

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 688**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2018** **PCT/GB2018/050522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2018** **WO18158573**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2018** **E 18710124 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.08.2021** **EP 3589742**

54 Título: **Procedimiento de detección**

30 Prioridad:

28.02.2017 GB 201703261

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

08.03.2022

73 Titular/es:

**IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED
(100.0%)**

**Faculty Building Imperial College London
Exhibition Road
London SW7 2AZ, GB**

72 Inventor/es:

**LARROUY-MAUMUS, GERALD;
DORTET, LAURENT y
FILLOUX, ALAIN**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 898 688 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 de detección

5 [0001] La presente invención se refiere a la detección de bacterias resistentes a los antibióticos, en particular bacterias resistentes a los antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos.

[0002] La tendencia creciente en la resistencia a los antibióticos continúa amenazando la salud mundial debido a la limitada oferta de nuevos antibióticos. La resistencia a múltiples fármacos en bacterias gram-negativas es de especial preocupación, ya que puede estar asociada, en aislados únicos, con la resistencia a las tres clases principales de antibióticos que son (i) las β -lactamas con β -lactamasas de espectro extendido codificadas por plásmidos (ESBL) que hidrolizan cefalosporinas y con carbapenemasas que hidrolizan adicionalmente carbapenémicos, (ii) los aminoglucósidos con metilasas de ARNr 16S que modifican su diana celular y confieren resistencia a los pan-aminoglucósidos, (iii) las fluoroquinolonas en su mayoría con mutaciones de topoisomerasas. Debido a la escasez de antibióticos restantes para el tratamiento de infecciones, los antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos (por ejemplo, las polimixinas, tales como la colistina y la polimixina B) se han convertido en el último recurso en particular para el tratamiento de infecciones debidas a *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos. Además, estas *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos son cada vez más prevalentes en todo el mundo, lo que lleva a un mayor uso de polimixinas como tratamiento de primera línea para infecciones altamente invasivas (por ejemplo, bacteriemia) en países "endémicos". Por ejemplo, según la Red europea de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (EARS-Net), la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenémicos aislada de cultivo de sangre alcanzó el 35% en Italia y el 63% en Grecia en 2015 en comparación con el 1,3% y el 43,5% en 2009, respectivamente. Desafortunadamente, este aumento de la resistencia a los carbapenémicos en *Enterobacteriaceae*, que llevó a un mayor uso de polimixinas, está fuertemente correlacionado con una mayor resistencia a las polimixinas.

[0003] La resistencia adquirida a la colistina en *Enterobacteriaceae* resulta mayormente de la modificación de la diana de polimixina, el lipopolisacárido. El lipopolisacárido (LPS), compuesto por el antígeno O, el núcleo de oligosacárido y el lípido A, es el principal glicolípido de superficie ubicado en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Las polimixinas (por ejemplo, colistina, polimixina B y polimixina M) son antibióticos, con una estructura general que tiene un péptido cíclico con una cola hidrófoba. Alteran la estructura de la membrana celular bacteriana al interactuar con sus fosfolípidos. Después de unirse al lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, las polimixinas alteran tanto la membrana externa como la interna. La cola hidrófoba es importante en provocar daño a la membrana, lo que sugiere un modo de acción similar al de un detergente.

[0004] La adición de fosfoetanolamina, grupos catiónicos de 4-amino-L-arabinosa o ambos al lipopolisacárido (por ejemplo, al lípido A) disminuye la unión del antibiótico de péptido catiónico cíclico (por ejemplo, polimixina) a la membrana externa bacteriana. La adición de estos grupos puede deberse a mecanismos codificados por cromosomas (por ejemplo, mutaciones en los sistemas de dos componentes PmrAB o PhoPQ o alteraciones del gen mgrB). Tal alteración conduce a una menor carga negativa de la membrana externa de la bacteria, lo que conduce a una interacción reducida de esta membrana con un antibiótico de péptido catiónico cíclico (por ejemplo, polimixina). Un informe reciente reveló que la adición de fosfoetanolamina también puede estar mediada por plásmidos a través del gen *mcr-1*, que confiere la primera resistencia conocida codificada por plásmido a la colistina en aislados de humanos y animales. Más recientemente, el gen *mcr-1* se identificó en varias cadenas principales de plásmidos, principalmente en *Escherichia coli*. Por tanto, existe una necesidad urgente de una prueba que permita la detección rápida de la resistencia a la polimixina en bacterias (por ejemplo, *Enterobacteriaceae*) y que pueda contribuir a su contención.

[0005] La técnica de referencia estándar para la determinación de la susceptibilidad a polimixinas es la microdilución en caldo, que requiere una atención fastidiosa y un largo tiempo (24 h) para la realización. Se han propuesto otras técnicas para determinar la susceptibilidad a las polimixinas (difusión en disco y Etest), pero requieren de 18 a 24 horas para obtener resultados. Debido a la mala difusión de las moléculas de polimixina en agar, las tasas de falsa susceptibilidad son altas (hasta el 32%).

[0006] También se ha utilizado una prueba bioquímica (la prueba rápida NP de polimixina) que detecta el crecimiento bacteriano en presencia de una concentración definida de una polimixina. En esta prueba colorimétrica, la detección (o ausencia) del crecimiento bacteriano se basa en el metabolismo de los carbohidratos. La formación de ácido asociada con el metabolismo de carbohidratos en *Enterobacteriaceae* se puede observar a través del cambio de color de un indicador de pH. La interpretación de los resultados de esta prueba es subjetiva, lo que genera problemas de reproducibilidad y requiere más vigilancia por parte de los técnicos de laboratorio, lo que genera errores de lectura. Si bien es una mejora con respecto a otros procedimientos convencionales, esta prueba bioquímica puede tardar hasta 2 horas en producir un resultado.

[0007] Debido a la variedad de genes que pueden estar involucrados en la resistencia a antibióticos de péptidos catiónicos cíclicos (por ejemplo, polimixina) (por ejemplo, genes similares a *mcr* codificados por plásmidos, tales como *mcr-1* y *mcr-2*, comparten solo el 79% de identidad; y los genes codificados por el cromosoma relacionados con la resistencia a la polimixina son numerosos), el uso de herramientas de biología molecular (por ejemplo, amplificación

y secuenciación de genes diana) para la detección de bacterias resistentes a la polimixina no es fiable. Para los genes codificados por cromosomas asociados con la resistencia a la polimixina, las modificaciones génicas (alteraciones, mutaciones por deleciones) implicadas tampoco se describen ni caracterizan sistemáticamente. En cuanto a la resistencia codificada por plásmidos, se conocen cinco familias de genes *mcr* en *Enterobacteriaceae*. MCR-2, MCR-3, MCR-4 y MCR-5 comparten solo el 81%, 34%, 33% y 31% de identidad de aminoácidos con MCR-1, respectivamente. Esta diversidad conduciría inevitablemente a un fallo en la detección sistemática de la resistencia a la polimixina cuando depende de la utilización de herramientas de biología molecular disponibles dedicadas a la detección de *mcr-1* y/o *mcr-2*.

[0008] Otros enfoques convencionales han empleado el uso de espectrometría de masas (EM). De hecho, la EM se ha convertido en una técnica estándar disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos. Los sistemas "Bioyper" de Bruker y los sistemas "VITEK-MS" de bioMérieux son ejemplos de sistemas de espectrometría de masas estándar y se han utilizado para la identificación de bacterias según el perfil del espectro de masas obtenido mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS). El sistema permite la discriminación de bacterias basada principalmente en proteínas. De hecho, todas las aplicaciones de diagnóstico actuales con EM se basan en el perfil de proteínas. Esto se debe a que las proteínas se pueden ionizar más fácilmente que las moléculas hidrófobas y fuertemente hidrófilas, tales como los lípidos y los polisacáridos, respectivamente. Por lo tanto, el análisis de LPS y la modificación de la composición de LPS en bacterias, que tiene lugar durante la resistencia al antibiótico de péptidos catiónicos cíclicos (por ejemplo, polimixina) a través de MALDI-TOF MS, son un desafío.

[0009] Recientemente, esta tecnología también se ha desarrollado para detectar los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (por ejemplo, al antibiótico de β -lactama) mediante la detección de la presencia o ausencia de algunas β -lactamasas (por ejemplo ESBL o carbapenemasa). Aquí, la degradación (es decir, la hidrólisis) de la β -lactama es seguida por el análisis de EM para generar un espectro de masas: la ausencia del pico correspondiente a la β -lactama nativa indica resistencia antimicrobiana a los antibióticos de β -lactama. Sin embargo, en el caso de la polimixina, la resistencia no se debe a las modificaciones o la destrucción del antibiótico en sí; por lo tanto, la estrategia para detectar la modificación o destrucción de la polimixina utilizando MALDI-TOF MS para detectar bacterias resistentes a la polimixina no es aplicable.

[0010] Hasta la fecha, el uso de procedimientos basados en la espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF MS) en la detección de lípido A y lípido A modificado ha requerido la purificación de la molécula real (lípido A) a partir de grandes cantidades de cultivo (por ejemplo desde 500 ml hasta varios litros). El procedimiento global tarda aproximadamente de 2 a 3 semanas, lo que no es compatible con el análisis clínico. Por tanto, los procedimientos convencionales son costosos y/o consumen mucho tiempo y/o son ineficaces para la detección de bacterias resistentes a antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos (por ejemplo, polimixina) en una muestra y requieren una cantidad significativa de mano de obra especializada y equipo costoso. Ningún procedimiento actual basado en EM es adecuado para detectar bacterias resistentes a antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos (por ejemplo, polimixina) en una muestra cruda que comprenda bacterias intactas.

[0011] Arroyo et al. (Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011, 55, 8, pág. 3743-3751) describe que el operón pmrCAB media la resistencia a la polimixina en *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 y aislados clínicos a través de la modificación con fosfoetanolamina del lípido A. Tran et al. (Journal of Biological Chemistry, 2004, 279, 53, pág. 55780-55791) describe la escisión periplásmica y la codificación del grupo 1-fosfato del lípido A de *Helicobacter pylori*. Pendela et al. (Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23, 12, pág. 1856-1862) describe la caracterización de sustancias relacionadas con la dihidroestreptomicina mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones. Pelletier y col. (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57, 10, p. 4831-4840) describe modificaciones estructurales en el lipopolisacárido de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a la colistina. Qureshi et al. (Clinical Infectious Diseases, 2015, 60, 9, pág. 1295-1303) describe *Acinetobacter baumannii* resistente a la colistina. Park et al. (Clinical Microbiology and Infection, 2015, 21, 8, pág. 765.e1-7) describe que el análisis transcriptómico de cepas aisladas susceptibles y resistentes a la colistina identifica genes asociados con la resistencia a la colistina en *Acinetobacter baumannii*. El documento US 2012/197535A1 describe procedimientos para identificar bacterias.

[0012] La presente invención resuelve al menos un (por ejemplo, más de uno) de los problemas mencionados anteriormente, al permitir la detección de bacterias resistentes a antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una muestra que comprende una bacteria intacta, o membranas bacterianas. Por lo tanto, la presente invención es exclusivamente compatible con la clínica (por ejemplo, análisis clínico) y puede permitir la detección de una bacteria resistente al antibiótico de polipéptido catiónico cíclico (por ejemplo, polimixina) en menos de 15 minutos.

[0013] Ventajosamente, dicho procedimiento no requiere la purificación de una molécula de lípido A, y de hecho permite la identificación de cualquier lípido A y cualquier lípido A modificado directamente en bacterias intactas o en una muestra no purificada que contiene membranas bacterianas o fragmentos de las mismas. Además, el presente procedimiento se puede utilizar con una pequeña muestra bacteriana (por ejemplo, que comprende menos de 10^7 células bacterianas). Esto permite reducir ampliamente el tiempo y los materiales necesarios para detectar la presencia o ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico en una muestra.

[0014] Ventajosamente, el procedimiento permite la detección de bacterias resistentes a antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos codificados por plásmidos y codificadas por cromosomas en un único análisis. Por ejemplo, cuando las bacterias se han aislado de un paciente infectado, esto permite separar a los pacientes infectados con tales bacterias, por ejemplo, para la cuarentena de pacientes infectados con bacterias resistentes a polimixina codificadas por plásmido. Además, la detección de bacterias resistentes a antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos codificadas por cromosomas a través de un procedimiento de la presente invención, que proporciona información ventajosa sobre el estado fisiológico del lípido A, evita la necesidad de análisis molecular de muestras que requieren la amplificación y secuenciación de muchos genes, cuya mutación puede dar lugar a resistencia a antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos.

[0015] La presente invención proporciona procedimientos rápidos (15 minutos) y precisos (por ejemplo, procedimientos de diagnóstico), proporcionando mayores avances para la detección de la resistencia a la polimixina evaluando directamente modificaciones del lípido A, la diana celular de las polimixinas, en bacterias intactas. La combinación de excelente rendimiento, rentabilidad y escalabilidad de alto rendimiento son atributos deseables que distinguen los procedimientos actuales de la técnica anterior. Finalmente, los procedimientos de la presente invención usan tecnología que ya está disponible en muchos laboratorios de microbiología clínica, lo que permite una implementación sin costos y sin complicaciones.

[0016] La presente invención se define por las reivindicaciones. En el presente documento se describe un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, que comprende:

- a. someter una muestra de ensayo a análisis de espectrometría de masas y generar una salida de espectro de masas;
- b. identificar en dicha salida de espectro de masas un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina, en el que dicho primer pico definido es un pico presente en una salida de espectro de masas para el lípido A modificado por fosfoetanolamina y en el que dicho primer pico definido está ausente de una salida de espectro de masas correspondiente para el lípido A nativo; y
- c. en el que la presencia de dicho primer pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, y en el que la ausencia de dicho primer pico definido indica la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico.

[0017] En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, que comprende:

- a. someter una muestra de ensayo a análisis de espectrometría de masas y generar una salida de espectro de masas; en el que dicha muestra de ensayo comprende una membrana bacteriana o un fragmento de la misma, en el que el fragmento comprende un componente que no es de lípido A;
- b. identificar en dicha salida de espectro de masas un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina, en el que dicho primer pico definido es un pico presente en una salida de espectro de masas para el lípido A modificado por fosfoetanolamina y en el que dicho primer pico definido está ausente de una salida de espectro de masas correspondiente para el lípido A nativo; y
- c. en el que la presencia de dicho primer pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipeptídico catiónico, y en el que la ausencia de dicho primer pico definido indica la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico.

[0018] El término "bacteria", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una bacteria Gram-negativa. Una bacteria puede ser una bacteria intacta o una bacteria fragmentada. La bacteria puede haber sido sometida a cualquier tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con agentes alcalinos) o físico (por ejemplo, calentamiento, agitación o pipeteo).

[0019] El término "muestra de ensayo", tal como se usa en el presente documento, no es una muestra purificada de Lípido A nativo o Lípido A modificado. La "muestra de ensayo" modificada comprende una membrana bacteriana o un fragmento de la misma. La membrana bacteriana comprende un lípido A nativo o un lípido A modificado. Adecuadamente, la membrana bacteriana puede comprender un lípido A modificado. Adecuadamente, un lípido A nativo o un lípido A modificado está presente como parte integral de la membrana bacteriana o un fragmento de la misma en la muestra de ensayo.

[0020] Ventajosamente, la utilización de una muestra de ensayo que comprende una membrana bacteriana o un fragmento de la misma (por ejemplo, una muestra en bruto) en un procedimiento de la presente invención evita la necesidad de purificar el lípido A y/o lípido A modificado (por ejemplo, de grandes volúmenes de cultivo bacteriano) antes de la detección de dichas moléculas de lípido A (por ejemplo, mediante espectrometría de masas). Por tanto, la presente invención se distingue de los procedimientos de la técnica anterior que requieren purificación (por ejemplo, purificación previa) del lípido A y/o del lípido A modificado.

[0021] El término "fragmento" como se usa en el contexto de una membrana bacteriana se refiere a un fragmento que comprende un componente no lípido A opcionalmente en combinación con un lípido A nativo o lípido A modificado.

En una realización, un "fragmento" es un componente no lípido A opcionalmente en combinación con un lípido A modificado.

[0022] En una realización, una membrana bacteriana es parte de una bacteria intacta.

[0023] La "muestra de ensayo" puede ser una muestra biológica, tal como una muestra clínica. En una realización, una muestra de ensayo es sangre completa, suero, plasma, muestras orales, tales como saliva, pus, muestra vaginal, muestras de heces, vómito, líquido cefalorraquídeo, líquido lagrimal, líquido sinovial, esputo, muestras clínicas preparadas o procesadas (por ejemplo, para la eliminación de sal), muestras ambientales (por ejemplo, muestras de agua, suelo, aire), líquidos en grandes volúmenes, material de animal sacrificado, productos farmacéuticos y matrices biológicas. Puede prepararse una muestra de ensayo, por ejemplo, cuando sea apropiado, diluida o concentrada, o dializada y almacenada por medios estándar. Una muestra de ensayo generalmente comprende o se sospecha que comprende una bacteria (entre 10^1 y 10^{10} células bacterianas). Una muestra de ensayo también incluye homogeneizados de tejido, secciones de tejido y muestras de biopsia de un sujeto vivo o tomadas post-mortem. Alternativamente, una muestra de ensayo puede ser una colonia o suspensión bacteriana recuperada de cualquier medio de crecimiento bacteriano o muestra clínica, muestra clínica preparada o procesada o muestra ambiental, tal como se describe anteriormente.

[0024] La muestra de ensayo puede comprender, o puede ser sospechosa de comprender una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico. De forma adecuada, la muestra de ensayo puede comprender una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico.

[0025] Una muestra biológica puede ser una muestra clínica. La muestra clínica puede ser una muestra clínica que se ha sometido a una o más etapas de procesamiento. Por ejemplo, diálisis (por ejemplo, para reducir la concentración de una sal en dicha muestra). En una realización, la muestra de ensayo se procesa para eliminar la sal. La concentración reducida de sal puede permitir la prevención de la detección de especies que no son lípido A indeseables en un espectro de masas, mejorando así la interpretabilidad del espectro de masas. Se conocen en la técnica técnicas estándar para reducir la concentración de una sal (por ejemplo, diálisis). En una realización, la muestra de ensayo se somete a varias rondas de lavado (por ejemplo, centrifugación y resuspensión en un tampón bajo en sal o en un tampón sin sal). Una muestra de ensayo puede comprender una concentración de sal de menos de 200 mM o 100 mM. Adecuadamente, una muestra de ensayo puede comprender una concentración de sal de menos de 50 mM, 30 mM o 10 mM.

[0026] El término "detectar", tal como se usa en el presente documento, significa confirmar la presencia o ausencia de bacterias resistentes a un antibiótico de polipéptido cíclico catiónico (por ejemplo, polimixina) en una muestra. La detección se puede realizar en la muestra de ensayo, o indirectamente en un extracto de la misma, o en una dilución o concentrado de la misma. El término "identificar", tal como se usa en este documento, significa confirmar la presencia o ausencia de un pico asignado a un Lípido A modificado en la salida del espectro de masas. Dicho pico identificado también permite la cuantificación del lípido A modificado. En los procedimientos de la invención, la cuantificación se puede realizar midiendo la intensidad (por ejemplo, el valor más grande del eje y) de un pico en una salida del espectro de masas.

[0027] El término "análisis por espectrometría de masas" abarca cualquier técnica de espectrometría de masas adecuada para la determinación de la relación masa a carga de una molécula biológica, y abarca tanto los modos de iones negativos como positivos de la espectrometría de masas. Dichas técnicas de espectrometría de masas incluyen espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización de desorción láser mejorada en superficie (SELDI-TOF MS), espectrometría de masas con acelerador, EM-cromatografía de gases, EM-cromatografía líquida, EM de plasma acoplado inductivamente, espectrometría de masas de relación de isótopos (IRMS), espectrometría de masas de ionización por evaporación rápida (REIMS) y espectrometría de movilidad iónica-EM. Preferiblemente, el análisis de espectrometría de masas comprende (o consiste en) espectrometría de masas MALDI-TOF.

[0028] El MALDI es una técnica de ionización utilizada en espectrometría de masas, que permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros, tales como ADN, proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (tales como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas), que tienden a ser frágiles y se fragmentan cuando se ionizan mediante otros procedimientos de ionización. En una realización, la solución matriz actúa como fuente de protones para estimular la ionización del analito (por ejemplo, lípido A).

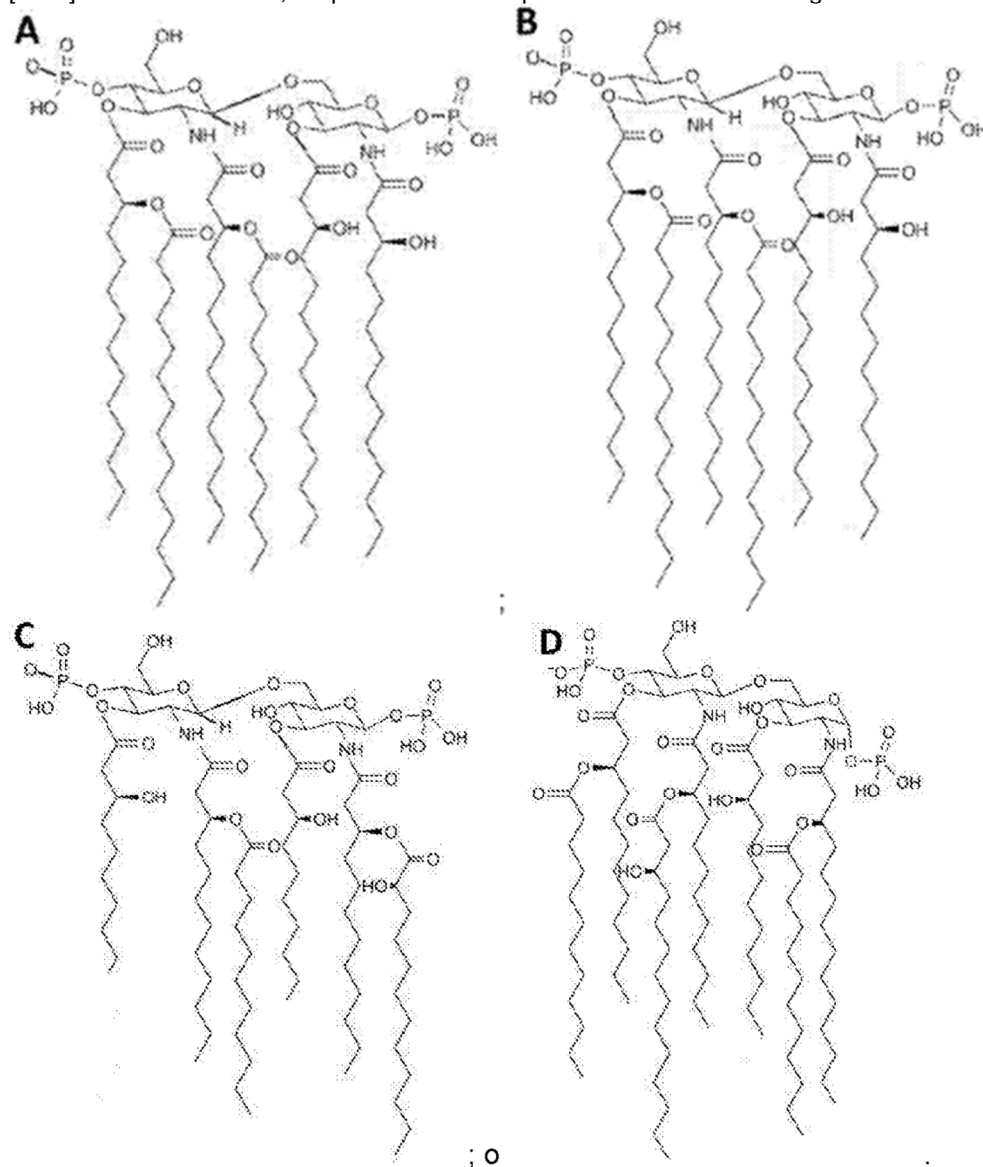
[0029] En una realización, el análisis de espectrometría de masas comprende la ionización de un analito. En una realización, el análisis por espectrometría de masas comprende la ionización del lípido A o un lípido A modificado.

