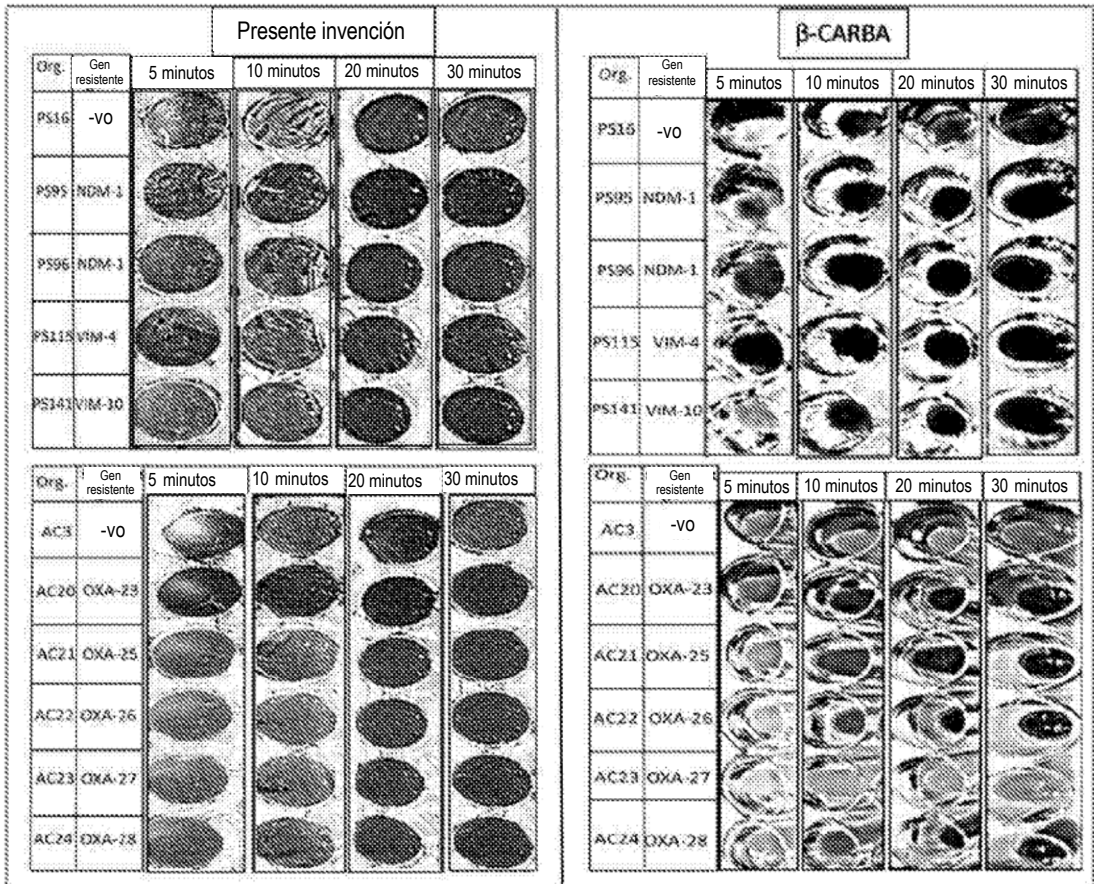


Figura 3

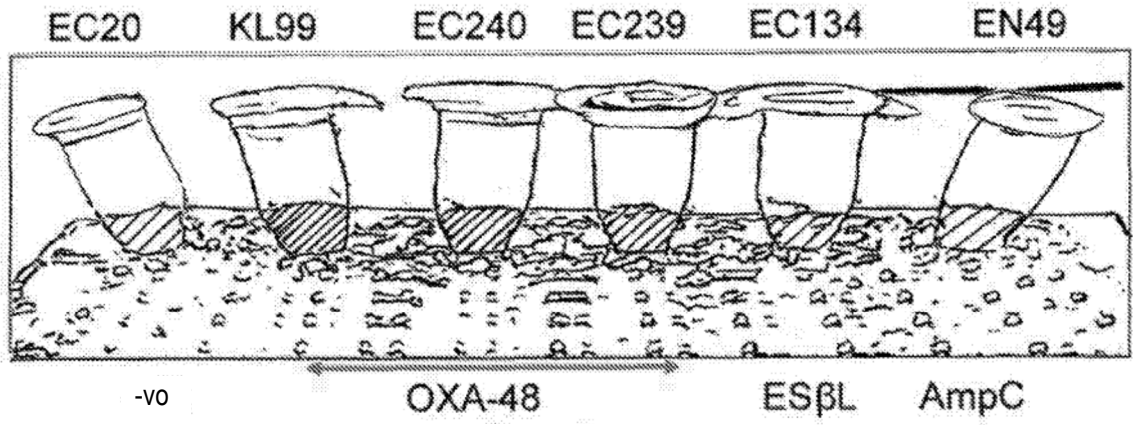


Figura 4