[0030] El término "salida del espectro de masas" abarca todos los datos que proporcionan la relación de masa/carga (m/z) de una molécula (por ejemplo, analito) en una muestra de ensayo junto con una estimación de la cantidad de dicha molécula en una muestra de ensayo, por ejemplo, en el intervalo de 400 m/z a 30.000 m/z , de 1.600 m/z a 2.200 m/z o de 1.000 m/z a 3.000 m/z . El procedimiento experimental de la invención puede optimizarse para proporcionar

selectivamente la m/z de las moléculas de lípido A con un fondo mínimo (por ejemplo, donde "fondo" son datos m/z sobre especies que no son de lípido A).

[0031] El término "lípido A nativo" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un lípido A que no ha sido modificado, es decir, no comprende una modificación con fosfoetanolamina y/o 4-amino-L-arabinosa. El término "lípido A nativo" abarca (entre otros): hexa-acil difosforil lípido A que contiene cuatro C14:0 3-OH, un C14:0 y un C12:0; Lípido A con hidroxilación (-OH) de la cadena C'-2 acil-oxo-acilo; Lípido A con palmitoilación (-C-16) de la cadena C-1 acil-oxo-acilo; y Lípido A con hidroxilación (-OH) de la cadena C'-2 acil-oxo-acilo y palmitoilación (-C-16) de la cadena C-1 acil-oxo-acilo.

[0032] En una realización, el lípido A nativo comprende una o más de las siguientes estructuras:

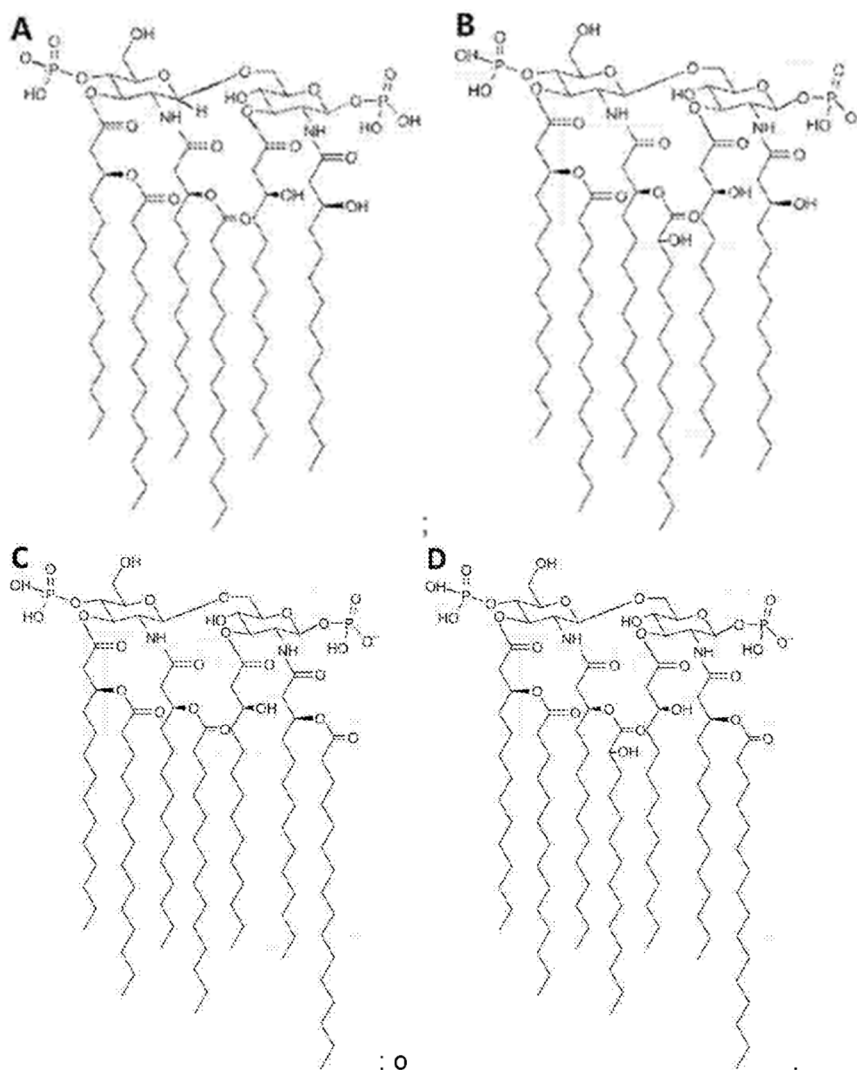


[0033] En realizaciones en las que la bacteria es *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., o *Salmonella* spp., el lípido A nativo comprende la estructura como se define en (a) anteriormente.

[0034] En realizaciones en las que la bacteria es *Klebsiella* spp, el lípido A nativo comprende la estructura como se define en (b) anterior. En realizaciones en las que la bacteria es *Pseudomonas aeruginosa*, el lípido A nativo comprende la estructura definida en (c) anteriormente.

[0035] En realizaciones en las que la bacteria es *Acinetobacter baumannii*, el lípido A nativo comprende la estructura como se define en (d) anteriormente.

[0036] En una realización, el lípido A nativo comprende una o más de las siguientes estructuras:



5 [0037] En realizaciones en las que la bacteria es *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Shigella* spp, o *Salmonella* spp (preferiblemente *Klebsiella* spp.), lípido A nativo comprende la estructura como se define en uno cualquiera de (a)-(d) anterior.

10 [0038] En una realización, el lípido A con hidroxilación (-OH) de la cadena C'-2 acil-oxo-acilo comprende la estructura como se define en (b) anterior. De manera adecuada, dicho Lípido A comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1837 a aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z. En una realización, el lípido A con palmitoilación (-C-16) de la cadena C-1 acil-oxo-acilo comprende la estructura definida en (c) anteriormente. De manera adecuada, dicho Lípido A comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2060 a aproximadamente 2066 m/z, preferiblemente 2063 m/z. En una realización, el lípido A con hidroxilación (-OH) de la cadena C'-2 acil-oxo-acilo y palmitoilación (-C-16) de la cadena C-1 acil-oxo-acilo comprende la estructura definida en (d) anterior. De manera adecuada, dicho Lípido A comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2076 a aproximadamente 2082 m/z, preferiblemente 2079 m/z.

20 [0039] El término "lípido A modificado" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un lípido A que se ha modificado con una fosfoetanolamina y/o una 4-amino-L-arabinosa. Alternativamente, la 4-amino-L-arabinosa puede denominarse 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa. El lípido A modificado con 4-amino-L-arabinosa y/o fosfoetanolamina puede ser un biomarcador de resistencia a antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos (por ejemplo, polimixina).

25 [0040] La estructura del lípido A se conoce en la técnica y puede variar entre las bacterias (por ejemplo, entre géneros, especies o cepas). La presente invención implica diferentes estructuras de lípido A que comprenden una modificación con fosfoetanolamina y/o una 4-amino-L-arabinosa en la posición 4' fosfato y/o 1' fosfato.

[0041] El "lípido A modificado" (por ejemplo, modificado con 4-amino-L-arabinosa y/o fosfoetanolamina) es distinto (tanto estructural como funcionalmente) de un lípido A nativo. Sin desear estar ligado a la teoría, se cree que la modificación del lípido A con fosfoetanolamina y/o 4-amino-L-arabinosa conduce a una menor carga negativa de la

membrana externa de una bacteria, lo que conduce a una interacción reducida de esta membrana con un antibiótico de péptido catiónico cíclico (por ejemplo, polimixina). Se cree que dicha modificación del lípido A con fosfoetanolamina y/o 4-amino-L-arabinosa provoca la remodelación de la membrana externa bacteriana y disminuye la permeabilidad de la membrana. Ventajosamente, la presente invención proporciona un procedimiento que permite sorprendentemente la detección tanto de un lípido A nativo como de un lípido A modificado en una muestra de ensayo que comprende una membrana bacteriana o un fragmento de la misma. La capacidad de detectar tanto un lípido A nativo como un lípido A modificado en la misma muestra de ensayo es particularmente ventajosa, ya que las cantidades relativas (por ejemplo, concentraciones) de un lípido A nativo y un lípido A modificado en la misma muestra de ensayo pueden compararse directamente y contrastarse.

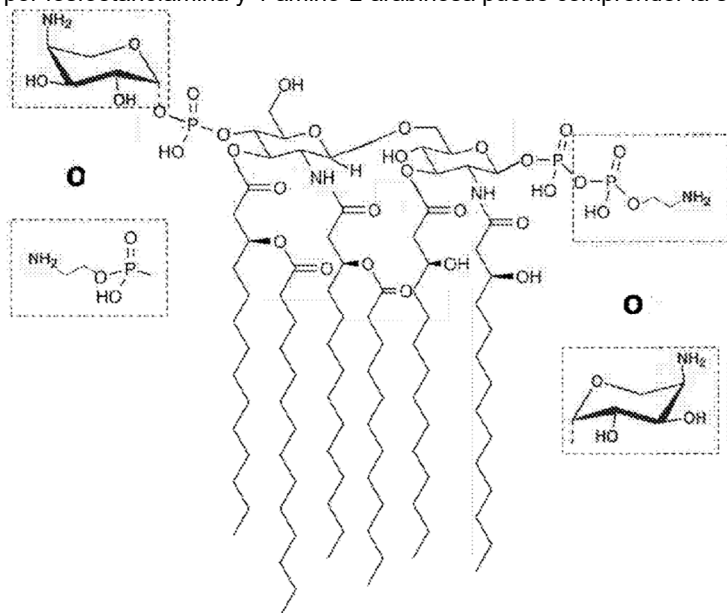
[0042] En una realización, el lípido A modificado con fosfoetanolamina comprende una modificación con fosfoetanolamina en el fosfato 1' y/o 4' fosfato de lípido A. De manera adecuada, el lípido A modificado con fosfoetanolamina comprende una modificación con fosfoetanolamina en el fosfato 1'.

[0043] En una realización, el lípido A modificado con fosfoetanolamina comprende una modificación con fosfoetanolamina en el fosfato 1' del lípido A con la pérdida concomitante del grupo fosfato 4'. En otra realización, el lípido A modificado con fosfoetanolamina comprende una modificación con fosfoetanolamina en el grupo fosfato 4' del lípido A con pérdida concomitante del grupo fosfato 1'. De forma adecuada, el lípido A modificado con fosfoetanolamina comprende una modificación con fosfoetanolamina en el grupo fosfato 1' del lípido A con pérdida concomitante del grupo fosfato 4'.

[0044] En una realización, el lípido A modificado con 4-amino-L-arabinosa comprende una modificación con 4-amino-L-arabinosa en el fosfato 1' del lípido A. En una realización, el lípido A modificado con 4-amino-L-arabinosa comprende una modificación con 4-amino-L-arabinosa en el fosfato 4' del lípido A. De manera adecuada, el lípido A modificado con 4-amino-L-arabinosa comprende una modificación con 4-amino-L-arabinosa en el fosfato 4' del lípido A.

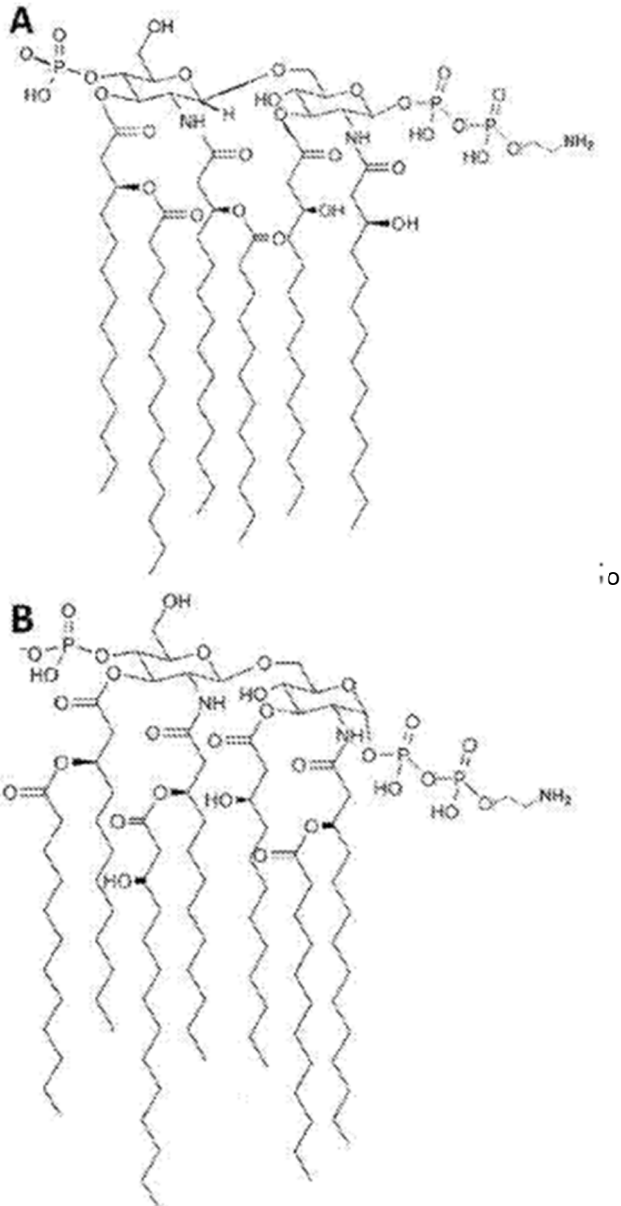
[0045] En una realización, el lípido A modificado con fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una modificación con fosfoetanolamina en el fosfato 1' y/o fosfato 4' del lípido A. De manera adecuada, el lípido A modificado con fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una modificación con fosfoetanolamina en el fosfato 1' y una modificación con 4-amino-L-arabinosa en el fosfato 4'.

[0046] A modo de ejemplo, un lípido A de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Shigella* spp, o *Salmonella* spp modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa puede comprender la siguiente estructura:



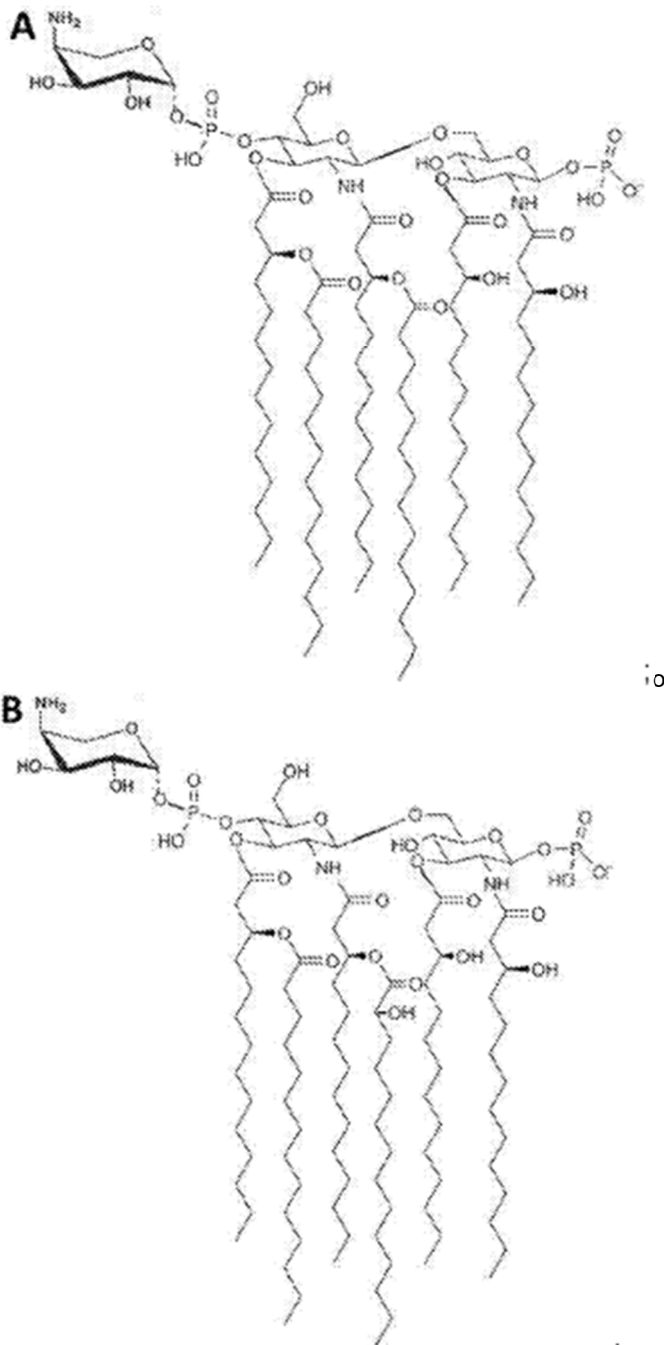
[0047] En una realización, el lípido A modificado con 4-amino-L-arabinosa comprende una modificación con 4-amino-L-arabinosa en el fosfato 1' y/o el 4' fosfato del lípido A, preferiblemente en la fosfato 4'.

[0048] Preferiblemente, el lípido A modificado por fosfoetanolamina puede comprender una o más de las siguientes estructuras:



[0049] En realizaciones en las que la bacteria es *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*, o *Salmonella spp.*, el lípido A modificado por fosfoetanolamina puede comprender la estructura, tal como se define en (a) anteriormente. En realizaciones en las que la bacteria es *Acinetobacter baumannii*, el lípido A modificado por fosfoetanolamina puede comprender la estructura definida en (b) anterior. En una realización, el lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende la estructura definida anteriormente para *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.* y *Salmonella spp.*

[0050] Preferiblemente, el lípido A modificado con 4-amino-L-arabinosa puede comprender una o más de las siguientes estructuras:



[0051] El procedimiento de la invención puede usarse para diagnosticar la infección de un sujeto con una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmidos, o la infección de un sujeto con una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de resistencia codificada por cromosoma.

[0052] El término "diagnóstico" tal como se utiliza en este documento abarca la identificación, confirmación y/o caracterización de infecciones bacterianas resistentes a polipéptidos catiónicos cíclicos. Los procedimientos de diagnóstico que implican un procedimiento de acuerdo con la invención son útiles para confirmar la existencia de una infección. Los procedimientos de diagnóstico también son útiles en procedimientos para la evaluación del cribado clínico, el pronóstico, la elección de la terapia, la evaluación del beneficio terapéutico, es decir, para el cribado y el desarrollo de fármacos. Un diagnóstico eficiente permite identificar rápidamente el tratamiento más apropiado (disminuyendo así la exposición innecesaria a los efectos secundarios dañinos de los medicamentos) y reducir las tasas de recaída.

[0053] También se proporciona un procedimiento para monitorizar la eficacia de una terapia para infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos, que comprende identificar y/o cuantificar el lípido A modificado en una muestra de ensayo tomada de un sujeto a través de un procedimiento de la presente

invención después de terapia. En los procedimientos de monitorización, las muestras de ensayo pueden tomarse en más de una ocasión. El procedimiento puede comprender además comparar el nivel del lípido A modificado en una muestra de ensayo con uno o más controles y/o con una o más muestras de ensayo anteriores tomadas anteriormente del mismo sujeto de prueba, por ejemplo, antes del comienzo de la terapia, y/o del mismo sujeto de prueba en una etapa anterior de la terapia. El procedimiento puede comprender detectar un cambio en el nivel de un lípido A modificado en muestras de ensayo tomadas en diferentes ocasiones.

[0054] En una realización, el primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación de masa/carga (m/z) de aproximadamente 120 a aproximadamente 125 unidades m/z (preferiblemente de aproximadamente 123 unidades m/z) mayor que un segundo pico definido indicativo de la presencia de lípido A nativo.

[0055] En una realización, el segundo pico definido se selecciona del grupo que consiste en:

- a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;
- b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- c. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1614 a aproximadamente 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*; o
- d. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1907 a aproximadamente 1913 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*.

[0056] En una realización, el segundo pico definido se selecciona del grupo que consiste en:

- a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;
- b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- c. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1837 a aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- d. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1847 a aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- e. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2059 a aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2075 a aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1614 a aproximadamente 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*;
- h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1907 a aproximadamente 1913 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*.
- i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp.*;
- j. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para *Salmonella spp.*; o
- k. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2031 a aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella spp.*

[0057] En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente aproximadamente 1796,2 m/z para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*). En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1837 a aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1847 a aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2059 a aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2075 a aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización más, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1614 a aproximadamente 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1907 a aproximadamente 1913 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp.* En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para

Salmonella spp. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2031 a aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella* spp.

[0058] En algunas realizaciones, el primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1960 a aproximadamente 1966 m/z, preferiblemente 1963 m/z para *Klebsiella pneumoniae*; entre aproximadamente 1970 y aproximadamente 1976 m/z, preferiblemente 1973 m/z para *Klebsiella pneumoniae*; entre aproximadamente 2182 y aproximadamente 2188 m/z, preferiblemente 2185 m/z para *Klebsiella pneumoniae*; entre aproximadamente 2198 y aproximadamente 2204 m/z, preferiblemente 2201 m/z para *Klebsiella pneumoniae*; entre aproximadamente 1918 y aproximadamente 1920 m/z, preferiblemente aproximadamente 1919,2 m/z para *Salmonella* spp.; entre aproximadamente 1944 y aproximadamente 1950 m/z, preferiblemente 1947 m/z, para *Salmonella* spp.; entre aproximadamente 2154 y aproximadamente 2160 m/z, preferiblemente 2157 m/z, para *Salmonella* spp.; entre aproximadamente 1913 y aproximadamente 1924 m/z, o entre aproximadamente 1918 y aproximadamente 1920 m/z, preferiblemente aproximadamente 1919,2 m/z para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella oxytoca*; entre aproximadamente 1940 y aproximadamente 1951 m/z, o entre aproximadamente 1946 y aproximadamente 1947 m/z, preferiblemente aproximadamente 1946,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*; entre aproximadamente 1734 y aproximadamente 1745 m/z, o entre aproximadamente 1939 y aproximadamente 1741 m/z, preferiblemente aproximadamente 1740,2 m/z para *Pseudomonas aeruginosa*; y entre aproximadamente 2027 y aproximadamente 2038 m/z, o entre aproximadamente 2032 y aproximadamente 2034 m/z, preferiblemente aproximadamente 2033,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*.

[0059] En algunas realizaciones, el primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación de masa/carga (m/z) entre aproximadamente 1913 y aproximadamente 1924 m/z, o entre aproximadamente 1918 y aproximadamente 1920 m/z, preferiblemente aproximadamente 1919,2 m/z para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella oxytoca*; entre aproximadamente 1940 y aproximadamente 1951 m/z, o entre aproximadamente 1946 y aproximadamente 1947 m/z, preferiblemente aproximadamente 1946,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*; entre aproximadamente 1734 y aproximadamente 1745 m/z, o entre aproximadamente 1939 y aproximadamente 1741 m/z, preferiblemente aproximadamente 1740,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*; y entre aproximadamente 2027 y aproximadamente 2038 m/z, o entre aproximadamente 2032 y aproximadamente 2034 m/z, preferiblemente aproximadamente 2033,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*.

[0060] En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1913 y aproximadamente 1924 m/z, o entre aproximadamente 1918 y aproximadamente 1920 m/z, preferiblemente aproximadamente 1919,2 m/z para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella oxytoca*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1940 y aproximadamente 1951 m/z, o entre aproximadamente 1946 m/z y aproximadamente 1947 m/z, preferiblemente aproximadamente 1946,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización más, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1614 y aproximadamente 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z, y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1734 y aproximadamente 1745 m/z, o entre aproximadamente 1939 y aproximadamente 1741 m/z, preferiblemente aproximadamente 1740,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1907 y aproximadamente 1913 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z, y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) entre aproximadamente 2027 y aproximadamente 2038 m/z, o entre aproximadamente 2032 y aproximadamente 2034 m/z, preferiblemente aproximadamente 2033,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1837 a aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z para *Klebsiella pneumoniae* y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1960 a aproximadamente 1966 m/z, preferiblemente 1963 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1847 a aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z para *Klebsiella pneumoniae* y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1970 y aproximadamente 1976 m/z, preferiblemente 1973 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2059 a aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae* y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2182 y aproximadamente 2188 m/z, preferiblemente 2185 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2075 a aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z para *Klebsiella pneumoniae* y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina

comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2198 y aproximadamente 2204 m/z, preferiblemente 2201 m/z para *Klebsiella pneumoniae*.

[0061] En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp* y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1918 y aproximadamente 1920 m/z, preferiblemente aproximadamente 1919,2 m/z para *Salmonella spp*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para *Salmonella spp* y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1944 y aproximadamente 1950 m/z, preferiblemente 1947 m/z, para *Salmonella spp*. En otra realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2031 a aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella spp* y un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2154 y aproximadamente 2160 m/z, preferiblemente 2157 m/z, para *Salmonella spp*.

[0062] La intensidad se puede normalizar al lípido A nativo. En una realización, se puede calcular una relación entre un pico definido y el lípido A nativo.

[0063] El término "intensidad" se refiere al valor más alto de un pico a lo largo del eje y de una salida de espectro de masas, lo que representa la intensidad de señal del ión (por ejemplo, analito).

[0064] El experto en la materia entiende que un "pico" en un espectro de masas tiene un valor de intensidad *minus* por encima de la de fondo. En una realización, un pico puede ser cualquier valor m/z que tenga una intensidad de al menos dos veces (por ejemplo, 2x) la intensidad de la intensidad promedio de los picos de fondo. De forma adecuada, un pico puede ser cualquier valor m/z que tenga una intensidad de al menos seis veces (por ejemplo, 6x) u ocho veces (por ejemplo, 8x) la intensidad de la intensidad promedio de los picos de fondo. De forma adecuada, un pico puede ser cualquier valor m/z que tenga una intensidad de al menos diez veces (por ejemplo, 10x) o doce veces (por ejemplo, 12x) la intensidad de la intensidad promedio de los picos de fondo.

[0065] En una realización, una relación de intensidad del primer pico definido (indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina) con respecto al segundo pico definido (indicativo de la presencia de lípido A nativo) es al menos 0,10.

[0066] De forma adecuada, la relación de intensidad del primer pico definido (indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina) con respecto al segundo pico definido puede ser al menos aproximadamente 0,10:1, 0,15:1, 0,30:1, 0,45:1, 1:1, 1,15:1, 1,30:1, 1,45:1, 2:1, 2,15:1, 2,30:1 o 2,45:1. Preferiblemente, la relación puede estar entre 0,15:1 y 2,5:1, o la relación puede estar entre 0,15:1 y 1:1.

[0067] Ventajosamente, una relación de al menos aproximadamente 0,10, tal como se describe anteriormente, indica la presencia de bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico (por ejemplo, polimixina). El cálculo de esta relación puede evitar la detección de falsos positivos de la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico (por ejemplo, debido a picos de fondo).

[0068] En una realización, un procedimiento de la invención comprende además identificar en una salida de espectro de masas un tercer pico definido que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 unidades m/z (preferiblemente 25 unidades m/z) mayor que un segundo pico definido. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que dicho tercer pico definido sólo se detecta en una muestra de ensayo que comprende una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido. Ventajosamente, los procedimientos de la invención permiten por tanto la detección de bacterias resistentes a antibióticos de polipéptidos catiónicos cíclicos codificadas por plásmidos y codificadas por cromosomas en un único análisis. Por ejemplo, cuando las bacterias se han aislado de un paciente infectado, esto permite separar a los pacientes infectados con dichas bacterias, por ejemplo, para la cuarentena de pacientes infectados con bacterias resistentes a polimixina codificada por plásmido.

[0069] En una realización, dicho tercer pico definido como se identifica en una salida de espectro de masas en cualquier procedimiento de la presente invención es indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina. En una realización preferible, dicho tercer pico definido identificado en una salida del espectro de masas en cualquier procedimiento de la presente invención es indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina en el grupo fosfato 1' del lípido A con pérdida concomitante del grupo fosfato 4'.

[0070] En una realización, el segundo pico definido se selecciona del grupo que consiste en:
a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp* y *Klebsiella oxytoca*;

- b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*.
- c. pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1837 a aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- 5 d. pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1847 a aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- e. pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2059 a aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- 10 f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2075 a aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp*;
- h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para *Salmonella spp*; o
- 15 i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2031 a aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella spp*.

[0071] En una realización, el segundo pico definido se selecciona del grupo que consiste en:

- 20 a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;
- b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*.

25 [0072] En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, o entre aproximadamente 1796 y aproximadamente 1797 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*. En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1837 y aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1847 y aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2059 y aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2075 y aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp*. En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para *Salmonella spp*. En una realización, un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 22 y aproximadamente 28 unidades m/z, preferiblemente aproximadamente 25 unidades m/z, mayor que un segundo pico definido, en el que un segundo pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2031 y aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella spp*.

[0073] En una realización, un tercer pico definido se selecciona del grupo que consiste en:

- 65 a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1818 a aproximadamente 1824 m/z, preferiblemente 1821 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;

- b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1845 a aproximadamente 1852 m/z, preferiblemente 1848,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- c. pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1863 a aproximadamente 1868 m/z, preferiblemente 1865 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- 5 d. pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1872 a aproximadamente 1878 m/z, preferiblemente 1875 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- e. pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2084 a aproximadamente 2090 m/z, preferiblemente 2087 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- 10 f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2100 a aproximadamente 2105 m/z, preferiblemente 2103 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1818 a aproximadamente 1824 m/z, preferiblemente 1821,2 m/z, para *Salmonella spp*;
- h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1846 a aproximadamente 1852 m/z, preferiblemente 1849 m/z, para *Salmonella spp*; o
- 15 i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2056 a aproximadamente 2062 m/z, preferiblemente 2059 m/z, para *Salmonella spp*.

[0074] En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) entre aproximadamente 1818 y aproximadamente 1824 m/z, preferiblemente aproximadamente 1821 m/z para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*. En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre 1845 y aproximadamente 1852 m/z, preferiblemente 1848,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1837 y aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre 1863 y aproximadamente 1868 m/z, preferiblemente 1865 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*.

[0075] En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1847 y aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1872 y aproximadamente 1878 m/z, preferiblemente 1875 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2059 y aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2084 y aproximadamente 2090 m/z, preferiblemente 2087 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2075 y aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2100 y aproximadamente 2105 m/z, preferiblemente 2103 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1818 y aproximadamente 1824 m/z, preferiblemente 1821,2 m/z, para *Salmonella spp*. En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1846 y aproximadamente 1852 m/z, preferiblemente 1849 m/z, para *Salmonella spp*. En una forma de realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa-carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) entre aproximadamente 1846 y aproximadamente 1852 m/z, preferiblemente 1849 m/z, para *Salmonella spp*. En una realización, el lípido A nativo (segundo pico definido) comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2031 y aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z y un tercer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de entre 2056 y aproximadamente 2062 m/z, preferiblemente 2059 m/z, para *Salmonella spp*.

[0076] Ventajosamente, la identificación de la presencia de la tercera definido como se describe anteriormente indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmidos, preferiblemente en el que dicha bacteria es de la familia *Enterobacteriaceae*. Asimismo, la ausencia del tercer pico definido puede indicar la ausencia de una bacteria resistente a un polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido, preferiblemente en donde dicha bacteria es de la familia *Enterobacteriaceae*.

[0077] En una realización, la presencia de dicho tercer pico definido indica la presencia de una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus* o *Citrobacter youngae*) resistentes a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico mediante resistencia codificada por plásmidos.

[0078] En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, que comprende:

a. someter una muestra de ensayo a análisis de espectrometría de masas y generar una salida de espectro de masas; en el que dicha muestra de ensayo comprende una membrana bacteriana o un fragmento de la misma, en el que el fragmento comprende un componente que no es lípido A;

b. identificar en dicha salida de espectro de masas un primer pico definido y/o un tercer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina, en el que dicho primer pico definido y/o tercer pico definido es un pico presente en una salida de espectro de masas para lípido A modificado por fosfoetanolamina y en el que dicho primer pico definido y/o dicho tercer pico definido está ausente de una salida de espectro de masas correspondiente para el lípido A nativo; y

c. en el que la presencia de dicho primer pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico, y en el que la ausencia de dicho primer pico definido indica la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico; y/o

en el que la presencia de dicho tercer pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico a través de la resistencia codificada por plásmido, y en el que la ausencia de dicho tercer pico definido indica la ausencia de una bacteria resistente a un polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido.

[0079] En una realización, una relación de intensidad de:

el tercer pico definido; con respecto al

segundo pico definido es al menos aproximadamente 0,15:1, o al menos aproximadamente 0,6:1.

[0080] De forma adecuada, la relación de intensidad del tercer pico definido con respecto al segundo pico definido puede estar entre al menos aproximadamente 0,15:1 y aproximadamente 2,5:1. De forma adecuada, la relación puede estar entre aproximadamente 0,6:1 y aproximadamente 1:1. De forma adecuada, la relación puede ser de al menos aproximadamente 0,15:1, 0,3:1, 0,45:1, 0,6:1, 0,75:1, 0,9:1, 1,15:1, 1,3:1, 1,45:1, 1,6:1, 1,75:1, 1,9:1, 2,15:1, 2,3:1 o 2,45:1.

[0081] Así, en una realización, una relación de intensidad del tercer pico definido con respecto al segundo pico definido, en la que la relación es al menos aproximadamente 0,15:1, indica la presencia de una bacteria (por ejemplo, de la familia *Enterobacteriaceae*) resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido. Asimismo, una relación de menos de 0,15:1 indica la ausencia de una bacteria resistente a un polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido.

[0082] En una realización, una relación de:

la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido; con respecto a la intensidad del segundo pico definido es de al menos aproximadamente 0,15:1.

[0083] De forma adecuada, la relación de la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido con respecto a la intensidad del segundo pico definido es de al menos 0,15:1, 0,3:1, 0,45:1, 0,6:1, 0,75:1, 0,9:1, 1,15:1, 1,3:1, 1,45:1, 1,6:1, 1,75:1, 1,9:1, 2,15:1, 2,3:1 o 2,45:1.

[0084] En una realización preferible, una relación de:

la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido; con respecto a la intensidad del segundo pico definido es de al menos aproximadamente 0,5:1.

[0085] De forma adecuada, la relación de la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido con respecto a la intensidad del segundo pico definido es de al menos aproximadamente 0,5:1, 0,75:1, 0,9:1, 1,15:1, 1,3:1, 1,45:1, 1,6:1, 1,75:1, 1,9:1, 2,15:1, 2,3:1, 2,45:1, 2,6:1, 2,75:1, 2,9:1, 3,15:1, 3,3:1, 3,45:1, 3,6:1, 3,75:1, 3,9:1, 4,15:1, 4,3:1, 4,45:1, 4,6:1, 4,75:1, 4,9:1 o 5:1.

[0086] De manera ventajosa, en una bacteria (por ejemplo, de la familia *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp) resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, al comparar la relación de intensidad del tercer pico definido con el segundo pico definido proporciona más información sobre el mecanismo subyacente al mecanismo de resistencia. La detección de una bacteria (por ejemplo, de la familia *Enterobacteriaceae*) resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido en una muestra de ensayo es de particular importancia, ya que dichas muestras de ensayo o pacientes de los que se derivan dichas muestras de ensayo deben estar contenidas de forma segura/puestas en cuarentena para evitar la propagación (o el riesgo de la misma) del plásmido transmisible a otra bacteria, propagando así la resistencia codificada por el plásmido.

[0087] En una realización, una relación de la suma de la intensidad del pico primero definido y la intensidad de la tercera pico definido con respecto a la intensidad del segundo pico definido de al menos aproximadamente 0,5:1 es indicativa de la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido.

[0088] En una realización, una relación de:

la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido; con respecto a la intensidad del segundo pico definido está entre aproximadamente 0,1:1 y 0,5:1.

- 5 [0089] De forma adecuada, la relación de la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido con respecto a la intensidad del segundo pico definido está entre aproximadamente 0,15:1 y 0,45:1, entre aproximadamente 0,2:1 y 0,4:1 o entre aproximadamente 0,25:1 y 0,35:1.

- 10 [0090] En una realización, una relación de la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido con respecto a la intensidad del segundo pico definido de entre aproximadamente 0,1:1 y 0,5:1 es indicativo de la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosomas.

[0091] En una realización, una relación de:

- 15 la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido; con respecto a la intensidad del segundo pico definido es menor de aproximadamente 0,1:1.

- [0092] De forma adecuada, la relación de la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido con respecto a la intensidad del segundo pico definido es menor que aproximadamente 0,1:1, 0,08:1, 0,06:1, 0,04:1, 0,02:1 o 0,01:1.

- [0093] En una realización, la relación de la suma de la intensidad del primer pico definido y la intensidad del tercer pico definido con respecto a la intensidad del segundo pico definido de menos de aproximadamente 0.1:1 es indicativo de la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico.

- 25 [0094] En una realización, un procedimiento descrito en este documento comprende además identificar en dicha salida de espectro de masas un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa, que comprende una relación de masa/carga de aproximadamente 129 a 133 unidades m/z (preferiblemente aproximadamente 131 unidades m/z) mayores que el segundo pico definido indicativo de la presencia de lípido A nativo.

[0095] En una realización, el segundo pico definido se selecciona del grupo que consiste en:

- 35 a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;
b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
c. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1837 a aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
40 d. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1847 a aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
e. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2059 a aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2075 a aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
45 g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1614 a aproximadamente 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*;
h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1907 a aproximadamente 1913 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*;
50 i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp.*;
j. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para *Salmonella spp.*; o
k. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2031 a aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella spp.*

[0096] En una realización, el cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa se selecciona del grupo que consiste en:

- 60 a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1924 a aproximadamente 1930 m/z, preferiblemente 1927,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;
b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1951 a aproximadamente 1957 m/z, preferiblemente 1954,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
65 c. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1968 a aproximadamente 1974 m/z, preferiblemente 1971 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;

- d. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1978 a aproximadamente 1984 m/z, preferiblemente 1981 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- e. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2190 a aproximadamente 2196 m/z, preferiblemente 2193 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- 5 f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2206 a aproximadamente 2212 m/z, preferiblemente 2209 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1745 a aproximadamente 1751 m/z, preferiblemente 1748,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*;
- 10 h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2038 a aproximadamente 2044 m/z, preferiblemente 2041,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*;
- i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1924 a aproximadamente 1930 m/z, preferiblemente 1927,2 m/z, para *Salmonella spp*;
- j. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1952 a aproximadamente 1958 m/z, preferiblemente 1955 m/z, para *Salmonella spp*; o
- 15 k. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2162 a aproximadamente 2168 m/z, preferiblemente 2165 m/z, para *Salmonella spp*.

[0097] En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1924 y aproximadamente 1930 m/z, preferiblemente 1927,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter. spp* y *Klebsiella oxytoca*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1951 y aproximadamente 1957 m/z, preferiblemente 1954,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa-carga (m/z) de entre aproximadamente 1837 y aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1968 y aproximadamente 1974 m/z, preferiblemente 1971 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1847 y aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación de masa a carga (m/z) de entre aproximadamente 1978 y aproximadamente 1984 m/z, preferiblemente 1981 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2059 y aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa-carga (m/z) de entre aproximadamente 2190 y aproximadamente 2196 m/z, preferiblemente 2193 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2075 y aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación de masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2206 y aproximadamente 2212 m/z, preferiblemente 2209 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1614 y aproximadamente 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa-carga (m/z) de entre aproximadamente 1745 y aproximadamente 1751 m/z, preferiblemente 1748,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1907 y aproximadamente 1913 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2038 y aproximadamente 2044 m/z, preferiblemente 2041,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa-carga (m/z) entre aproximadamente 1924 y aproximadamente 1930 m/z, preferiblemente 1927,2 m/z, para *Salmonella spp*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1952 y aproximadamente 1958 m/z, preferiblemente 1955 m/z, para *Salmonella spp*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2031 y aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, y un cuarto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa-carga (m/z) entre aproximadamente 2162 y aproximadamente 2168 m/z, preferiblemente 2165 m/z, para *Salmonella spp*.

[0098] En una realización, la presencia de dicho cuarto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosoma. En una realización, la ausencia de dicho cuarto pico definido indica la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de una resistencia codificada por cromosomas.

[0099] En una realización, la presencia de dicho primer pico definido (por ejemplo, indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina) y la ausencia de dicho cuarto definido pico indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de resistencia codificada por plásmido. En una realización, la ausencia de dicho primer pico definido y la presencia de dicho cuarto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosoma. La resistencia a la polimixina codificada por plásmido se asocia típicamente con el lípido A modificado por fosfoetanolamina (por ejemplo, no modificado adicionalmente por 4-amino-L-arabinosa).

[0100] En una realización, la presencia de dicho tercer pico definido (por ejemplo, indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina en el grupo fosfato 1' con pérdida concomitante del fosfato 4') y la ausencia de dicho cuarto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmidos y la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosomas. En una realización, la ausencia de dicho tercer pico definido y la presencia de dicho cuarto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de una resistencia codificada por cromosomas y la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmidos.

[0101] En un aspecto, se demuestra un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, que comprende:

a. someter una muestra de ensayo a análisis de espectrometría de masas y generar una salida de espectro de masas; en el que dicha muestra de ensayo comprende una membrana bacteriana o un fragmento de la misma, en el que el fragmento comprende un componente que no es de lípido A;

b. identificar en dicha salida del espectro de masas un cuarto pico definido (por ejemplo, cualquier cuarto pico definido como se definió anteriormente) indicativo de la presencia de lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa, en el que dicho cuarto pico definido es un pico presente en una salida de espectro de masas para el lípido A modificado por 4-amino-L-arabinosa y en el que dicho cuarto pico definido está ausente de una salida del espectro de masas correspondiente para el lípido A nativo; y

c. en el que la presencia de dicho cuarto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, y en el que la ausencia de dicho cuarto pico definido indica la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico.

[0102] En una realización, un procedimiento, tal como se describe en el presente documento, comprende además identificar en dicha salida de espectro de masas un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa, que comprende una relación masa/carga de aproximadamente 253 a 257 unidades m/z (preferiblemente aproximadamente 254 unidades m/z) mayor que el segundo pico definido indicativo de la presencia de lípido A nativo.

[0103] En una realización, el segundo pico definido se selecciona del grupo que consiste en:

a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;

b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;

c. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1837 a aproximadamente 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;

d. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1847 a aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;

e. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2059 a aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;

f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2075 a aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;

g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1614 a aproximadamente 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*;

h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1907 a aproximadamente 1913 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*;

i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1793 a aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp.*;

j. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1820 a aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para *Salmonella spp.*; o

k. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2031 a aproximadamente 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella spp.*

[0104] En una realización, el quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa se selecciona del grupo que consiste en:

- a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2047 a aproximadamente 2053 m/z, preferiblemente 2050 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;
- 5 b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2074 a aproximadamente 2080 m/z, preferiblemente 2077 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- c. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2091 a aproximadamente 2097 m/z, preferiblemente 2094 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- d. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2101 a aproximadamente 2107 m/z, preferiblemente 2104 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- 10 e. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2313 a aproximadamente 2319 m/z, preferiblemente 2316 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2329 a aproximadamente 2335 m/z, preferiblemente 2332 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
- 15 g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 1868 a aproximadamente 1874 m/z, preferiblemente 1871,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*;
- h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2161 a aproximadamente 2167 m/z, preferiblemente 2164,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*;
- i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2047 a aproximadamente 2053 m/z, preferiblemente 2050,2 m/z, para *Salmonella spp.*;
- 20 j. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2075 a aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Salmonella spp.*; o
- k. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de aproximadamente 2285 a aproximadamente 2291 m/z, preferiblemente 2288 m/z, para *Salmonella spp.*
- 25 [0105] En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2047 y aproximadamente 2053 m/z, preferiblemente 2050 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*. En una realización, el lípido A
- 30 nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1820 y aproximadamente 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2074 y aproximadamente 2080 m/z, preferiblemente 2077 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1837 y aproximadamente 1843 m/z,
- 35 preferiblemente 1840 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación de masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2091 y aproximadamente 2097 m/z, preferiblemente 2094 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1847 y aproximadamente 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por
- 40 fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2101 y aproximadamente 2107 m/z, preferiblemente 2104 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2059 y aproximadamente 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2313
- 45 y aproximadamente 2319 m/z, preferiblemente 2316 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2075 y aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación de masa a carga (m/z) de entre aproximadamente 2329 y aproximadamente 2335 m/z, preferiblemente 2332 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*. En una realización, el
- 50 lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1614 y aproximadamente 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1868 y aproximadamente 1874 m/z, preferiblemente 1871,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1907 y aproximadamente 1913
- 55 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2161 y aproximadamente 2167 m/z, preferiblemente 2164,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*. En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 1793 y aproximadamente 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por
- 60 fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2047 y aproximadamente 2053 m/z, preferiblemente 2050,2 m/z, para *Salmonella spp.* En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2075 y aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2075
- 65 y aproximadamente 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Salmonella spp.* En una realización, el lípido A nativo comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2031 y aproximadamente 2037 m/z,

preferiblemente 2034 m/z y un quinto pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa comprende una relación masa/carga (m/z) de entre aproximadamente 2285 y aproximadamente 2291 m/z, preferiblemente 2288 m/z, para *Salmonella spp.*

[0106] En una realización, la presencia de dicho quinto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosoma. En una realización, la ausencia de dicho quinto pico definido indica la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de una resistencia codificada por cromosomas. La resistencia a la polimixina codificada por cromosomas puede asociarse típicamente con el lípido A modificado por fosfoetanolamina y/o el lípido A modificado tanto con fosfoetanolamina como con 4-amino-L-arabinosa (por ejemplo, la presencia tanto del primer pico definido como del quinto pico definido).

[0107] En una realización, la presencia de dicho primer pico definido (por ejemplo, indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina) y la ausencia de dicho quinto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de resistencia codificada por plásmido. En una realización, la ausencia de dicho primer pico definido y la presencia de dicho quinto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosoma.

[0108] En una realización, la presencia de dicho tercer pico definido (por ejemplo, indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina en el grupo fosfato 1' con pérdida concomitante del fosfato 4') y la ausencia de dicho quinto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido y la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosomas. En una realización, la ausencia de dicho tercer pico definido y la presencia de dicho quinto pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de una resistencia codificada por cromosomas y la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmidos.

[0109] Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de resistencia codificada por plásmido comprende un plásmido que tiene un gen *mcr-1*, *mcr-2*, un gen similar a *mcr* o una combinación de los mismos. Una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido puede comprender un plásmido que tiene un gen *mcr-1* (por ejemplo, *mcr-1*, *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9* y/o *mcr-1.10*), un gen *mcr-2* (por ejemplo, *mcr-2* y/o *mcr-2.2*), un gen *mcr-3* (por ejemplo, *mcr-3* y/o *mcr-3.2*), un gen *mcr-4* (por ejemplo, *mcr-4*), un gen *mcr-5* (por ejemplo, *mcr-5*), un gen similar a *mcr* o una combinación de los mismos. Adecuadamente, el lípido A modificado con fosfoetanolamina en el grupo fosfato 1' del lípido A con pérdida concomitante del grupo fosfato 4' (por ejemplo, como para el tercer pico definido descrito en el presente documento) solo es detectable en una bacteria que comprende un plásmido que comprende uno o más de dichos genes *mcr*, y no es detectable en una bacteria que carece de dicho plásmido.

[0110] En una realización, una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmidos o una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmidos comprende un plásmido que tiene un gen de resistencia a la colistina movilizado. En una realización, un gen de resistencia a la colistina movilizado comprende uno o más de *mcr-1*, *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9*, *mcr-1.10*, *mcr-2*, *mcr-2.2*, *mcr-3*, *mcr-3.2*, *mcr-4*, *mcr-5* o un gen similar a *mcr*. En una realización, un gen de resistencia a colistina movilizadoa comprende uno o más de *mcr-1*, *mcr-2* o un gen similar a *mcr*.

[0111] Un "gen similar o de tipo *mcr*" como se usa en el presente documento es un gen que comprende una secuencia que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido equivalente funcionalmente y/o estructuralmente al polipéptido codificado por un gen *mcr-1* o *mcr-2*. Un "gen similar o de tipo *mcr*" como se usa en este documento es un gen que comprende una secuencia que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido funcional y/o estructuralmente equivalente al polipéptido codificado por *mcr-1*, *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9*, *mcr-1.10*, *mcr-2*, *mcr-2.2*, *mcr-3*, *mcr-3.2*, *mcr-4* o *mcr-5*.

[0112] En una realización, un gen similar a *mcr* es un gen que comprende una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con *mcr-1*, *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9*, *mcr-1.10*, *mcr-2*, *mcr-2.2*, *mcr-3*, *mcr-3.2*, *mcr-4* o *mcr-5*. En una realización, dicho gen similar a *mcr* comprende al menos 60% o 70% de identidad de secuencia con *mcr-1*, *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9*, *mcr-1.10*, *mcr-2*, *mcr-2.2*, *mcr-3*, *mcr-3.2*, *mcr-4* o *mcr-5*. Adecuadamente, el gen similar a *mcr* comprende al menos 80% o 90% (por ejemplo, al menos 95%) de identidad de secuencia con *mcr-1*, *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9*, *mcr-1.10*, *mcr-2*, *mcr-2.2*, *mcr-3*, *mcr-3.2*, *mcr-4* o *mcr-5*.

[0113] En una realización, un gen similar a *mcr* es un gen que comprende una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con *mcr-1* o *mcr-2*. En una realización, dicho gen similar a *mcr* comprende al menos 60% o

70% de identidad de secuencia con *mcr-1* o *mcr-2*. De manera adecuada, el gen similar a *mcr* comprende al menos 80% o 90% (por ejemplo, al menos 95%) de identidad de secuencia con *mcr-1* o *mcr-2*.

[0114] En una realización, un gen *mcr-1* tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 o una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con las mismas, adecuadamente al menos 60%, 70 %, 80% o 90% de identidad de secuencia con las mismas. En una realización, un gen *mcr-1* tiene la secuencia SEQ ID NO: 1, o una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la misma, adecuadamente al menos 60%, 70%, 80% o 90% de identidad de secuencia con la misma.

[0115] En una realización, un gen *mcr-2* tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, o una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la misma, adecuadamente al menos 60%, 70%, 80% o 90% de identidad de secuencia con las mismas. En una realización, un gen *mcr-2* tiene la secuencia SEQ ID NO: 11, o una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la misma, adecuadamente al menos 60%, 70%, 80% o 90% de identidad de secuencia con la misma.

[0116] En una realización, un gen *mcr-3* tiene la secuencia de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con las mismas, adecuadamente al menos 60%, 70%, 80% o 90% de identidad de secuencia con las mismas.

[0117] En una realización, un gen *mcr-4* tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15, o una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la misma, adecuadamente al menos 60%, 70%, 80% o 90% de identidad de secuencia con la misma.

[0118] En una realización, un gen *mcr-5* tiene la secuencia de SEQ ID NO: 16, o una secuencia que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con la misma, adecuadamente al menos 60%, 70%, 80% o 90% de identidad de secuencia con la misma.

[0119] Una bacteria puede ser resistente a un antibiótico polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosomas. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por cromosomas comprende una mutación en uno o más genes seleccionados entre *pmrA*, *pmrB*, *pmrC*, *pmrD*, *pmrE*, *pmrR*, *phoP*, *phoQ*, *mgrB*, *arnA*, *arnB*, *arnC*, *arnD*, *arnE*, *arnF*, *arnF*, *arnT*, *cptA*, *eptB* y combinaciones de los mismos. Dichas mutaciones pueden resultar, directa o indirectamente, en la modificación del lípido A con 4-amino-L-arabinosa y/o fosfoetanolamina. Una "mutación" abarca cualquier alteración de la secuencia de nucleótidos de un gen, una mutación puntual, una mutación de sentido alterado o erróneo ("missense"), una mutación sin sentido, una inserción, una delección, una duplicación, una mutación por desplazamiento del marco o una expansión repetida.

[0120] En una realización, una muestra de ensayo se mezcla con una solución matriz antes de someter dicha muestra de ensayo al análisis de espectrometría de masas. Una solución matriz facilita la espectrometría de masas de una muestra de ensayo, adecuadamente en la que la espectrometría de masas es espectrometría de masas MALDI-TOF.

[0121] En una realización, una solución matriz como se describe en el presente documento permite la extracción selectiva, co-cristalización e ionización de lípido A nativo y/o lípido A modificado como una parte integral de una membrana bacteriana. En una realización, una solución matriz como se describe en el presente documento permite la identificación de un pico asignado al lípido A nativo y/o al lípido A modificado (por ejemplo, al permitir la extracción selectiva, co-cristalización e ionización del lípido A nativo y/o lípido A modificado) como parte integral de una membrana bacteriana.

[0122] Así, en un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición preparada para su uso en la espectrometría de masas, comprendiendo dicha composición una membrana bacteriana o fragmento de la misma y una solución matriz.

[0123] En una realización, una solución matriz comprende ácido 2,5-dihidroxibenzoico suspendido en un disolvente orgánico. En una realización, una solución matriz comprende ácido 2,5-dihidroxibenzoico suspendido en un disolvente orgánico a una concentración de aproximadamente 1 a 100 mg/ml. En una realización, una solución matriz comprende ácido 2,5-dihidroxibenzoico suspendido en un disolvente orgánico a una concentración de aproximadamente 7 a 13 mg/ml. Preferiblemente, el ácido 2,5-dihidroxibenzoico se suspende en un disolvente orgánico a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml.

[0124] En una realización, una solución matriz comprende uno o más seleccionados de norharmane (NRM), 3-hidroximetil- β -carbolina, 3-metil- α -carbolina, 2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de etilo, β -carbolina-3-carboxilato de etilo, ácido 1-metilindol-2-carboxílico, metyoduro de norharman, N-metilamida del ácido β -carbolina-3-carboxílico, clorhidrato de harmalina deshidratado, ácido 1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolin-1-carboxílico, 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido [3,4-b] indol, harmane, harmina, harmalina o una combinación de los mismos suspendidos en un disolvente orgánico. En una realización, una solución matriz comprende uno o más seleccionados de norharmane

(NRM), 3-hidroximetil- β -carbolina, 3-metil-a-carbolina, 2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de etilo, β -carbolina-3-carboxilato de etilo, ácido 1-metilindol-2-carboxílico, metyoduro de norharman, N-metilamida del ácido β -carbolina-3-carboxílico, clorhidrato de harmalina deshidratado, ácido 1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolina-1-carboxílico, 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido [3, 4-b] indol, harmane, harmina, harmalina o una combinación de los mismos suspendidos en un disolvente orgánico a una concentración de 1 a 100 mg/ml. En una realización, una solución matriz comprende uno o más seleccionados de norharmane (NRM), 3-hidroximetil- β -carbolina, 3-metil-a-carbolina, 2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de etilo, β -carbolina-3-carboxilato de etilo, ácido 1-metilindol-2-carboxílico, metyoduro de norharman, N-metilamida del ácido β -carbolina-3-carboxílico, clorhidrato de harmalina deshidratado, ácido 1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolina-1-carboxílico, 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido [3,4-b] indol, harmane, harmina, harmalina o una combinación de las mismas suspendida en un disolvente orgánico a una concentración de 7 a 13 mg/ml. En una realización preferible, una solución matriz comprende uno o más seleccionados de norharmane (NRM), 3-hidroximetil- β -carbolina, 3-metil-a-carbolina, 2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de etilo, β -carbolina-3-carboxilato de etilo, ácido 1-metilindol-2-carboxílico, metyoduro de norharman, N-metilamida del ácido β -carbolina-3-carboxílico, clorhidrato de harmalina deshidratado, ácido 1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolina-1-carboxílico, 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido [3,4-b] indol, harmane, harmina, harmalina o una combinación de los mismos suspendidos en un disolvente orgánico en una concentración de 10 mg/ml.

[0125] En una realización, una solución matriz comprende norharmane (NRM) suspendido en un disolvente orgánico. En una realización, una solución matriz comprende norharmane suspendido en un disolvente orgánico a una concentración de 1 a 100 mg/ml. En una realización, una solución matriz comprende norharmane suspendido en un disolvente orgánico a una concentración de 7 a 13 mg/ml. En una realización preferible, una solución matriz comprende norharmane suspendido en un disolvente orgánico a una concentración de 10 mg/ml.

[0126] En una realización, un disolvente orgánico comprende cloroformo y metanol en una relación de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 12:1, o de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 10:1. De forma adecuada, un disolvente orgánico comprende cloroformo y metanol en una relación de aproximadamente 9:1 v/v.

[0127] En una realización, el disolvente orgánico comprende uno o más de cloroformo, metanol, diclorometano, éter, dietil éter, éter de petróleo, isopropanol, butanol, hexano o una combinación de los mismos.

[0128] En una realización, el disolvente orgánico comprende uno o más de ácido acético, acetona, acetonitrilo, benceno, 1-butanol, 2-butanol, 2-butanona, alcohol t-butilico, tetracloruro de carbono, clorobenceno, cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, dietilenglicol, éter dietílico, diglima (éter dimetilico de dietilenglicol), 1,2-dimetoxietano (glima, DME), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), 1,4-dioxano, etanol, acetato de etilo, etilenglicol, glicerina, heptano, hexametilfosforamida (HMPA), hexametilfósforo triamida (HMPT), hexano, metanol, metil t-butil éter (MTBE), cloruro de metileno, N-metil-2-pirrolidinona (NMP), pentano, éter de petróleo (ligroína), 1-propanol, 2-propanol, piridina, tetrahidrofurano (THF), tolueno, trietilamina, agua, agua (pesada), o-xileno, m-xileno, p-xileno.

[0129] En una realización, la relación de la muestra de ensayo con respecto a la solución de la matriz es de entre aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 2:1 v/v, o de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 0,7:1 v/v. De manera adecuada, la relación entre la muestra de ensayo y la solución matriz es de aproximadamente 0,66:1 v/v.

[0130] En una realización, una muestra de ensayo comprende menos de aproximadamente 10^{10} células bacterianas. De manera adecuada, una muestra de ensayo puede comprender menos de aproximadamente 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 o 10^1 células bacterianas.

[0131] En una realización, una muestra de ensayo comprende entre aproximadamente 10^1 y aproximadamente 10^{10} células bacterianas. De manera adecuada, una muestra de ensayo comprende entre aproximadamente 10^2 y aproximadamente 10^8 , de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 , o de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 células bacterianas.

[0132] En una realización, el antibiótico de polipéptido catiónico cíclico es un antibiótico de polimixina. De forma adecuada, un antibiótico de polimixina puede ser uno o más de colistina (polimixina E), polimixina B, matacina (polimixina M) o una sal de las mismas.

[0133] Preferiblemente, un antibiótico de polimixina puede ser colistina (polimixina E) o una sal de la misma. Una sal de colistina (polimixina E) puede ser sulfato de colistina o colistimetato de sodio.

[0134] En una realización una bacteria tal como se usa en el presente documento puede ser una o más seleccionadas de los siguientes géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Raoultella* o combinaciones de los mismos.

[0135] Convenientemente, una bacteria puede ser una o más seleccionadas de entre las siguientes especies: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*,

Salmonella enterica, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter youngae* o combinaciones de los mismos.

[0136] Cualquier cepa de tales géneros o especies puede ser adecuada para su uso en un procedimiento de la invención.

[0137] En una realización, una bacteria está inactivada por calor. Una bacteria puede inactivarse por calor usando cualquier técnica conocida en el sector, por ejemplo usando un baño seco o un baño de agua. Cuando se usa un baño seco o un baño de agua, una bacteria puede inactivarse por calor calentando entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 minutos a 70 a 90 °C (adecuadamente durante 30 minutos a 80 °C). En algunas realizaciones, una bacteria puede inactivarse por calor calentando durante al menos aproximadamente 45 minutos (preferiblemente al menos 1 hora) hasta al menos aproximadamente 80°C (preferiblemente al menos 90°C).

[0138] En algunas realizaciones, la bacteria no está inactivada por calor.

[0139] En una realización, un procedimiento de la presente invención comprende la etapa de registrar los datos obtenidos en la etapa (a) en un soporte de datos adecuado. Por tanto, la presente invención también proporciona un soporte de datos que comprende los datos obtenidos en la etapa (a) de un procedimiento del presente documento.

[0140] En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de cribado para identificar un inhibidor de la resistencia a los antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria, que comprende:

- a. incubar una muestra que comprende una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico con un inhibidor candidato;
 - b. someter dicha muestra a análisis de espectrometría de masas según un procedimiento de la presente invención y generar una salida de espectro de masas; y
 - c. identificar la presencia o ausencia de dicho primer pico definido en la salida del espectro de masas;
- en el que la presencia de dicho primer pico definido indica que dicho inhibidor candidato no es una sustancia capaz de inhibir la resistencia a antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria, y en el que la ausencia de dicho primer pico definido indica que dicho inhibidor candidato es una sustancia capaz de inhibir la resistencia a los antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria.

[0141] En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de cribado para identificar un inhibidor de la resistencia a los antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria, que comprende:

- a. incubar una muestra que comprende una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico con un inhibidor candidato;
 - b. someter dicha muestra a análisis de espectrometría de masas según un procedimiento de la presente invención y generar una salida de espectro de masas; y
 - c. identificar la presencia o ausencia de dicho primer pico definido y/o dicho tercer pico definido en la salida del espectro de masas;
- en el que la presencia de dicho primer pico definido y/o dicho tercer pico definido indica que dicho inhibidor candidato no es una sustancia capaz de inhibir la resistencia a antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria, y en el que la ausencia de dicho primer pico definido y/o dicho tercer pico definido indica que dicho inhibidor candidato es una sustancia capaz de inhibir la resistencia a antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria.

[0142] En un aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de cribado para identificar un inhibidor de la resistencia a los antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria, que comprende:

- a. incubar una muestra que comprende una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico con un inhibidor candidato;
 - b. someter dicha muestra a análisis de espectrometría de masas según un procedimiento de la presente invención y generar una salida del espectro de masas; y
 - c. identificar la presencia o ausencia de dicho primer pico definido, dicho tercer pico definido, dicho cuarto pico definido y/o dicho quinto pico definido en la salida del espectro de masas;
- en el que la presencia de dicho primer pico definido, dicho tercer pico definido, dicho cuarto pico definido y/o dicho quinto pico definido indica que dicho inhibidor candidato no es una sustancia capaz de inhibir la resistencia a antibióticos del polipéptido catiónico cíclico en una bacteria, y en el que la ausencia de dicho primer pico definido y/o dicho tercer pico definido indica que dicho inhibidor candidato es una sustancia capaz de inhibir la resistencia a antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria.

[0143] Dicho procedimiento o procedimientos de cribado abarcan el uso correspondiente de espectrometría de masas para la identificación de un inhibidor de la resistencia a antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria.

[0144] En una realización, en el que dicho procedimiento de cribado falla para identificar un inhibidor de la resistencia a los antibióticos de polipéptido catiónico cíclico (por ejemplo, polimixina) en una bacteria, las etapas a. - c. se repiten con un inhibidor candidato diferente. Esta secuencia puede repetirse iterativamente hasta que se identifique la ausencia del primer pico definido, lo que indica que el inhibidor candidato es una sustancia capaz de inhibir la resistencia a antibióticos del polipéptido catiónico cíclico en una bacteria. Una vez que se identifica la ausencia del

primer pico definido, dicho inhibidor candidato puede usarse como inhibidor de la resistencia a antibióticos del polipéptido catiónico cíclico en una bacteria.

[0145] En una realización, un procedimiento de cribado para identificar un inhibidor de la resistencia a los antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria comprende incubar una muestra que comprende una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido cíclico catiónico con un inhibidor candidato y, posteriormente, probar dicha bacteria para la susceptibilidad a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, en el que el análisis de espectrometría de masas de acuerdo con un procedimiento de la presente invención se usa para confirmar si una sustancia es capaz o no es capaz de inhibir la resistencia a antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria mediante la identificación de la presencia o ausencia de dicho primer pico definido y/o dicho tercer pico definido en una salida de espectro de masas.

[0146] En una realización, una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico puede aislarse de una muestra clínica. En una realización alternativa, la bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico puede cultivarse en condiciones de laboratorio.

[0147] Un inhibidor candidato puede ser capaz de inhibir directa o indirectamente la modificación de lípido A con 4-amino-L-arabinosa y/o fosfoetanolamina.

[0148] En una realización, un inhibidor candidato se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal o un fragmento de anticuerpo.

[0149] En una realización, un inhibidor candidato es una sustancia química o farmacéutica conocida seleccionada de una biblioteca de tales inhibidores candidatos.

[0150] En una realización, una muestra que comprende una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico con un inhibidor candidato es una muestra de un animal no humano o humano. Un animal no humano puede ser, por ejemplo, un primate no humano, caballo, vaca, cabra, gato, perro, oveja, roedor (por ejemplo, ratón, rata o conejillo de Indias), pez o anfibio (por ejemplo, *Xenopus*).

[0151] En un aspecto, se proporciona el uso de una muestra de ensayo en el análisis de espectrometría de masas para la detección de la presencia o ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico (por ejemplo, en dicha muestra de ensayo).

[0152] Los procedimientos para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, cuando se evalúa la identidad de la secuencia de ácido nucleico, una secuencia que tiene un número definido de nucleótidos contiguos puede alinearse con una secuencia de ácido nucleico (que tiene el mismo número de nucleótidos contiguos) de la porción correspondiente de una secuencia de ácido nucleico de la presente divulgación. Las herramientas conocidas en la técnica para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico incluyen Nucleotide BLAST.

[0153] Puede usarse cualquiera de una variedad de procedimientos de alineación de secuencias para determinar el porcentaje de identidad, incluidos, sin limitación, procedimientos globales, procedimientos locales y procedimientos híbridos, tales como, por ejemplo, procedimientos de aproximación por segmentos. Los protocolos para determinar el porcentaje de identidad son procedimientos de rutina dentro del alcance de un experto en la técnica. Los procedimientos globales alinean las secuencias desde el principio hasta el final de la molécula y determinan la mejor alineación sumando puntuaciones de pares de residuos individuales e imponiendo penalizaciones por huecos. Los procedimientos no limitantes incluyen, por ejemplo, CLUSTAL W, ver, por ejemplo, Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); y refinamiento iterativo, ver, por ejemplo, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996). Los procedimientos locales alinean secuencias identificando uno o más motivos conservados compartidos por todas las secuencias de entrada. Los procedimientos no limitativos incluyen, por ejemplo, Match-box, ver, por ejemplo, Eric Depiereux y Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992); muestreo de Gibbs, véase, por ejemplo, C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993); Align-M, véase, por ejemplo, Ivo Van Walle et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004).

[0154] Por lo tanto, la identidad de secuencia en porcentaje se determina mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986 y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-19, 1992. Brevemente, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineación utilizando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1 y la matriz de puntuación "blosum 62" de Henikoff y Henikoff (ibid.), tal como se muestra a continuación (los aminoácidos se indican mediante los códigos estándar de una letra).

PUNTUACIONES DE ALINEACIÓN PARA DETERMINAR LA IDENTIDAD DE LA SECUENCIA

[0155]

A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V

A 4

R -1 5

N -2 0 6

D -2 -2 1 6

C 0 -3 -3 -3 9

Q -1 1 0 0 -3 5

E -1 0 0 2 -4 2 5

G 0 -2 0 -1 -3 -2 -2 6

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8

I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4

L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4

K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5

M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5

F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6

P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7

S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4

T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 1 5

W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 11

Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7

V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

5

[0156] El porcentaje de identidad se calcula entonces como:

Número total de emparejamientos idénticos

----- x 100

10

[longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga a efectos de alinear las dos secuencias]

15

[0157] Los polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos (véase más adelante) y otras sustituciones que no afectan significativamente el plegamiento o la actividad del polipéptido; pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino- o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal, un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una etiqueta de afinidad.

20

SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS CONSERVATIVOS

Básico: arginina

lisina

histidina

25

Ácido: ácido glutámico

ácido aspártico

Polar: glutamina

asparagina

Hidrófobo: leucina

		isoleucina
		valina
	Aromático:	fenilalanina
5		triptófano
		tirosina
	Pequeño:	glicina
		alanina
		serina
10		treonina
		metionina

[0159] Además de los 20 aminoácidos estándar, los aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina) pueden ser sustituidos por residuos de aminoácidos de los polipéptidos descritos en este documento. Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético y aminoácidos no naturales pueden sustituirse por residuos de aminoácidos polipeptídicos. Los polipéptidos descritos en el presente documento también pueden comprender residuos de aminoácidos de origen no natural.

[0160] Los aminoácidos no naturales incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metano-prolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxi-prolina, N-metilglicina, alo-treonina, metil-treonina, hidroxietilhomocisteína, nitro-glutamina, homoglutamina, ácido piperídico, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen varios procedimientos en la técnica para incorporar residuos de aminoácidos de origen no natural en proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema in vitro, en el que se suprimen mutaciones sin sentido utilizando ARNt supresores químicamente aminoacilados. Se conocen en la técnica procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se lleva a cabo en un sistema libre de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos disponibles comercialmente. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman et al., Methods Enzymol. 202: 301, 1991; Chung et al., Science 259: 806-9, 1993; y Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145-9, 1993). En un segundo procedimiento, la traducción se lleva a cabo en ovocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271: 19991-8, 1996). Dentro de un tercer procedimiento, las células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que deba reemplazarse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos no naturales deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora al polipéptido en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide et al., Biochem. 33: 7470-6, 1994. Los residuos de aminoácidos de origen natural se pueden convertir en especies de origen no natural mediante modificación química in vitro. La modificación química se puede combinar con mutagénesis dirigida al sitio para ampliar aún más la gama de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993).

[0161] Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no son codificados por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales puede ser sustituidos por residuos de aminoácidos de los polipéptidos descritos en este documento.

[0162] Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos descritos en el presente documento pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de rastreo de alanina (Cunningham y Wells, Science 244: 1081-5, 1989). Los sitios de interacción biológica también pueden determinarse mediante análisis físico de la estructura, según se determina mediante técnicas, tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de los aminoácidos del posible sitio de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos et al., Science 255: 306-12, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309: 59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden inferirse del análisis de homologías con componentes relacionados (por ejemplo, la translocación o componentes de proteasa) de los polipéptidos descritos en el presente documento.

[0163] Las sustituciones de múltiples aminoácidos pueden realizarse y probarse usando procedimientos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241: 53-7, 1988) o Bowie y Sauer (Proc Natl Acad Sci. USA 86: 2152 - 6, 1989). Brevemente, estos autores describen procedimientos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y a continuación secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permitidas en cada posición. Otros procedimientos que se pueden usar incluyen la expresión en fagos (por ejemplo, Lowman et al., Biochem. 30: 10832-7, 1991; Ladner et al., Patente de EE.UU. No. 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., Gene 46: 145, 1986; Ner et al., DNA 7: 127, 1988).

[0164] Las sustituciones de múltiples aminoácidos pueden realizarse y probarse usando procedimientos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241: 53-7, 1988) o Bowie y Sauer (Proc Natl Acad Sci. USA 86: 2152 - 6, 1989). Brevemente, estos autores describen procedimientos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y a

continuación secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permitidas en cada posición. Otros procedimientos que se pueden usar incluyen la expresión en fagos (por ejemplo, Lowman et al., Biochem. 30: 10832-7, 1991; Ladner et al., Patente de EE.UU. No. 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., Gene 46: 145, 1986; Ner et al., DNA 7: 127, 1988).

[0165] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta descripción. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación.

[0166] Esta divulgación no está limitada por los procedimientos y materiales de ejemplo descritos en el presente documento, y cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o ensayo de realizaciones de esta divulgación. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

[0167] Los encabezamientos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente divulgación.

[0168] Otras definiciones de términos pueden aparecer en toda la memoria. Antes de que las realizaciones de ejemplo se describan con más detalle, debe entenderse que esta divulgación no se limita a las realizaciones particulares descritas y, como tal, puede variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente divulgación estará definido únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[0169] Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se describe específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido está incluido dentro de esta divulgación. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el que alguno, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también está comprendido dentro de esta divulgación, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o ambos de estos límites incluidos también están incluidos en esta divulgación.

[0170] Hay que señalar que, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una bacteria" incluye una pluralidad de dicha bacteria y la referencia a "la bacteria" incluye la referencia a una o más células bacterianas y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

[0171] Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí mencionado debe interpretarse como una admisión de que tales publicaciones constituyen la técnica anterior a las reivindicaciones adjuntas.

[0172] La presente invención se describirá ahora, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes Ejemplos.

FIGURAS

[0173] Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora, sólo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras que se acompañan, en las cuales:

La **figura 1** muestra un esquema que representa el análisis de lípidos en bacterias intactas mediante espectrometría de masas. La muestra de ensayo se coloca (11) en la diana MALDI (10) y se cubre con una solución matriz adecuada (12). La espectrometría de masas en modo de iones negativos o positivos se lleva a cabo utilizando cualquier máquina de espectrometría de masas adecuada (12) (por ejemplo, 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer de Applied Biosystems). La EM puede implicar el uso de una matriz de disolventes atípicos (disolventes orgánicos, CHCl₃, MeOH, PE, DE). MS = espectrometría de masas; CHCl₃ = cloro; MeOH = metanol; PE = éter de petróleo; DE = éter dietílico.

La **Figura 2 (A)** muestra estructuras típicas de: lípido A nativo (21) que tiene un tamaño de 1976 m/z; Lípido A modificado con fosfoetanolamina (pETN) en el fosfato 1' con pérdida concomitante del fosfato 4' (22) que tiene un tamaño de 1821 m/z; **(B)** muestra el lípido A modificado con pETN que tiene un tamaño de 1919 m/z (23); y Lípido A modificado con 4-amino-L-arabinosa (L-Ara4N) y pETN. Los números indican el número de átomos de carbono en cada cadena de ácido graso.

La **Figura 3** muestra un esquema de modificaciones del lípido A relacionadas con la resistencia a antibióticos de polipéptido cíclico (por ejemplo, polimixina) en una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*. La modificación del lípido A (31) con fosfoetanolamina (pETN) se produce en bacterias que comprenden un plásmido que tiene un gen de resistencia a colistina movilizado (MCR) o similar a *mcr* (32). La modificación del lípido A con 4-amino-L-arabinosa (L-Ara4N) y/o fosfoetanolamina (33) se produce en bacterias que comprenden ciertas alteraciones en genes (por ejemplo, *pmrA*, *pmrB*, *pmrC*, *pmrD*, *pmrE*, *pmrR*, *phoP*, *phoQ*, *mgrB*, *arnA*, *arnB*, *arnC*, *arnD*, *arnE*, *arnF*, *arnF*, *arnT*, *cptA*, *eptB*).

La **Figura 4** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados por un procedimiento de la presente invención, que demuestran la discriminación entre *Escherichia coli* (A) susceptible a polimixina, *E. coli* (B) resistente a polimixina codificada por cromosomas y *E. coli* resistente a polimixina codificada por plásmido (por ejemplo, *mcr-1* positivo) (C). Para cada espectro de masas, el pico en m/z 1796,2 se asignó al lípido A nativo, el pico en m/z 1919,2 se asignó al lípido A modificado por fosfoetanolamina, y el pico en 1821,2 se asignó al lípido A modificado por fosfoetanolamina en la posición 1' con pérdida concomitante del fosfato 4'.

La **Figura 5** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados por un procedimiento de la presente invención, que demuestran la discriminación entre *Escherichia coli* susceptible a polimixina (por ejemplo, *E. coli* J53) (panel superior) y *E. coli* resistente a polimixina codificada por plásmido (por ejemplo, *mcr-1* positivo) (por ejemplo, *E. coli* R4) (panel inferior). Para cada espectro de masas, el pico en m/z 1796,2 (50) se asignó al lípido A nativo (por ejemplo, un segundo pico definido), el pico en m/z 1919,2 (51) se asignó al lípido A modificado por fosfoetanolamina (por ejemplo, un primer pico definido).

La **Figura 6** muestra la distribución de las Relaciones de Resistencia a la Polimixina (PPR) para las 79 cepas de *E. coli* probadas (ver Figura 18). Se realizaron tres experimentos independientes para cada cepa. Los valores de corte para la discriminación entre la resistencia a la polimixina y la susceptibilidad a la polimixina (0,1) y para la discriminación entre la resistencia codificada por cromosomas y MCR a la polimixina (0,5) se indican mediante líneas punteadas grises y negras, respectivamente. $PPR_{E. coli} = (I_{1919} + I_{1821}) / I_{1796}$. I = Intensidad (por ejemplo, intensidad de pico en un espectro de masas).

La **Figura 7** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados por un procedimiento de la presente invención, que demuestran la discriminación entre *Klebsiella pneumoniae* susceptible a polimixina (panel superior) y *K. pneumoniae* resistente a polimixina codificada por plásmido (por ejemplo *mcr-1* positivo) (panel inferior). Para cada espectro de masas, el pico en m/z 1796,2 y m/z 1840 (71) se asigna al Lípido A nativo, el pico en m/z 1919,2 (72) se asigna al Lípido A modificado por fosfoetanolamina.

La **Figura 8** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados por un procedimiento de la presente invención, que demuestran la discriminación entre *Klebsiella spp.* susceptible a polimixina. (primer panel), *Klebsiella spp.* resistente a polimixina codificada por cromosoma (segundo panel), *Klebsiella spp.* resistente a polimixina codificada por plásmido (por ejemplo *mcr-1* positivo) (tercer panel) y *Klebsiella spp.* que son resistentes a polimixinas codificadas por plásmidos y cromosomas (panel inferior). Para cada espectro de masas, los picos en m/z 1824, m/z 1840, m/z 2062 y m/z 2078 se asignaron al lípido A nativo, los picos en m/z 1971 y m/z 2209 se asignaron al lípido A modificado por L-Ara4N y los picos m/z 1963 y m/z 2201 se asignaron al lípido A modificado por pETN.

La **Figura 9** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados con las cepas S1 y R1 de *A. baumannii*. Para cada espectro de masas, el pico en m/z 1910,3 (90) se asigna al lípido A nativo, el pico en m/z 2033,3 (91) se asigna al lípido A modificado por fosfoetanolamina. El panel superior representa los espectros de masas obtenidos de *A. baumannii* S1 susceptible a polimixina. El panel inferior representa los espectros de masas obtenidos de *A. baumannii* R1 resistente a polimixina.

La **Figura 10** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados con las cepas de *E. coli* S1 J53, R4 J53, R4 y R1. Para cada espectro de masas, el pico en m/z 1796,2 se asigna al lípido A nativo (por ejemplo, un segundo pico definido), el pico en m/z 1919,2 se asigna al lípido A modificado por fosfoetanolamina (por ejemplo, un primer pico definido). El pico en m/z 1821 (+ 25 m/z del lípido A nativo) (por ejemplo, un tercer pico definido) es típico de un espectro de masas generado mediante un procedimiento de la invención con bacterias *Enterobacteriaceae* resistentes a polimixinas codificadas por plásmido (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus* o *Citrobacter youngae*). El panel superior representa los espectros de masas obtenidos de *E. coli* J53 susceptible a polimixina. El panel del medio representa los espectros de masas obtenidos de *E. coli* R4 resistente a polimixina codificada por plásmido. El panel inferior representa los espectros de masas obtenidos de *E. coli* R1 resistente a polimixina.

La **Figura 11** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados con las cepas de *K. pneumoniae* S32, R46, R42. Para cada espectro de masas, el pico en m/z 1796,2 se asigna al lípido A nativo (por ejemplo, un segundo pico definido), el pico en m/z 1919,2 se asigna al lípido A modificado por fosfoetanolamina (por ejemplo, un primer pico definido). El pico en m/z 1821 (+ 25 m/z del lípido A nativo) (por ejemplo, un tercer pico definido) es típico de un espectro de masas generado a través de un procedimiento de la invención con bacterias *Enterobacteriaceae* resistentes a la polimixina codificadas por plásmidos (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus* o *Citrobacter youngae*). El panel superior representa los espectros de masas obtenidos de *K. pneumoniae* S32 susceptible a la polimixina. El panel del medio representa los espectros de masas obtenidos de *K. pneumoniae* R46 resistente a polimixina codificada por plásmido. El panel inferior representa los espectros de masas obtenidos de *K. pneumoniae* KpR42 resistente a polimixina codificada por cromosomas.

La **Figura 12** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados por un procedimiento de la presente invención, que demuestran la discriminación entre *Salmoella spp.* susceptible a polimixina. (panel superior), *Salmonella spp.* resistente a la polimixina codificada por cromosomas (panel central) y *Salmonella spp.* resistente a polimixina codificada por plásmido (panel inferior). Para cada espectro de masas, el pico en m/z 1796 se asignó al lípido A nativo, los picos en m/z 1919 y m/z 2034 se asignaron al lípido A modificado por fosfoetanolamina, el pico en m/z se asignó a lípido A modificado con L-Ara4N, y los picos en 1919 y 2157 se asignaron al lípido A modificado por fosfoetanolamina.

La **Figura 13** muestra un gráfico de relaciones de ejemplo de lípido A modificado con fosfoetanolamina con respecto a lípido A nativo, obtenido para *E. coli* susceptible a polimixina (n = 44) y resistente a polimixina (n = 8), calculado de la siguiente manera: intensidad del pico del lípido A modificado por fosfoetanolamina/intensidad del pico de lípido A nativo, por ejemplo Intensidad del pico m/z 1919/Intensidad del pico m/z 1796. El diagrama de caja representa los datos por sus cuartiles.

La **Figura 14** muestra ejemplos de espectros de masas MALDI generados por un procedimiento de la presente invención de *E. coli* cultivada en varios medios clínicamente relevantes. (A) muestra espectros de masas para bacterias cultivadas en medio Mueller-Hinton; se muestran espectros de masas representativos para bacterias susceptibles a la polimixina (panel superior) que tienen PRR *E. coli* = 0, bacterias resistentes a la polimixina codificadas por plásmido (panel central) que tienen PRR *E. coli* = 3,83, y bacterias resistentes a polimixina codificadas por cromosomas (panel inferior) que tienen PRR *E. coli* = 0,24. (B) muestra espectros de masas para bacterias cultivadas en medio de caldo de lisogenia; se muestran espectros de masas representativos para bacterias susceptibles a la polimixina (panel superior) que tienen PRR *E. coli* = 0, bacterias resistentes a la polimixina codificadas por plásmidos (panel central) que tienen PRR *E. coli* = 2,89 y bacterias resistentes a la polimixina codificadas por cromosomas (panel inferior) que tiene PRR *E. coli* = 0,35. (C) muestra espectros de masas para bacterias cultivadas en medio Mueller-Hinton + Polimixina B (1 mg/ml); se muestran espectros de masas representativos para bacterias resistentes a polimixina codificadas por plásmido (panel superior) que tienen PRR *E. coli* = 4,58, y bacterias resistentes a polimixina codificadas por cromosomas (panel inferior) que tienen PRR *E. coli* = 0,37. (D) muestra espectros de masas para bacterias cultivadas en medio Mueller-Hinton + Polimixina B (2 mg/ml); se muestran espectros de masas representativos para bacterias resistentes a polimixina codificadas por plásmido (panel superior) que tienen PRR *E. coli* = 5,69, y bacterias resistentes a polimixina codificadas por cromosomas (panel inferior) que tienen PRR *E. coli* = 0,21. Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron: J53 (susceptible), J53 + *mcr-1* (resistente codificada por plásmido) y CNR20160235 (resistente codificada por cromosoma).

La **Figura 15** Resumen de los perfiles de picos de interés (por ejemplo, de interés particular) observados en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp* (por ejemplo, *Salmonella enterica*) y *Acinetobacter baumannii*.

La **Figura 16** muestra el alineamiento de las secuencias de ácido nucleico de variantes de MCR.

La **Figura 17** muestra la divergencia de la variante MCR de diferentes familias.

La **Figura 18** muestra las características y los resultados de la prueba de MALDixin para las cepas de *E. coli*. ^a Las cepas de laboratorio están subrayadas, todas las demás cepas son aislados clínicos. ^b Para mecanismos desconocidos, la ausencia de mutación en *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* y *phoQ* se verificó mediante PCR y secuenciación, y la cepa fue negativa para genes similares a *mcr*. ^c Las carbapenemasas se muestran en negrita y las β -lactamasas de espectro extendido están subrayadas. ^d PRR son las siglas de Relación de resistencia a polimixina. ^e La *E. coli* R12 F5 productora de MCR-2 ha sido descrita previamente por Xavier BB et al. (Euro surveillance 2016; 21 (27)). * Plásmidos naturales, el plásmido portador de *mcr-5* natural ha sido descrito previamente por Borowiak M et al. (Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2017), 72 (12), 3317-3324). ** gen funcional similar a *mcr* clonado en pDM1, un derivado de Tet^R inducible por IPTG (concentración final 0,5 mM) de pACYC184. Los genes *mcr-1*, *mcr-2* y *mcr-5* se clonaron en los sitios SacI/XmaI del vector, mientras que para *mcr-3*, se usaron los sitios NdeI/XmaI.

La **Figura 19** muestra los resultados de un procedimiento de la presente invención (por ejemplo, la prueba MALDixin) en colonias bacterianas después de 24 horas, 48 horas, una semana y dos semanas. ^a Las cepas de laboratorio están subrayadas, todas las demás cepas son aislados clínicos. ^b Para mecanismos desconocidos, la ausencia de mutación en *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* y *phoQ* se ha verificado mediante PCR y secuenciación, y la cepa fue negativa para genes similares a *mcr*. PRR son las siglas de Relación de resistencia a polimixina. * plásmido natural.

EJEMPLOS

Materiales y procedimientos

Cepas bacterianas

[0174] Las siguientes cepas bacterianas, representativas de los aislados clínicos, fueron utilizadas en un procedimiento de la presente invención: *E. coli* S1 J53, *E. coli* R4 J53, *E. coli* R1, *K. pneumoniae* R46, *K. pneumoniae* R42, *A. baumannii* S1 y *A. baumannii* R1.

[0175] Adicionalmente, se utilizó una colección de 79 cepas de *E. coli*, incluyendo 33 aislados resistentes a polimixina, de los cuales 29 fueron productores de MCR (18 MCR-1, dos MCR-1.5, tres MCR-2, dos MCR-3 y cuatro MCR-5). Las 46 cepas de *E. coli* susceptibles a la polimixina fueron de varios fenotipos, desde el tipo salvaje hasta los productores de carbapenemasas (Figura 18). La prueba MALDixin se evaluó prospectivamente utilizando una colección de 78 cepas de *E. coli* productoras de carbapenemasas recibidas durante octubre y noviembre de 2016, del Centro Nacional de Referencia (NRC) francés para la Resistencia a Antimicrobianos (Tabla 2).

[0176] Las cepas bacterianas resistentes a polimixina codificadas por plásmido comprenden un plásmido que tiene un gen similar a *mcr*, tal como gen *mcr-1*, *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9*, *mcr-1.10*, *mcr-2*, *mcr-2.2*, *mcr-3*, *mcr-3.2*, *mcr-4* o *mcr-5* gen, o una secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. La adición de fosfoetanolamina al lípido A en tales cepas es un plásmido mediado a través del gen similar al *mcr*, que confiere resistencia codificada por plásmido a antibióticos de polimixina (por ejemplo, colistina) en aislados de humanos y animales.

[0177] Las cepas bacterianas resistentes a polimixina codificada por el cromosoma comprenden una mutación y/o truncamiento en cualquiera de los genes *pmrA*, *pmrB*, *pmrC*, *pmrD*, *pmrE*, *pmrR*, *phoP*, *phoQ*, *mgrB*, *arnA*, *arnB*, *arnC*, *arnD*, *arnE*, *arnF*, *arnT*, *cptA*, *eptB*. Por ejemplo, las mutaciones ("missense") en *pmrA* o *pmrB* pueden causar la activación constitutiva del sistema PmrA/PmrB, lo que conduce a la regulación positiva de *pmrC* y el operón *arnBCADTEF* y, por lo tanto, a la síntesis y adición de fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa al lípido A. La alteración (por ejemplo, mutación o truncamiento) de *mgrB* evita la retroalimentación negativa sobre el sistema regulador PhoP/PhoQ, lo que lleva a la adición de fosfoetanolamina y 4-amino-L-arabinosa al lípido A. La alteración de *mgrB* puede deberse a la inactivación por inserción (por ejemplo, con *ISKpn25*).

Pruebas de susceptibilidad

[0178] Las concentraciones mínimas inhibitoras (MIC) se determinaron mediante DMO de acuerdo con las directrices del subcomité conjunto CLSI y EUCAST. Los resultados se interpretaron utilizando el punto de corte de EUCAST actualizado en 2017.

Procedimientos

[0179] Se recogió una punta de un microlitro (equivalente a una o menos de una colonia equivalente a de 10^4 a 10^7 células bacterianas) de bacterias, recuperadas de colonias cultivadas en cualquier medio de cultivo de bacterias o de cualquier medio líquido de enriquecimiento (incluyendo cultivos de sangre u otras muestras clínicas con suficiente cantidad de bacterias). Esta colonia se transfirió a un tubo Eppendorf (0,5 a 2 ml) que contenía 100 microlitros de agua (destilada o doblemente destilada). El medio de cultivo fue agar de caldo Luria; o se pueden usar otros medios no selectivos, tales como agar sangre o agar sangre chocolate, medios selectivos gram-negativos, tales como medios Drigalski o MacConkey, y varios medios cromogénicos. Las cepas se pueden cultivar en condiciones aeróbicas en medio de agar de caldo Luria a 37 °C durante la noche.

[0180] A continuación, las bacterias se inactivaron por calor (etapa facultativa) usando un baño seco o un baño de agua durante 30 min a 80°C, o alternativamente durante 1 h a 90°C.

[0181] Las bacterias se sedimentaron y se lavaron al menos una vez con 200 µl de agua doblemente destilada para eliminar el exceso de sales que resultan del medio de cultivo. No lavar el sedimento bacteriano para eliminar las sales restantes puede dar lugar a un fondo no deseado en el espectro final de MALDI-TOF, entorpeciendo o eliminando la interpretabilidad de los resultados. Alternativamente, las bacterias pueden lavarse a través de una solución disponible comercialmente (por ejemplo, columnas de absorción de sal). Las bacterias pueden lavarse tres veces con 0,5 ml de agua doblemente destilada y centrifugarse a 9000 xg durante 5 min.

[0182] Las bacterias lavadas se volvieron a suspender en 50 µl de agua doblemente destilada para proporcionar una suspensión bacteriana a una concentración final de aproximadamente 10^4 a 10^7 bacterias por µl y se cargaron 0,4 µl en la diana de MALDI-TOF. Tales dianas clásicas de MALDI-TOF tal como se usan en un laboratorio de microbiología clínica habitual son adecuadas para usar con la presente invención.

[0183] Se mezclaron 0,6 µl (o 0,8 µl) de una matriz atípica diseñada con 0,4 µl de suspensión bacteriana. De forma adecuada, la matriz atípica comprende ácido 2,5-dihidroxibenzoico a una concentración final de 10 mg/ml suspendido en disolventes orgánicos, normalmente Cloroformo/Metanol 9:1 v/v. Los disolventes orgánicos adicionales adecuados para su uso con la invención incluyen cloroformo, diclorometano, metanol, éter, éter dietílico, éter de petróleo, isopropanol, butanol, hexano. La Tabla 1 proporciona ejemplos de disolventes adecuados para su uso con la presente invención. La muestra y la solución matriz se depositaron sobre la diana (por ejemplo, la diana de MALDI), se mezclaron con una micropipeta y se secaron suavemente bajo una corriente de aire. Después de la optimización, este sistema disolvente y la relación entre el sistema disolvente y la muestra permiten la ionización selectiva del lípido A (por ejemplo, en bacterias intactas).

[0184] Alternativamente, se recogen dos colonias de células bacterianas cultivadas en cualquier medio de cultivo de bacterias o de cualquier medio líquido de enriquecimiento (incluidos cultivos de sangre u otras muestras clínicas con suficiente cantidad de bacterias) y se transfieren a un tubo Eppendorf (0,5 a 2 ml). Esto puede ir seguido de la suspensión de las colonias en agua (destilada o doblemente destilada) seguido de sedimentación y lavado de las bacterias al menos una vez (por ejemplo, 2-5 veces) con agua destilada o doblemente destilada, por ejemplo, para

eliminar el exceso de sales. Las bacterias se pueden resuspender en ácido acético al 2% en agua (por ejemplo, 200 µl de ácido acético al 2% en agua). La suspensión bacteriana se puede calentar a continuación mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, usando un bloque de calor, preferiblemente durante 2 horas a 100 °C. Esto puede ir seguido de la sedimentación de las bacterias (por ejemplo, centrifugando durante 5 segundos a 15.000 g) y la resuspensión de las bacterias en agua destilada o doblemente destilada (por ejemplo, 50 µl de ddH₂O). Se puede mezclar la matriz de Norharmane (por ejemplo, N6252 Sigma) o cualquiera de sus derivados (por ejemplo, 3-hidroximetil-β-carbolina; 3-metil-α-carbolina; 2,3,4,9-tetrahidro-1H-β-carbolina-3-carboxilato de etilo; β-carbolina-3-carboxilato de etilo; ácido 1-metilindol-2-carboxílico; metyoduro de norharman; N-metilamida del ácido β-carbolina-3-carboxílico; clorhidrato de harmalina deshidratado; ácido 1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolin-1-carboxílico; 1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirido [3,4-b] indol; Harmane; Harmine; Harmaline) con la suspensión bacteriana. De forma adecuada, se pueden mezclar 0,6 µl de dicha matriz con 0,4 µl de suspensión bacteriana. De forma adecuada, la matriz de Norharmane o cualquiera de sus derivados (como se indica anteriormente) está presente a una concentración final de 10 mg/ml suspendida en disolventes orgánicos, normalmente Cloroformo/Metanol 9:1 v/v. Este protocolo es particularmente adecuado para usar en un procedimiento de la presente invención en el que se está investigando la composición de lípido A de bacterias *Klebsiella* y/o *Salmonella*.

[0185] Se generó un espectro de masas. Las máquinas de espectrometría de masas MALDI-TOF típicas adecuadas para su uso en un procedimiento de la presente invención incluyen Bioyper de Bruker Daltonics y VITEK-MS de bioMérieux. Alternativamente, el análisis MALDI-TOF MS se realiza en un analizador 4800 Proteomics (con óptica TOF-TOF, Applied Biosystems) (por ejemplo, usando el modo reflectrón). Las muestras se analizan típicamente operando a 20 kV en el modo de iones negativos usando un tiempo de retardo de extracción establecido en 20 ns. Normalmente, los espectros de 500 a 2000 disparos láser se suman para obtener el espectro final. Todos los experimentos se llevan a cabo típicamente en tres muestras independientes y en tres réplicas técnicas. El control negativo consistió en 0,5 µl de agua doblemente destilada y 0,5 µl de la solución matriz. Los datos de espectrometría de masas se analizan normalmente con la versión 4.9 de Data Explorer de Applied Biosystems. El espectro de masas puede escanearse entre m/z 1000 y 2200, preferiblemente entre m/z 1500 y 2500.

[0186] Se analizó el espectro de masas resultante, y se identificaron los picos correspondientes a lípido A intacto (por ejemplo 1796 m/z para *Escherichia coli*) y lípido A modificado (adición de fosfoetanolamina (PETN) [+ 123 m/z]) y se utilizaron para calcular las relaciones de intensidad. La relación de lípido A modificado con respecto a lípido A nativo se usa para discriminar entre bacterias susceptibles a polimixina y resistentes a polimixina. Para *Enterobacteriaceae* resistentes a polimixina, la discriminación entre la resistencia codificada por plásmidos y la resistencia codificada por cromosomas se ha evaluado utilizando el tercer pico [+ 25 m/z] (por ejemplo, 1821 m/z para *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*).

[0187] Los pacientes infectados con bacterias resistentes a polimixina codificadas por plásmidos, tal como se determina por un procedimiento de la presente invención, fueron puestos en cuarentena para prevenir la transmisión a otros pacientes y/o sujetos.

[0188] Este procedimiento (por ejemplo, de acuerdo con las reivindicaciones) permitió la detección de la resistencia a la polimixina directamente en bacterias (por ejemplo, usando muestras que comprenden una membrana bacteriana) en menos de 15 minutos.

Análisis estadístico

[0189] Los datos se compararon de dos en dos utilizando la prueba t de Welch no emparejada. Los valores de p < 0,05 se consideraron estadísticamente diferentes.

Tabla 1

Tabla 1.: Lista de disolventes orgánicos adecuados para usar en una solución matriz de la presente invención

Disolvente	Fórmula	PM	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Densidad (g/ml)	Solubilidad en agua (g/100 g)	Constante dieléctrica 3,4	Punto de inflamación (°C)
ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	60,052	118	16,6	1,0446	Miscible	6,2	39
acetona	C ₃ H ₆ O	58,079	56,05	-94,7	0,7845	Miscible	21,01	-20
acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	41,052	81,65	-43,8	0,7857	Miscible	36,64	6
benceno	C ₆ H ₆	78,11	80,1	5,5	0,8765	0,18	2,28	-11
1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	74,12	117,7	-88,6	0,8095	6,3	17,8	37
2-butanol	C ₄ H ₁₀ O	74,12	99,5	-88,5	0,8063	15	17,26	24
2-butanona	C ₄ H ₈ O	72,11	79,6	-86,6	0,7999	25,6	18,6	-9
alcohol t-butílico	C ₄ H ₁₀ O	74,12	82,4	25,7	0,7887	Miscible	12,5	11
tetracloruro de carbono	CCl ₄	153,82	76,8	-22,6	1,594	0,08	2,24	--
clorobenceno	C ₆ H ₅ Cl	112,56	131,7	-45,3	1,1058	0,05	5,69	28
cloroforno	CHCl ₃	119,38	61,2	-63,4	1,4788	0,795	4,81	--
ciclohexano	C ₆ H ₁₂	84,16	80,7	6,6	0,7739	< 0,1	2,02	-20
1,2-dicloroetano	C ₂ H ₄ Cl ₂	98,96	83,5	-35,7	1,245	0,861	10,42	13
dietilenglicol	C ₄ H ₁₀ O ₃	106,12	246	-10	1,1197	10	31,8	124
dietil éter	C ₄ H ₁₀ O	74,12	34,5	-116,2	0,713	7,5	4,267	-45
diglima (dietilenglicol dimetil éter)	C ₆ H ₁₄ O ₃	134,17	162	-68	0,943	Miscible	7,23	67
1,2-dimetoxietano (glima, DME)	C ₄ H ₁₀ O ₂	90,12	84,5	-69,2	0,8637	Miscible	7,3	-2
dimetilformamida (DMF)	C ₃ H ₇ NO	73,09	153	-60,48	0,9445	Miscible	38,25	58
dimetil sulfóxido (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	78,13	189	18,4	1,092	25,3	47	95
1,4-dioxano	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	101,1	11,8	1,033	Miscible	2,21(25)	12
etanol	C ₂ H ₆ O	46,07	78,5	-114,1	0,789	Miscible	24,6	13
acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	77	-83,6	0,895	8,7	6(25)	-4
etilenglicol	C ₂ H ₆ O ₂	62,07	195	-13	1,115	Miscible	37,7	111
glicerina	C ₃ H ₈ O ₃	92,09	290	17,8	1,261	Miscible	42,5	160
heptano	C ₇ H ₁₆	100,2	98	-90,6	0,684	0,01	1,92	-4
hexametilisforamida (HMPA)	C ₆ H ₁₈ N ₃ OP	179,2	232,5	7,2	1,03	Miscible	31,3	105
hexametilisforotriamida (HMPT)	C ₆ H ₁₈ N ₃ P	163,2	150	-44	0,898	Miscible	--	26
hexano	C ₆ H ₁₄	86,18	69	-95	0,659	0,014	1,89	-22
metanol	CH ₄ O	32,04	64,6	-98	0,791	Miscible	32,6(25)	12

t-butil metil éter (MTBE)	C ₅ H ₁₂ O	88,15	55,2	-109	0,741	5,1	--	-28
cloruro de metileno	CH ₂ Cl ₂	84,93	39,8	-96,7	1,326	1,32	9,08	1,6
N-metil-2-pirrolidiona (NMP)	CH ₅ H ₉ NO	99,13	202	-24	1,033	10	32	91
pentane	C ₅ H ₁₂	72,15	36,1	-129,7	0,626	0,04	1,84	-49
éter de petróleo (ligroína)	--	--	30-60	-40	0,656	--	--	-30
1-propanol	C ₃ H ₈ O	88,15	97	-126	0,803	Miscible	20,1(25)	15
2-propanol	C ₃ H ₈ O	88,15	82,4	-88,5	0,785	Miscible	18,3(25)	12
piridina	C ₅ H ₅ N	79,1	115,2	-41,6	0,982	Miscible	12,3(25)	17
tetrahidrofurano (THF)	C ₄ H ₈ O	72,106	65	-108,4	0,8833	30	7,52	-14
toluene	C ₇ H ₈	92,14	110,6	-93	0,867	0,05	2,38(25)	4
trietilamina	C ₆ H ₁₅ N	101,19	88,9	-114,7	0,728	0,02	2,4	-11
agua	H ₂ O	18,02	100	0	0,998	--	78,54	--
agua, pesada	D ₂ O	20,03	101,3	4	1,107	Miscible	--	--
o-xileno	C ₈ H ₁₀	106,17	144	-25,2	0,897	Miscible	2,57	32
m-xileno	C ₈ H ₁₀	106,17	139,1	-47,8	0,868	Insoluble	2,37	27
p-xileno	C ₈ H ₁₀	106,17	138,4	13,3	0,861	Insoluble	2,27	27

EJEMPLO 1**Detección de la presencia o ausencia de *Escherichia coli* resistente a polimixina en una muestra de ensayo**

[0191] Las muestras de ensayo que comprenden células bacterianas intactas de *E. coli* (por ejemplo, suspensiones bacterianas, lavadas para eliminar la sal), de la siguiente manera, se sometieron a espectrometría de masas de acuerdo con un procedimiento de la presente invención: (i) *E. coli* susceptible a polimixina; (ii) *E. coli* resistente a polimixina codificada por cromosomas; y (iii) *E. coli* resistente a polimixina codificada por plásmido (que comprende un plásmido que tiene el gen *mcr-1*).

[0192] Para *E. coli* susceptible a polimixina, el espectro de masas estaba dominado por un pico en m/z 1796,2 (Figura 5, panel superior, y la Figura 10, panel superior) asignado a lípido A nativo. La ausencia de un pico que indica la presencia de lípido A modificado con fosfoetanolamina a m/z 1919,2 (es decir, 123 unidades de masa mayor que el lípido A nativo) indicó con éxito la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polimixina.

[0193] En *E. coli* resistente a polimixina codificado por plásmido, el espectro de masas comprendía además picos en m/z 1919,2 (es decir, 123 m/z unidades mayores que el lípido A nativo), asignados al lípido A modificado por fosfoetanolamina y un pico sin asignar en m/z 1821,2 (es decir, 25 unidades de masa mayor que el lípido A nativo, m/z 1796,2) (Figura 5, panel inferior; y Figura 10, panel central). En una realización, dicho pico no asignado en m/z 1821,2 se asigna al lípido A modificado con pETN en el grupo fosfato 1' con pérdida concomitante del grupo fosfato 4'.

[0194] Para *E. coli* resistente a polimixina codificado por el cromosoma, el espectro de masas comprendía además picos en m/z 1919,2 (es decir, 123 unidades de masa mayores que el lípido A nativo), asignados a lípido A modificado con fosfoetanolamina, y no comprendía el pico no asignado (que los presentes inventores han asignado al lípido A modificado con pETN en el grupo fosfato 1' con pérdida concomitante del grupo fosfato 4') en m/z 1821,2.

[0195] El procedimiento de la presente invención se validó adicionalmente con cepas de *E. coli* S1 J53, *E. coli* R4 J53 y *E. coli* R1 (Figura 10).

EJEMPLO 2**Detección de la presencia o ausencia de *Klebsiella pneumoniae* resistente a polimixina en una muestra de ensayo**

[0196] Las muestras de ensayo que comprendían células bacterianas intactas de *K. pneumoniae* (por ejemplo, suspensiones bacterianas, lavadas para eliminar la sal), de la siguiente manera, se sometieron a espectrometría de masas de acuerdo con un procedimiento de la presente invención: (i) *K. pneumoniae* R46 resistente a polimixinas codificado por el cromosoma; y (ii) *K. pneumoniae* R42 resistente a polimixinas codificado por el plásmido (que comprendía un plásmido que comprende el gen *mcr-1*).

[0197] Para *K. pneumoniae* susceptible a polimixinas, el espectro de masas estaba dominado por un pico en m/z 1840,2 y m/z 1796,2 (Figura 7, panel superior; y la Figura 11, panel superior) asignado al lípido A nativo. La ausencia de un pico que indica la presencia de lípido A modificado con fosfoetanolamina a m/z 1919,2 (es decir, 123 unidades de masa mayor que el lípido A nativo) indicó con éxito la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polimixina.

[0198] En *K. pneumoniae* resistente a polimixinas, el espectro de masas comprendía un pico en m/z 1919,2 (es decir, 123 unidades de masa mayores que el lípido A nativo, m/z 1796,2), asignado al lípido A modificado por fosfoetanolamina (Figura 7, panel inferior; y Figura 11, panel central). La presencia de un pico que indica la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina indicó con éxito la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polimixina.

[0199] De manera similar a *E. coli*, un pico no asignado (que los presentes inventores han asignado a lípido A modificado con PETN en el grupo fosfato 1' con la pérdida concomitante del grupo fosfato 4') a m/z 1821,2 (es decir, 25 unidades de masa mayor que el lípido A nativo, m/z 1796) también fue indicativo de la presencia de una bacteria *K. pneumoniae* (por ejemplo, *Enterobacteriaceae*) resistente a un antibiótico de polimixina a través de la resistencia a polimixina codificada por el plásmido (Figura 11, panel central). Dicha m/z 1821,2 no estaba presente para una bacteria *K. pneumoniae* (por ejemplo, *Enterobacteriaceae*) resistente a un antibiótico de polimixina a través de la resistencia a la polimixina codificada por cromosomas (Figura 11, panel inferior; y Figura 15), destacando la aplicabilidad de este pico para discriminar entre los dos mecanismos de resistencia (resistencia codificada por plásmido y cromosoma).

EJEMPLO 3**Detección de la presencia o ausencia de un *Acinetobacter baumannii* resistente a la polimixina en una muestra de ensayo**

[0200] Las muestras de ensayo que comprenden células bacterianas intactas de *A. baumannii* (por ejemplo, suspensiones bacterianas, lavadas para eliminar la sal), de la siguiente manera, se sometieron a espectrometría de masas de acuerdo con un procedimiento de la presente invención: (i) *A. baumannii* susceptible a polimixinas; (ii) *A. baumannii* resistente a polimixinas.

[0201] En *A. baumannii* susceptible a polimixinas, el espectro de masas estaba dominado por un pico en m/z 1910,3 (Figura 9, panel superior) asignado a lípido A nativo. La ausencia de un pico que indica la presencia de fosfoetanolamina indicó con éxito la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polimixina.

[0202] En *A. baumannii* resistente a polimixina, el espectro de masas comprendía además un pico en m/z 2033,3 (es decir, 123 unidades de masa mayores que el lípido A nativo), asignado al lípido A modificado por fosfoetanolamina (Figura 9, panel inferior).

EJEMPLO 4**Las relaciones de intensidad máxima permiten la detección de la presencia o ausencia de una bacteria resistente a la polimixina en una muestra de ensayo.**

[0203] El cálculo de la relación entre la intensidad del lípido A modificado por fosfoetanolamina y la intensidad del pico correspondiente al lípido A nativo permite detectar la presencia o ausencia de una bacteria resistente a polimixina en una muestra de ensayo.

[0204] Esta relación se mostró que era típicamente entre 0,10 y 1,7 en una bacteria resistente a polimixina, y cerca de 0 (típicamente menos de 0,05) en una bacteria susceptible a polimixina (Figura 13).

EJEMPLO 5**Detección adicional de la presencia o ausencia de *Escherichia coli* resistente a polimixina en una muestra de ensayo**

[0205] En las cepas de *E. coli* susceptibles a polimixina, el espectro de masas negativo escaneado entre m/z 1600 y 2200 estaba dominado por un conjunto de picos asignados a hexa-acil lípido A bis-fosforilado (Figura 4). Se sabe que el pico principal en m/z 1796,2 corresponde al hexa-acil difosforil lípido A que contiene cuatro C14:0 3-OH, un C14:0 y un C12:0, y se refiere como lípido A nativo (Figura 2A (21)).

[0206] En todas las cepas de *E. coli* resistentes a polimixina, se observó un pico adicional en m/z 1919,2 (Figura 4B y 4C) independiente del mecanismo de resistencia implicado (codificado por cromosoma o el plásmido). Este pico corresponde a la adición de un resto pETN sobre el grupo fosfato en la posición 4 del lípido A nativo (Figura 2B (23)), lo que lleva a un aumento de 123 unidades de masa en comparación con la masa asignada al lípido A nativo (Figura 4B y C).

[0207] En el caso de resistencia codificada por el plásmido (genes tipo *mcr* en *Enterobacteriaceae*), se observó sistemáticamente un tercer pico en m/z 1821,2, además de los picos correspondientes al lípido A nativo (m/z 1796,2) y el lípido A modificado con pETN (m/z 1919,2) (Figura 4C). Este pico m/z 1821,2 se asignó a la adición de un resto pETN sobre el grupo fosfato en la posición 1' del lípido A nativo con la pérdida concomitante del grupo fosfato en la posición 4 (Figura 2A (22)), y es un marcador específico de enzimas similares a MCR.

[0208] Para respaldar aún más esta observación, se analizaron 73 aislados de *E. coli*, incluidas 46 cepas susceptibles a la polimixina con varios fenotipos de resistencia a los antimicrobianos. De estas cepas, cuatro cepas poseen resistencia codificada por cromosomas a la polimixina y 23 son productoras de MCR (Figura 18). La intensidad de los picos correspondientes al lípido A nativo (m/z 1796,2), el lípido A modificado con pETN (m/z 1919,2) y el marcador específico de resistencia a MCR (m/z 1821,2) se registraron de tres experimentos independientes. La relación (denominada relación de resistencia a la polimixina (PRR) de aquí en adelante) de la suma de las intensidades de los picos asociados con el lípido A modificado (para los picos de *E. coli* en m/z 1919,2 y m/z 1821,2) sobre la intensidad del pico de lípido A nativo (para *E. coli* m/z 1796,2) permite una distinción precisa entre aislados susceptibles a polimixina y resistentes a polimixina, pero también discriminación entre resistencia codificada por cromosomas y relacionada con MCR (es decir, codificada por plásmido) a polimixina (Figura 6). Se encontró que el valor de PRR para todas las cepas de *E. coli* susceptibles era 0 (Figura 18 y Figura 6). La relación osciló entre 0,109 y 0,481 (promedio de 0,245) para las cepas de *E. coli* con resistencia codificada por cromosomas a la polimixina, y de 0,533 a 4,844 (promedio de 2,340) para todos los productores de MCR (Figura 18 y Figura 6). La distribución de los valores de $PRR_{E. coli}$ de aislados susceptibles de polimixina en comparación con cepas de *E. coli* con resistencia codificada por cromosomas a la polimixina, y productores de MCR fueron todos significativamente diferentes ($p < 0,01$, test *t* de Welch). El análisis de las curvas ROC permitió la definición de dos valores de corte para $PRR_{E. coli}$ (0,1 y 0,5) que discriminan aislados susceptibles a polimixina ($PRR_{E. coli} < 0,1$) y aislados resistentes a polimixina ($PRR_{E. coli} > 0,5$).

y también permite una mayor discriminación entre la resistencia codificada por cromosomas ($0,1 < \text{PRR}_{E. coli} < 0,5$) y la resistencia codificada por plásmido ($\text{PRR}_{E. coli} > 0,5$).

EJEMPLO 6

Detección de la presencia o ausencia de *Escherichia coli* resistente a polimixina cultivada en medios clínicamente relevantes

[0209] El funcionamiento de los procedimientos de la invención (por ejemplo, la "prueba de MALDIxin") fue probada usando colonias cultivadas en medios utilizados habitualmente para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, es decir, agar Mueller-Hinton (MH). Además, debido al rápido aumento de *Enterobacteriaceae* productoras de MCR-1 desde 2016, también se ha sugerido examinar a los pacientes infectados utilizando medios complementados con polimixina. En consecuencia, los procedimientos de la invención se llevaron a cabo en tres cepas de *E. coli* (una cepa de tipo salvaje, una cepa con resistencia codificada por cromosomas y una cepa productora de MCR-1), cultivadas en agar LB, agar MH y agar MH suplementado con polimixina B a concentraciones finales de 1 mg/l o 2 mg/l. Tal como se muestra en la Figura 14, se obtuvieron espectros similares independientemente del medio de crecimiento, con el $\text{PRR}_{E. coli}$ estando entre 2,89 y 5,69 para las cepas productoras de MCR-1 y entre 0,21 y 0,37 para las cepas que albergan resistencia codificada por cromosomas. Para identificar cualquier impacto de la edad de las colonias cultivadas en agar LB y MH, se realizó un procedimiento de la invención (por ejemplo, la prueba MALDIxin) en colonias frescas (incubación durante la noche), colonias envejecidas 48 horas, una semana y dos semanas (las placas de agar se mantuvieron a 4 °C). Se obtuvieron espectros similares para todas las colonias ensayadas, lo que no produjo diferencias significativas en su $\text{PRR}_{E. coli}$ (Figura 19).

EJEMPLO 7

Validación del procedimiento en una colección prospectiva de *E. coli* productora de carbapenemasas de la NRC francesa

[0210] Para validar los procedimientos de la invención (por ejemplo, la prueba MALDIxin), todas las *E. coli* productoras de carbapenemasas recibidas de la NRC francesa durante octubre y noviembre de 2016 se analizaron a ciegas por triplicado (tres colonias seleccionadas de la misma placa de agar MH). La colección de 78 cepas de *E. coli* productoras de carbapenemasas que se obtuvieron incluyó dos productoras de KPC, once productoras de NDM, dos productoras de VIM, 63 productoras similares a OXA-48 y un aislado que produjo dos carbapenemasas (Tabla 2). Entre estos aislados, también se encontró que dos productores de NDM-1 y uno de OXA-48 eran resistentes a la colistina con MIC de 4 mg/l. El análisis de PCR reveló que estos tres aislados eran positivos para el gen *mcr-1* (Tabla 2). Cuando se analizaron utilizando los procedimientos de la invención (por ejemplo, la prueba MALDIxin), todos los aislados susceptibles a polimixina ($n = 75$) mostraron una $\text{PRR}_{E. coli}$ de 0, correspondiente a la susceptibilidad a la polimixina, mientras que para los tres aislados productores de MCR-1 se obtuvo una $\text{PRR}_{E. coli}$ superior a 0,5 (más específicamente $1,73 \pm 0,23$ y $2,34 \pm 0,12$ para los dos productores de NDM-1 y $1,29 \pm 0,63$ para el productor de OXA-48), clasificándolas con precisión como resistentes a la polimixina mediante un mecanismo codificado por plásmido (Tabla 2). Por lo tanto, en este estudio, los procedimientos de la invención (por ejemplo, la prueba MALDIxin) identificaron de manera fiable y rápida todas las cepas productoras de MCR donde los procedimientos convencionales habrían necesitado de 24 a 48 horas (procedimiento de dilución en caldo (alrededor de 16 a 24 horas) y posterior extracción de ADN y PCR para *mcr-1* y *mcr-2* en aislamientos resistentes (alrededor de 4 horas)).

Carbapenemasa	N	Resistencia a polimixina		Resultados MADI-TOF	
		MIC de colistina (mg/l)	<i>mcr-1/-2</i> PCR	$\text{PRR}_{E. coli}$	Interpretación
KPC-2	1	0,25	-	0	Susceptible
KPC-3*	1	0,25	-	0	Susceptible
NDM-1	3	0,25	-	0	Susceptible
NDM-1	1	0,5	-	0	Susceptible
NDM-1	1	4	+ (<i>mcr-1</i>)	$1,73 \pm 0,23$	Resistencia codificada por plásmido
NDM-1	1	4	+ (<i>mcr-1</i>)	$2,34 \pm 0,12$	Resistencia codificada por plásmido
NDM-5	2	0,25	-	0	Susceptible
NDM-5	3	0,5	-	0	Susceptible
VIM-1	1	0,5	-	0	Susceptible
VIM-4	1	0,25	-	0	Susceptible
OXA-48	27	0,25	-	0	Susceptible
OXA-48	26	0,5	-	0	Susceptible
OXA-48	1	1	-	0	Susceptible

OXA-48*	1	4	+ (<i>mcr-1</i>)	1,29 ± 0,63	Resistencia codificada por plásmido
OXA-181	4	0,25	-	0	Susceptible
OXA-204	1	0,25	-	0	Susceptible
OXA-244	1	0,25	-	0	Susceptible
OXA-244	1	0,5	-	0	Susceptible
OXA-181 + NDM-5	1	0,25	-	0	Susceptible

Tabla 2. Detección y caracterización de resistencia a polimixina utilizando técnicas convencionales (MIC y PCR) y un procedimiento de la presente invención (por ejemplo, la prueba MALDIxin) sobre 78 cepas de *E. coli* productoras de carbapenemasas recibidas por el NRC francesa durante octubre y noviembre de 2016. N, número de aislados; MIC, concentración mínima de inhibición; PPR, relación de resistencia a polimixina; +, PCR positiva; - PCR negativa para el gen indicado en paréntesis. *Estas dos cepas se aislaron del mismo paciente.

EJEMPLO 8

Análisis de genes de la familia *mcr*

[0211] Los genes codificados por cromosomas asociados con la resistencia a la polimixina son numerosos, y las modificaciones génicas (alteraciones, mutaciones por delecciones) implicadas no están descritas ni caracterizadas sistemáticamente. En cuanto a la resistencia codificada por plásmidos, se conocen cinco familias de genes *mcr* en *Enterobacteriaceae*.

[0212] Se analizó la homología de secuencia de MCR-2, MCR-3, MCR-4 y MCR-5 con MCR-1. MCR-2, MCR-3, MCR-4 y MCR-5 comparten solo el 81%, 34%, 33% y 31% de identidad de aminoácidos con MCR-1, respectivamente (Figura 17). Esta diversidad conduciría inevitablemente a un fallo en la detección sistemática de la resistencia a la polimixina, si se basa en el uso de herramientas de biología molecular disponibles dedicadas a la detección de *mcr-1* y/o *mcr-2* (Figura 16).

[0213] Estos problemas son superados por los procedimientos de la presente invención (por ejemplo, la prueba MALDIxin), que proporciona una herramienta rentable (procedimiento) basado en la tecnología MALDI-TOF que tiene por objetivo detectar la resistencia a la polimixina utilizando una sola colonia bacteriana Gram-negativa, en menos de 15 minutos.

SECUENCIAS

[0214]

SEQ ID NO: 1 (*mcr-1*)

ATGATGCAGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGCTCGGTTCAGTCCGTTTGTTCCTTGTGGC
 GAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCA
 AACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTG
 GCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTG
 TTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACG
 GTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGG
 ATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGC
 TTGTGGCTTTTGTAAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTG
 GGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTTCAGCAGTCA
 TTATGCCAGTTTCTTTCGCGTGCTAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGC
 CAATCTACTCGGTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAA
 GATACCATTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCC
 ACGCCTAGTGGTGTTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAAT
 GGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAG
 CAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTCAGCTATC
 TGGGCGCGGATGAGTATGATGTCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATAC
 GCTGGATCGCTTGGGCGTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGAATCAAAGGCG
 TGATGGATAAGCTGCCAAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCC
 ATCTGCAACACCAATCCTTATAACGAATGCCGCGATGTCGGTATGCTCGTTGGCTTAGA
 TGACTTTGTCGCTGCCAATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCA
 ATCACGGGCCTGCGTATTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGTG
 TGTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAAT
 GCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAG
 CAATGCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGA
 ACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACGCGCAGTGTG
 CCTGCATTTTTCTGGACGGATAAGCAAATGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGT
 CCTGACCCATGACGCGATCACGCCGACATTATTAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACA
 AAGTCAAAGACCGCACCGCATTTCATCCGCTGA

SEQ ID NO: 2 (*mcr-1.2*)

ATGATGCTGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGCTCGGTGAGTCCGTTTGTTCCTTGTGGC
 GAGTGTGCGGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCA
 AACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTG
 GCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTG
 TTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACG
 GTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGG
 ATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGTTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGC
 TTGTGGCTTTTTGTTAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTG
 GGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCA
 TTATGCCAGTTTCTTTCGCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGC
 CAATCTACTCGGTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAA
 GATACCATTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCC
 ACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAAT
 GGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAG
 CAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTACAGCTATC
 TGGGCGCGGATGAGTATGATGTCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATAC
 GCTGGATCGCTTGGGCGTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGACTCAAAAGGCG
 TGATGGATAAGCTGCCAAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCC
 ATCTGCAACACCAATCCTTATAACGAATGCCGCGATGTCGGTATGCTCGTTGGCTTAGA
 TGACTTTGTCGCTGCCAATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCA
 ATCACGGGCCTGCGTATTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGTG
 TGTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAAT
 GCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAG
 CAATGCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGA
 ACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACGCGCAGTGTG
 CCTGCATTTTTCTGGACGGATAAGCAAATGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGT
 CCTGACCCATGACGCGATCACGCCGACATTATTAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACA
 AAGTCAAAGACCGCACCGCATTTCATCCGCTGA

SEQ ID NO: 3 (*mcr-1.3*)

ATGATGCAGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGCTCGGTGTCAGTCCGTTTGTTCCTTGTGGC
 GAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAGGTCAGCCA
 AACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTG
 GCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTG
 TTGATTTTGTCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACG
 GTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGG
 ATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGC
 TTGTGGCTTTTGTAAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTG
 GGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCA
 TTATGCCAGTTTCTTTCGCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGC
 CAATCTACTCGGTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAA
 GATACCATTTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCC
 ACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAAT
 GGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAG
 CAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTCAGCTATC
 TGGGCGCGGATGAGTATGATGTGCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATAC
 GCTGGATCGCTTGGGCGTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGACTCAAAAGGCG
 TGATGGATAAGCTGCCAAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCC
 ATCTGCAACACCAATCCTTATAACGAATGCCGCGATGTGCGGTATGCTCGTTGGCTTAGA
 TGACTTTGTCGCTGCCAATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCA
 ATCACGGGCCTGCGTATTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGTG
 TGTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAAT
 GCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAG
 CAATGCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGA
 ACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACGCGCAGTGTG
 CCTGCATTTTTCTGGACGGATAAGCAAATGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGT
 CCTGACCCATGACGCGATCACGCCGACATTATTAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACA
 AAGTCAAAGACCGCACCGCATTCATCCGCTGA

SEQ ID NO: 4 (*mcr-1.4*)

ATGATGCAGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGCTCGGTTCAGTCCGTTTGTCTTGTGGC
 GAGTGTTGCCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCA
 AACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTG
 GCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTG
 TTGATTTTGTCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACG
 GTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGG
 ATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGC
 TTGTGGCTTTTGTAAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTG
 GGCTTGATCGTGCGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCA
 TTATGCCAGTTTCTTTCGCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGC
 CAATCTACTCGGTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAA
 GATACCATTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCC
 ACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAAT
 GGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAG
 CAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTCAGCTATC
 TGGGCGCGGATGAGTATGATGTCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATAC
 GCTGGATCGCTTGGGCGTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCCGACTCAAAAGGCG
 TGATGGATAAGCTGCCAAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCC
 ATCTGCAACACCAATCCTTATAACGAATGCCGCGATGTCGGTATGCTCGTTGGCTTAGA
 TGACTTTGTCGCTGCCAATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCA
 ATCACGGGCCTGCGTATTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGTG
 TGTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAAT
 GCCTTGCTTGCCACCGATAATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAG
 CAATGCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGA
 ACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACGCGCAGTGTG
 CCTGCATTTTTCTGGACGGATAAGCAAACCTGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGT
 CCTGACCCATGACGCGATCACGCCGACATTATTAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACA
 AAGTCAAAGACCGCACCGCATTTCATCCGCTGA

SEQ ID NO: 5 (mcr -1.5)

ATGATGCAGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGCTCGGTGAGTCCGTTTGTCTTGTGGC
 GAGTGTGCGGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCA
 AACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTG
 GCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTG
 TTGATTTTGTCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACG
 GTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGG
 ATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGC
 TTGTGGCTTTTGTAAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTG
 GGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCA
 TTATGCCAGTTTCTTTCGCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGC
 CAATCTACTCGGTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAA
 GATACCATTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCC
 ACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCAGCGCCGATCATGTCAGCTTCAAT
 GGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAG
 CAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTCACTATC
 TGGGCGCGGATGAGTATGATGTCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATAC
 GCTGGATCGCTTGGGCGTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGACTCAAAGGCG
 TGATGGATAAGCTGCCAAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCC
 ATCTGCAACACCAATCCTTATAACGAATGCCGCGATGTCGGTATGCTCGTTGGCTTAGA
 TGACTTTGTCGCTGCCAATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCA
 ATCACGGGCGCTGCGTATTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGTG
 TGTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAAT
 GCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGTACAG
 CAATGCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGA
 ACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAACAGCGCAGTGTG
 CCTGCATTTTTCTGGACGGATAAGCAAATGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGT
 CCTGACCCATGACGCGATCACGCCGACATTATTAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACA
 AAGTCAAAGACCGCACCGCATTCATCCGCTGA

SEC ID NO: 6 (mcr-1.6)

ATGATGCAGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGCTCGGTTCAGTCCGTTTGTCTTGTGGC
GAGTGTGCGCGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCA
AACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTG
GCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTG
TTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACG
GTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGG
ATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGC
TTGTGGCTTTTGTAAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTG
GGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCA
TTATGCCAGTTTCTTTCGCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGC
CAATCTACTCGGTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAA
GATACCATTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCC
ACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAAT
GGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAG
CAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTCACTATC
TGGGCGCGGATGAGTATGATGTCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATAC
GCTGGATCGCTTGGGCGTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGACTCAAAAGGCG
TGATGGATAAGCTGCCAAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCC
ATCTGCAACACCAATCCTTATAACGAATGCCGCGATGTCGGTATGCTCGTTGGCTTAGA
TGACTTTGTGCTGCCAATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCA
ATCACGGGCCTGCGTATTTTAAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGTG
TGTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAATGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAAT
GCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAG
CAATGCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGA
ACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACGCGCAGTGTG
CCTGCATTTTTCTGGACGGATAAGCAAATGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGT
CCTGACCCATGACGCGATCACGCCGACATTATTAAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACA
AAGTCAAAGACCACACCGCATTTCATCCGCTGA

SEC ID NO: 7 (mcr-1.7)

ATGATGCAGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGCTCGGTGAGTCCGTTTGTTCCTTGTGGC
 GAGTGTGCGGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCA
 AACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTG
 GCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTG
 TTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACG
 GTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGG
 ATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGC
 TTGTGGCTTTTGTAAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTG
 GGCTTGATCGTGGAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCA
 TTATGCCAGTTTCTTTGCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGC
 CAATCTACTCGGTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTACGCCAAAA
 GATACCATTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCC
 ACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAAT
 GGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAG
 CAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTCAGCTATC
 TGGGCGCGGATGAGTATGATGTGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATAC
 GCTGGATCGCTTGGGCGTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGACTCAAAAGGCG
 TGATGGATAAGCTGCCAAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCC
 ATCTGCAACACCAATCCTTATAACGAATGCCGCGATGTGCGGTATGCTCGTTGGCTTAGA
 TGACTTTGTCGCTGCCAATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCA
 ATCACGGGCCTGCGTATTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGTG
 TGTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAAT
 GCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAG
 CAATGCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGA
 ACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAACAGCGCAGTGTG
 CCTGCATTTTCTGGACGGATAAGCAAATGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGT
 CCTGACCCATGACGCGATCACGCCGACATTATTAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACA
 AAGTCAAAGACCGCACCGCATTCATCCGCTGA

SEC ID NO: 8 (mcr-1.8)

ATGATGCGGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGCTCGGTGAGTCCGTTTGTCTTGTGGC
 GAGTGTGCGGTTTTCTTGACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCA
 AACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTG
 GCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTG
 TTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACG
 GTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGG
 ATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGC
 TTGTGGCTTTTGTAAAGGTGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTG
 GGCTTGATCGTGGAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCA
 TTATGCCAGTTTCTTTGCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGC
 CAATCTACTCGGTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAA
 GATACCATTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCC
 ACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAAT
 GGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAG
 CAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTACGCTATC
 TGGGCGCGGATGAGTATGATGTGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATAC
 GCTGGATCGCTTGGGCGTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGACTCAAAAGGCG
 TGATGGATAAGCTGCCAAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCC
 ATCTGCAACACCAATCCTTATAACGAATGCCGCGATGTGCGGTATGCTCGTTGGCTTAGA
 TGACTTTGTCGCTGCCAATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCA
 ATCACGGGCCTGCGTATTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGTG
 TGTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAAT
 GCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAG
 CAATGCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGA
 ACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAACAGCGCAGTGTG
 CCTGCATTTTCTGGACGGATAAGCAAATGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGT
 CCTGACCCATGACGCGATCACGCCGACATTATTAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACA
 AAGTCAAAGACCGCACCGCATTTCATCCGCTGA

SEC ID NO: 9 (mcr-1.9)

GTGTGGTACCGACGCTCGGTCAAGTCCGTTTGTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTT
GACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGG
ACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATC
ACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATC
ATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCAT
GCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCG
TTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGCTTGTGGCTTTTTGTAAAG
GTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAA
GTCTTGCCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTTACGAGTCATTATGCCAGTTTCTTTC
GCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGCCAATCTACTCGGTGGGT
AAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAAGATACCATTTATCACGC
CAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCCACGCCTAGTGGTGTTC
GTCGTGCGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAATGGCTATGAGCGCGATA
CTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAGCAATGTCACATCGTGC
GGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTACGCTATCTGGGCGCGGATGAGT
ATGATGTCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATACGCTGGATCGCTTGGGC
GTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGAATCAAAGGCGTGATGGATAAGCTGCC
AAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCCATCTGCAACACCAATC
CTTATAACGAATGCCGCGATGTCGGTATGCTCGTTGGCTTAGATGACTTTGTCGCTGCC
AATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCAATCACGGGCCTGCGTA
TTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGCGTGTGAAGGTAATGAGCT
TGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAATGCCTTGCTTGCCACCG
ATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAGCAATGCCTATGATGTC
TCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACA
TGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACGCGCAGTGTGCCTGCATTTTTCTGGA
CGGATAAGCAAACCTGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGTCCTGACCCATGACGC
GATCACGCCGACATTATTAAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACAAAGTCAAAGACCGCA
CCGCATTCATCCGCTGA

SEC ID NO: 10 (mcr -1.10)

GTGTGGTACCGACGCTCGGTCAAGTCCGTTTGTCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTT
 GACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGG
 ACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATC
 ACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATC
 ATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCAT
 GCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAACGCAGCG
 TTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGCTTGTGGCTTTTGTTAAG
 GTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAA
 GTCTTGCCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCATTATGCCAGTTTCTTTC
 GCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGCCAATCTACTCGGTGGGT
 AAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAAGATACCATTTATCACGC
 CAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCCACGCCTAGTGGTGTTC
 GTCGTGCGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAATGGCTATGAGCGCGATA
 CTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAGCAATGTCACATCGTGC
 GGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTTCAGCTATCTGGGCGCGGATGAGT
 ATGATGTCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATACGCTGGATCGCTTGGGC
 GTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGAAGGCGTGATGGATAAGCTGCC
 AAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCCATCTGCAACACCAATC
 CTTATAACGAATGCCGCGATGTCGGTATGCTCGTTGGCTTAGATGACTTTGTGCTGCC
 AATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCAATCACGGGCCTGCGTA
 TTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGCGTGTGAAGGTAATGAGCT
 TGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAATGCCTTGCTTGCCACCG
 ATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAGCAATGCCTATGATGTC
 TCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACA
 TGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACGCGCAGTGTGCCTGCATTTTCTGGA
 CGGATAAGCAAACCTGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGTCCTGACCCATGACGC
 GATCACGCCGACATTATTAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACAAAGTCAAAGACCGCA
 CCGCATTTCATCCGCTGA

SEC ID NO: 11 (mcr-2)

ATGACATCACATCACTCTTGGTATCGCTATTCTATCAATCCTTTTGTGCTGATGGGTTTG
GTGGCGTTATTTTTGGCAGCGACAGCGAACCTGACATTTTTTGAAAAGCGATGGCGGT
CTATCCTGTATCGGATAACTTAGGCTTTATCATCTCAATGGCGGTGGCGGTGATGGGTG
CTATGCTACTGATTGTCGTGCTGTTATCCTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTCCTGATTT
TGCTACTGATTATGGGTGCGGTGACGAGCTATTTTACCGATACTTATGGCACGGTCTAT
GACACCACCATGCTCCAAAATGCCATGCAAACCGACCAAGCCGAGTCTAAGGACTTGAT
GAATTTGGCGTTTTTTGTGCGAATTATCGGGCTTGGCGTGTTGCCAAGTGTGTTGGTCG
CAGTTGCCAAAGTCAATTATCCAACATGGGGCAAAGGTCTGATTCAGCGTGCGATGACA
TGGGGTGTCAGCCTTGCTGCTGTTGCTTGCCGATTGGACTATTTAGCAGTCAGTATGC
GAGTTTCTTTCGGGTGCATAAGCCAGTGCGTTTTTATATCAACCCGATTACGCCGATTTA
TTCGGTGGGTAAAGCTTGCCAGTATCGAGTACAAAAAGCCACTGCGCCAACAGACACCA
TCTATCATGCCAAAGACGCCGTGCAGACCACCAAGCCGAGCGAGCGTAAGCCACGCCT
AGTGGTGTTTCGTGTCGGTGAGACGGCGCGTGCTGACCATGTGCAGTTCAATGGCTAT
GGCCGTGAGACTTTCCCGCAGCTTGCCAAAGTTGATGGCTTGGCGAATTTTAGCCAAGT
GACATCGTGTGGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTGAGCTATTTGGGTC
AAGATGACTATGATGTGCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTAGATACGCTTGAC
CGCTTGGGTGTGGGTATCTTGTTGGCGTGATAATAATTCAGACTCAAAGGCGTGATGGA
TAAGCTACCTGCCACGCAGTATTTTGATTATAAATCAGCAACCAACAATACCATCTGTAA
CACCAATCCCTATAACGAATGCCGTGATGTCGGTATGCTTGTCGGGCTAGATGACTATG
TCAGCGCCAATAATGGCAAAGATATGCTCATCATGCTACACCAAATGGGCAATCATGGG
CCGGCGTACTTTAAGCGTTATGATGAGCAATTTGCCAAATTCACCCCCGTGTGCGAAGG
CAACGAGCTTGCCAAATGCGAACACCAATCACTCATCAATGCCTATGACAATGCGCTAC
TTGCGACTGATGATTTTATCGCCAAAAGCATCGATTGGCTAAAAACGCATGAAGCGAAC
TACGATGTCGCCATGCTCTATGTCAGTGACCACGGCGAGAGCTTGGGCGAAAATGGTG
TCTATCTGCATGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACGCGAGCTGTGCCTGCG
TTTTTTTGGTCAAATAATACGACATTCAAGCCAACTGCCAGCGATACTGTGCTGACGCAT
GATGCGATTACGCCAACACTGCTTAAGCTGTTTGATGTACAGCGGGCAAGGTCAAAGA
CCGCGCGGCATTTATCCAGTAA

SEC ID NO: 12 (mcr-2.2)

GTGTGGTACCGACGCTCGGTCAGTCCGTTTGTTCCTTGTGGCGAGTGTTGCCGTTTTCTT
GACCGCGACCGCCAATCTTACCTTTTTTGATAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGG
ACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATC
ACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATC
ATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCAT
GCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCG
TTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTACCAAGTTTGCTTGTGGCTTTTGTTAAG
GTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAA
GTCTTGCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTGAGCAGTCATTATGCCAGTTTCTTTC
GCGTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGCCAATCTACTCGGTGGGT
AAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAAGATACCATTTATCACGC
CAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGCCACGCCTAGTGGTGTTT
GTCGTGCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTTCAATGGCTATGAGCGCGATA
CTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGATGGCGTGACCAATTTTAGCAATGTCACATCGTGC
GGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCCGTGTATGTTGAGCTATCTGGGCGCGGATGAGT
ATGATGTCGATACCGCCAAATACCAAGAAAATGTGCTGGATACGCTGGATCGCTTGGGC
GTAAGTATCTTGTGGCGTGATAATAATTCGGACTCAAAAGGCGTGATGGATAAGCTGCC
AAAAGCGCAATTTGCCGATTATAAATCCGCGACCAACAACGCCATCTGCAACACCAATC
CTTATAACGAATGCCGCGATGTCGGTATGCTCGTTGGCTTAGATGACTTTGTCGCTGCC
AATAACGGCAAAGATATGCTGATCATGCTGCACCAAATGGGCAATCACGGGCCTGCGTA
TTTTAAGCGATATGATGAAAAGTTTGCCAAATTCACGCCAGCGTGTGAAGGTAATGAGCT
TGCCAAGTGCGAACATCAGTCCTTGATCAATGCTTATGACAATGCCTTGCTTGCCACCG
ATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAGACGCACAGCAATGCCTATGATGTC
TCAATGCTGTATGTCAGCGATCATGGCGAAAGTCTGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACA
TGGTATGCCAAATGCCTTTGCACCAAAGAAGACAGCGCAGTGTGCCTGCATTTTTCTGGA
CGGATAAGCAAACCTGGCATCACGCCAATGGCAACCGATACCGTCCTGACCCATGACGC
GATCACGCCGACATTATTAAAGCTGTTTGATGTCACCGCGGACAAAGTCAAAGACCGCA
CCGCATTCATCCGCTGA

SEC ID NO: 13 (mcr-3)

ATGCCTTCCCTTATAAAAATAAAAATTGTTCCGCTTATGTTCTTTTTGGCACTGTATTTTG
CATTTATGCTGAACTGGCGTGGAGTTCTCCATTTTTACGAAATCCTTTACAAATTAGAAG
ATTTTAAGTTTGGTTTCGCCATTTTATTACCAATATTGCTTGTTCAGCGCTTAACTTTGT
ATTTGTTCCATTTTCGATACGGTATTTAATAAAGCCTTTTTTTGCACTTCTTATCGCACTTA
GTGCAATCGTTAGTTACACAATGATGAAGTATAGAGTCTTGTTTGATCAAAACATGATTC
AGAATATTTTTGAAACCAATCAAAATGAGGCGTTAGCATATTTAAGCTTACCAATTATAGT
ATGGGTTACTATTGCTGGTTTTATCCCTGCCATTTTACTTTTCTTTGTTGAAATTGAATAT
GAGGAAAAATGGTTCAAAGGGATTCTAACTCGTGCCCTATCGATGTTTGCATCACTTATA
GTGATTGCGGTTATTGCAGCACTATACTATCAAGATTATGTGTCAGTGGGGCGCAACAA
TTCAAACCTCCAGCGTGAGATTGTTCCAGCCAATTTTCGTTAATAGTACCGTTAAATACGT
TTACAATCGTTATCTTGCTGAACCAATCCCATTTACAACCTTTAGGTGATGATGCAAAACG
GGATACTAATCAAAGTAAGCCACGTTGATGTTTCTGGTCGTTGGTGAAACCGCTCGTG
GTAAAAATTTCTCGATGAATGGCTATGAGAAAGACACCAATCCATTTACCAGTAAATCTG
GTGGCGTGATCTCCTTTAATGATGTTTCGTTTCGTGTGGGACTGCAACCGCTGTATCCGTC
CCCTGCATGTTCTCCAATATGGGGAGAAAGGAGTTTGATGATAATCGCGCTCGCAATAG
CGAGGGCCTGCTAGATGTGTTGCAAAAACGGGGATCTCCATTTTTTTGGAAGGAGAACG
ATGGAGGCTGCAAAGGCGTCTGCGACCGAGTACCTAACATCGAAATCGAACCAGGA
TCACCCTAAGTTCTGCGATAAAAACACATGCTATGACGAGGTTGTCCTTCAAGACCTCG
ATAGTGAAATTGCTCAAATGAAAGGGGATAAGCTGGTTGGCTTCCACCTGATAGGTAGC
CATGGCCCAACCTACTACAAGCGCTACCCTGATGCTCATCGTCAGTTCACCCCTGACTG
TCCACGCAGTGATATTGAAAACCTGCACAGATGAAGAGCTCACCAACACCTATGACAACA
CCATCCGCTACACCGATTTTCGTGATTGGAGAGATGATTGCCAAGTTGAAAACCTACGAA
GATAAGTACAACACCGCGTTGCTCTACGTCTCCGATCATGGTGAATCACTGGGAGCATT
AGGGCTTTACCTACACGGTACACCGTACCAGTTTGCACCGGATGATCAGACCCGTGTTT
CTATGCAGGTGTGGATGTCACCTGGATTTACCAAAGAGAAAGGCGTTGATATGGCGTGT
TTGCAGCAGAAAGCCGCTGATACTCGTTACTCACACGATAATTTTTCTCATCTGTATTG
GGTATCTGGGACGTCAAAACATCAGTTTACGAAAAGGGTCTAGATATTTTCAGTCAATGT
CGTAATGTTCAATAA

SEC ID NO: 14 (mcr-3.2)

ATGCCCTCCCTTATAAAAATAAAAATTGTTCCGCTTATGTTCTTTTTGGCACTGTATTTTG
CATTTATGCTGAACTGGCGTGGAGTTCTCCATTTTTACGAAATCCTTTACAAATTAGAAG
ATTTTAAGTTTGGTTTCGCCATTTCAATTACCAATATTGCTTGTTGCAGCGCTTAACTTTGT
ATTTGTTCCATTTTCGATACGGTATTTAATAAAGCCTTTTTTTGCACTTCTTATCGCACTTA
GTGCAATCGTTAGTTACACAATGATGAAGTATAGAGTCTTGTTTGATCAAAACATGATTC
AGAATATTTTTGAAACCAATCAAAATGAGGCGTTAGCATATTTAAGCTTACCAATTATAGT
ATGGGTTACTATTGCTGGTTTTATCCCTGCCATTTTACTTTTCTTTGTTGAAATTGAATAT
GAGGAAAAATGGTTCAAAGGGATTCTAACTCGTGCCCTATCGATGTTTGCATCACTTATA
GTGATTGCGGTTATTGCAGCACTATACTATCAAGATTATGTGTCAGTGGGGCGCAACAA
TTCAAACCTCCAGCGTGAGATTGTTCCAGCCAATTTGTTAATAGTACCGTTAAATACGT
TTACAATCGTTATCTTGCTGAACCAATCCATTTACAACCTTTAGGTGATGATGCAAAACG
GGATACTAATCAAAGTAAGCCACGTTGATGTTTCTGGTCGTTGGTGAAACCGCTCGTG
GTAAAAATTTCTCGATGAATGGCTATGAGAAAGACACCAATCCATTTACCAGTAAATCTG
GTGGCGTGATCTCCTTTAATGATGTTTCGTTCTGTGGGACTGCAACCGCTGTATCCGTC
CCCTGCATGTTCTCCAATATGGGGAGAAAGGAGTTTGATGAAAATCGCGCTCGCAATAG
CGAGGGCCTGCTAGATGTGTTGCAAAAAACGGGGATCTCCATTTTTTTGGAAGGAGAACG
ATGGAGGCTGCAAAGGCGTCTGCGACCGAGTACCTAACATCGAAATCGAACCAGGA
TCACCCTAAGTTCTGCGATAAAACACATGCTATGACGAGGTTGTCCTTCAAGACCTCG
ATAGTGAAATTGCTCAAATGAAAGGGGATAAGCTGGTTGGCTTCCACCTGATAGGTAGC
CATGGCCCAACCTACTACAAGCGCTACCCTGATGCTCATCGTCAGTTCACCCCTGACTG
TCCACGCAGTGATATTGAAAACCTGCACAGATGAAGAGCTCACCAACACCTATGACAACA
CCATCCGCTACACCGATTTTCGTGATTGGAGAGATGATTGCCAAGTTGAAAACCTACGAA
GATAAGTACAACACCGCGTTGCTCTACGTCTCCGATCATGGTGAATCACTGGGAGCATT
AGGGCTTTACCTACACGGTACACCGTACCAGTTTGCACCGGATGATCAGACCCGTGTTT
CTATGCAGGTGTGGATGTCACCTGGATTTACCAAAGAGAAAGGCGTTGATATGGCGTGT
TTGCAGCAGAAAGCCGCTGATACTCGTTACTCACACGATAATTTTTCTCATCTGTATTG
GGTATCTGGGACGTCAAAACATCAGTTTACGAAAAGGGTCTAGATATTTTCAGTCAATGT
CGTAATGTTCAATAA

SEC ID NO: 15 (mcr -4)

GTGATTTCTAGATTTAAGACGTTATCGGTTAACCAATTCACCTTTCATCACTGCGTTGTTTT
 ATGTTGCCATTTTCAATCTACCGCTCTTTGGTATAGTGCGAAAAGGAATTGAAAAACAAC
 CAGAAGTTGATCCCCTTTTCATCGCATCTATGCCGCTATTTTTAACATTTGCGCTGAGTT
 TTTTGTTTTCAATTTTTACCGTCAAATACCTGCTGAAGCCCTTTTTTATCGTATTGACGTT
 ACTTTCCTCAAGTGTATTTTTTGACGCCTATCAATACAATGTCGTGTTTGACTACGGCAT
 GATAGAAAACACGTTTCAAACACATCCTGCTGAAGCATTGATGTATGTAAATCTTGCATC
 AATTACCAATCTACTGCTGACTGGGCTATTACCGTCATATCTTATTTATAAGGCCGATATT
 CATTATCAGCCCTTTTTTAAGGAGTTATTGCATAAATTAGCCTTTATGCTGCTAATGTTTCG
 TTGGCATTGGGATAGTCGCCTTTTTTTACTATCAAGATTATGCTGCATTTGTTGAAACAA
 CAGTGAGTTAAGGCGTTACATTGTCCCTACCTATTTTGTGAGTAGTGCATCTAAATATCT
 CAATGAGCACTATTTGCAGACGCCCATGGAATACCAACAACCTTGGCCTAGATGCGAAGA
 ATGCCAGTCGTAACCCGAACACTAAACCTAACTTATTAGTGGTTGTTGTGGGTGAAACT
 GCGCGCTCAATGAGCTATCAATATTATGGATATAACAAGCCAACCAATGCTCATACCCAA
 AATCAGGGGCTGATTGCGTTTAACGATACTAGCTCATGCGGCACGGCCACGGCGGTGT
 CTCTACCCTGTATGTTTTACGAATGGGGCGGGCAGACTATGATCCTCGCCGTGCTAAT
 GCTCAAGACACAGTGATTGATGTGTTAAGTCATAGTGGTATAAAAGTACAGTGGTTTGAT
 AATGATTCTGGCTGTAAAGGTGTGTGTGATCAGGTTGAAAATCTCACGATAGATTTGAAG
 AGTGATCCGAAGCTGTGTTCTGGCCAATATTGTTTTGACCAAGTATTGCTCAACAAATTA
 GATAAAATTCTGGCAGTAGCACCAAGTCAAGATACAGTAATTTTTTTGCATATCATTGGT
 AGTCATGGACCAACTTATTATCTTAGATACCCGCCAGAGCATCGTAAATTTATACCGGAT
 TGTCGCGCAGTGATATTCAAATTGCAGTCAAGAAGAACTGATTAACACCTACGACAA
 CACTATTCTATATACGGATTTTATTCTCAGTGAAGTGGTGAATAAATTAAGGTAAAGCA
 GGATATGTTGATACTGCAATGCTGTATCTCTCTGACCATGGTGAGTCTTTGGGTGAAAA
 GGGCATGTATTTACATGGTGCGCCCTATAGTATTGCACCGAAAGAACAACTAGCGTAC
 CAATGCTGGCTTGGGTATCTAATGACTTTAGCCAAGATAATCAGTTGAACATGACTTGTG
 TTGCACAGCGAGCAGAACAGGGCGGCTTTTCCACGACAATTTGTTGACAGTTTGCTA
 GGACTTATGAATGTAAAAACCACCGTCTATCAGAGCCAACCTCGATATTTTTGCACCTTGC
 AGGTATTAG

SEC ID NO: 16 (mcr-5)

ATGCGGTTGTCTGCATTTATCACTTTCTTGAAAATGCGCCCGCAAGTGCGCACTGAATTT
 TTGACTCTGTTTCATCAGCCTTGTGTTACCCCTGCTGTGCAATGGCGTGTTTTGGAATGC
 CCTTCTTGCTGGACGCGACTCCCTAACTTCTGGAACATGGCTAATGCTCCTTTGCACTG
 GTTTGCTGATCACCGGGCTGCAATGGTTGTTGCTCCTTCTGGTGGCCACGCGCTGGAG
 TGTCAAGCCACTACTGATTCTGCTTGCTGTCATGACGCCCCGCCGCCGTTTATTTTCATGC
 GCAACTACGGGGTTTATCTCGACAAGGCCATGCTGCGGAATCTGATGGAGACGGACGT
 CAGGGAAGCCAGTGAGCTGTTGCAATGGAGAATGCTGCCCTACTTGTTGGTTGCAGCC
 GTATCCGTGTGGTGGATTGCGAGAGTCAGGGTTTTACGAACGGGGCTGGAAACAAGCGG
 TAATGATGCGCAGCGCTTGTCTGGCTGGCGCTCTCGCCATGATTTCCATGGGTCTGTG
 GCCAGTCATGGATGTGCTGATACCCACGCTTCGTGAAAACAAGCCGCTTCGCTATTTGA
 TCACTCCTGCAAACTACGTCATCTCGGGCATTGCGGTTTTGACTGAACAGGCGTCATCG
 TCAGCAGACGAAGCAAGGGAAGTCGTTGCAGCCGATGCGCATCGAGGGCCTCAAGAAC
 AAGGCCGCCGTCCTCGTGCTCTCGTACTGGTTGTCGGGGAAACCGTCAGGGCGGCTAA
 TTGGGGGTTGAGCGGCTATGAACGACAAACCACCCCTGAGTTGGCCGCACGCGACGTG
 ATCAATTTTTCCGATGTCACCAGTTGCGGGACGGATACGGCTACATCCCTTCCCTGCAT
 GTTTTCCCTCAATGGTCGGCGCGACTACGACGAACGCCAGATTCGTGCGCGCGAGTCC
 GTGCTGCACGTTTTAAACCGTAGTGACGTCAACATTCTCTGGCGCGATAACCAGTCGGG
 CTGTAAAGGCGTCTGTGATGGACTGCCCTTTGAAAACCTGTCTTCGGCAGGCCATCCCA
 CACTGTGCCATGGCGAGCGCTGCCTGGATGAAATTCTGCTCGAAGGGTTGGCCGAGAA
 GATAACAACAAGCCGCAGCGATATGCTGATCGTTCTGCATATGCTGGGCAATCACGGCC
 CAGCGTATTTCCAGCGCTATCCCGCAAGCTACCGACGCTGGTCGCCAACCTGCGACAC
 CACCGATCTGGCCAGCTGTTTCGCATGAAGCCTTGGTGAACACCTACGACAACGCCGTG
 CTTTACACCGATCATGTGCTTGCCCGTACCATTGACCTGCTGTCCGGCATCCGCTCACA
 CGACACGGCGCTGCTGTACGTTTTCCGATCATGGGGAATCGCTCGGCGAGAAAGGCCTG
 TATCTCCATGGCATACTTACGTCATCGCGCCGGATGAGCAGATCAAGGTGCCGATGAT
 CTGGTGGCAGTCGAGTCAGGTTTATGCCGACCAAGCCTGTATGCAAACCTCATGCCTCTC
 GGGCACCGGTAAGTCACGATCACCTGTTTCACACCTTGCTCGGGATGTTTCGACGTGAAA
 ACCGCTGCCTACACGCCAGAGTTGGACCTTCTGGCAACATGCAGAAAAGGACAACCAC
 AATGA

5 LISTADO DE SECUENCIAS

[0215]

<110> Imperial Innovations Limited

10

<120> P48551W0 - Listado de secuencias

<130> P48551W0

15

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1626
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 1

5	atgatgcagc atactttctgt gtggtaccga cgctcgggtca gtccgtttgt tcttgtggcg	60
10	agtgttgccg ttttcttgac cgcgaccgcc aatctttacct tttttgataa aatcagccaa	120
	acctatccca tcgcggaaca tctcggcttt gtgctgacga tcgctgtcgt gctctttggc	180
15	gcgatgctac tgatcaccac gctgttatca tcgtatcgct atgtgctaaa gcctgtgttg	240
	attttgctat taatcatggg cgcggtgacc agttatttta ctgacactta tggcacggtc	300
20	tatgatacga ccatgctcca aaatgcccta cagaccgacc aagccgagac caaggatcta	360
	ttaaacgcag cgtttatcat gcgtatcatt ggtttggggtg tgctaccaag tttgcttgtg	420
	gcttttgttt aggtggatta tccgacttgg ggcaagggtt tgatgcgccg attgggcttg	480
25	atcgtggcaa gtcttgcgt gattttactg cctgtgggtg cgttcagcag tcattatgcc	540
	agtttctttc gcgtgcataa gccgctgcgt agctatgtca atccgatcat gccaatctac	600
30	tcggtgggta agcttgccag tattgagtat aaaaaagcca gtgcgcaaaa agataccatt	660
	tatcacgcca aagacgcggt acaagcaacc aagcctgata tgcgtaagcc acgcctagtg	720
	gtgttcgctg tcggtgagac ggcacgcgcc gatcatgtca gcttcaatgg ctatgagcgc	780
35	gatactttcc cacagcttgc caagatcgat ggcgtgacca atttttagcaa tgtcacatcg	840
	tgccggcacat cgacggcgta ttctgtgccg tgtatgttca gctatctggg cgcggatgag	900
40	tatgatgtcg ataccgcaa ataccaagaa aatgtgctgg atacgctgga tcgcttgggc	960
	gtaagtatct tgtggcgtga taataattcg gactcaaaag gcgtgatgga taagctgcca	1020
	aaagcgcaat ttgccgatta taaatccgcg accaacaacg ccatctgcaa caccaatcct	1080
45	tataacgaat gccgcgatgt cggatatgctc gttggcttag atgactttgt cgctgccaat	1140
	aacggcaaag atatgctgat catgctgcac caaatgggca atcacgggcc tgcgtatttt	1200
50	aagcgatatg atgaaaagtt tgccaaattc acgccagtgt gtgaaggtaa tgagcttgcc	1260
	aagtgcgaac atcagtcctt gatcaatgct tatgacaatg ccttgcttgc caccgatgat	1320
	ttcatcgctc aaagtatcca gtggctgcag acgcacagca atgcctatga tgtctcaatg	1380
55	ctgtatgtca gcgatcatgg cgaaagtctg ggtgagaacg gtgtctatct acatggtatg	1440
	ccaaatgcct ttgcacaaaa agaacagcgc agtgtgcctg cttttttctg gacggataag	1500
60	caaaactggca tcacgccaat ggcaaccgat accgtcctga cccatgacgc gatcacgccg	1560
	acattattaa agctgtttga tgtcaccgcg gacaaagtca aagaccgcac cgcattcatc	1620
65	cgctga	1626

<210> 2
 <211> 1626
 <212> ADN

ES 2 898 688 T3

<213> Escherichia coli

<400> 2

```

5  atgatgctgc atacttctgt gtggtaccga cgctcgggtca gtccgtttgt tcttggtggcg      60
   agtggttgccg ttttcttgac cgcgaccgcc aatcttacct tttttgataa aatcagccaa      120
   acctatccca tcgcgggacaa tctcggcctt gtgctgacga tcgctgtcgt gctctttggc      180
10  gcgatgctac tgatcaccac gctggttatca tcgtatcgct atgtgctaaa gcctgtgttg      240
   attttgctat taatcatggg cgcggtgacc agttatttta ctgacactta tggcacggtc      300
   tatgatacga ccatgctcca aaatgcccta cagaccgacc aagccgagac caaggatcta      360
15  ttaaacgcag cgtttatcat gcgtatcatt ggtttggttg tgctaccaag tttgcttggtg      420
   gcttttggtta aggtggatta tccgacttgg ggcaagggtt tgatgcgccg attgggcttg      480
20  atcgtggcaa gtcttgcgct gattttactg cctgtggtgg cgttcagcag tcattatgcc      540
   agtttctttc gcgtgcataa gccgctgcgt agctatgtca atccgatcat gccaatctac      600
   tcggtgggta agcttgccag tattgagtat aaaaaagcca gtgcgcaaaa agataccatt      660
25  tatcacgcca aagacgcggt acaagcaacc aagcctgata tcgtaagcc acgcctagtg      720
   gtgttcgctg tcggtgagac ggcacgcgcc gatcatgtca gcttcaatgg ctatgagcgc      780
30  gatactttcc cacagcttgc caagatcgat ggcgtgacca attttagcaa tgtcacatcg      840
   tgcggcacat cgacggcgta ttctgtgccg tgtatgttca gctatctggg cgcggtatgag      900
   tatgatgtcg ataccgcaa ataccaagaa aatgtgctgg atacgctgga tcgcttgggc      960
35  gtaagtatct tgtggcgtga taataattcg gactcaaaag gcgtgatgga taagctgcca     1020
   aaagcgcaat ttgccgatta taaatccgcg accaacaacg ccatctgcaa caccaatcct     1080
40  tataacgaat gccgcgatgt cggtatgctc gttggcttag atgactttgt cgctgccaat     1140
   aacggcaaag atatgctgat catgctgcac caaatgggca atcacggggc tgcgatatttt     1200
   aagcgatatg atgaaaagtt tgccaaattc acgccagtgt gtgaaggtaa tgagcttgcc     1260
45  aagtgcgaac atcagtcctt gatcaatgct tatgacaatg ccttgcttgc caccgatgat     1320
   ttcatcgctc aaagtatcca gtggctgcag acgcacagca atgcctatga tgtctcaatg     1380
50  ctgtatgtca gcgatcatgg cgaaagtctg ggtgagaacg gtgtctatct acatggtatg     1440
   ccaaatgcct ttgcacaaaa agaacagcgc agtgtgcctg catTTTTtctg gacggataag     1500
   caaactggca tcacgccaat ggcaaccgat accgtcctga cccatgacgc gatcacgccg     1560
55  acattattaa agctgtttga tgtcaccgcg gacaaagtca aagaccgcac cgcatcatc     1620
   cgctga                                           1626

```

<210> 3

<211> 1626

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 3

```

atgatgcagc atacttctgt gtggtaccga cgctcgggtca gtccgtttgt tcttggtggcg      60

```

ES 2 898 688 T3

	agtgttgccg	ttttcttgac	cgcgaccgcc	aatcttacct	tttttgataa	ggtcagccaa	120
	acctatccca	tcgcggaaca	tctcggcttt	gtgctgacga	tcgctgtcgt	gctctttggc	180
5	gcgatgctac	tgatcaccac	gctgttatca	tcgtatcgct	atgtgctaaa	gcctgtgttg	240
	attttgctat	taatcatggg	cgcggtgacc	agttatttta	ctgacactta	tggcacggtc	300
10	tatgatacga	ccatgctcca	aaatgcccta	cagaccgacc	aagccgagac	caaggatcta	360
	ttaaacgcag	cgtttatcat	gcgtatcatt	ggtttgggtg	tgctaccaag	tttgcttgtg	420
	gcttttggtta	aggtggatta	tccgacttgg	ggcaagggtt	tgatgcgccg	attgggcttg	480
15	atcgtggcaa	gtcttgcgct	gattttactg	cctgtggtgg	cgttcagcag	tcattatgcc	540
	agtttctttc	gcgtgcataa	gccgctgcgt	agctatgtca	atccgatcat	gccaatctac	600
20	tcggtgggta	agcttgccag	tattgagtat	aaaaaagcca	gtgcgcaaaa	agataccatt	660
	tatcacgcca	aagacgcggt	acaagcaacc	aagcctgata	tgcgtaagcc	acgcctagtg	720
	gtgttcgtcg	tcggtgagac	ggcacgcgcc	gatcatgtca	gcttcaatgg	ctatgagcgc	780
25	gatactttcc	cacagcttgc	caagatcgat	ggcgtgacca	attttagcaa	tgtcacatcg	840
	tgcggcacat	cgacggcgta	ttctgtgccg	tgtatgttca	gctatctggg	cgcggatgag	900
	tatgatgtcg	ataccgcaa	ataccaagaa	aatgtgctgg	atacgctgga	tcgcttgggc	960
30	gtaagtatct	tgtggcggtga	taataattcg	gactcaaaaag	gcgtgatgga	taagctgcca	1020
	aaagcgcaat	ttgccgatta	taaatccgcg	accaacaacg	ccatctgcaa	caccaatcct	1080
35	tataacgaat	gccgcgatgt	cggtatgctc	gttggcttag	atgactttgt	cgctgccaat	1140
	aacggcaaag	atatgctgat	catgctgcac	caaatgggca	atcacggggc	tgcgtatttt	1200
40	aagcgatatg	atgaaaagtt	tgccaaattc	acgccagtgt	gtgaaggtaa	tgagcttgcc	1260
	aagtgcgaac	atcagtcctt	gatcaatgct	tatgacaatg	ccttgcttgc	caccgatgat	1320
	ttcatcgctc	aaagtatcca	gtggctgcag	acgcacagca	atgcctatga	tgtctcaatg	1380
45	ctgtatgtca	gcgatcatgg	cgaaagtctg	ggtgagaacg	gtgtctatct	acatggtatg	1440
	ccaaatgcct	ttgcaccaa	agaacagcgc	agtgtgcctg	catttttctg	gacggataag	1500
50	caaactggca	tcacgccaat	ggcaaccgat	accgtcctga	cccatgacgc	gatcacgccg	1560
	acattattaa	agctgtttga	tgtcaccgcg	gacaaaagtca	aagaccgcac	cgcattcatc	1620
	cgctga						1626
55	<210>	4					
	<211>	1626					
	<212>	ADN					
	<213>	Escherichia coli					
60	<400>	4					
	atgatgcagc	atacttctgt	gtggtaccga	cgctcgggtca	gtccgtttgt	tcttgtggcg	60
65	agtgttgccg	ttttcttgac	cgcgaccgcc	aatcttacct	tttttgataa	aatcagccaa	120
	acctatccca	tcgcggaaca	tctcggcttt	gtgctgacga	tcgctgtcgt	gctctttggc	180
	gcgatgctac	tgatcaccac	gctgttatca	tcgtatcgct	atgtgctaaa	gcctgtgttg	240

	atTTtgctat taatcatggg cgcggtgacc agttatttta ctgacactta tggcacggtc	300
5	tatgatacga ccatgctcca aaatgcccta cagaccgacc aagccgagac caaggatcta	360
	ttaaacgcag cgtttatcat gcgtatcatt ggtttgggtg tgctaccaag tttgcttg	420
	gcttttgTTa aggtggatta tccgacttgg ggcaagggtt tgatgcgccg attgggcttg	480
10	atcgtggcaa gtcttgcgct gattttactg cctgtggtgg cgttcagcag tcattatgcc	540
	agtttctttc gcgtgcataa gccgctgcgt agctatgtca atccgatcat gccaatctac	600
15	tcggtgggta agcttgccag tattgagtat aaaaagcca gtgcgcaaaa agataccatt	660
	tatcacgcca aagacgcggT acaagcaacc aagcctgata tgcgtaagcc acgcctagt	720
	gtgttcgTcg tcggtgagac ggcacgcgcc gatcatgtca gcttcaatgg ctatgagcg	780
20	gatactttcc cacagcttgc caagatcgat ggcgtgacca attttagcaa tgtcacatcg	840
	tgcggcacat cgacggcgta ttctgtgccg tgtatgttca gctatctggg cgcggatgag	900
25	tatgatgtcg ataccgcaa ataccaagaa aatgtgctgg atacgctgga tcgcttgggc	960
	gtaagtatct tgtggcgTga taataattcg gactcaaaag gcgtgatgga taagctgcca	1020
	aaagcgcaat ttgccgatta taaatccgcg accaacaacg ccatctgcaa caccaatcct	1080
30	tataacgaat gccgcgatgt cggtatgctc gttggcttag atgactttgt cgctgccaat	1140
	aacggcaaag atatgctgat catgctgcac caaatgggca atcacgggcc tgcgtatttt	1200
35	aagcgatatg atgaaaagtt tgccaaattc acgccagtgt gtgaaggtaa tgagcttgcc	1260
	aagtgcgaac atcagtcctt gatcaatgct tatgacaatg ccttgcttgc caccgataat	1320
	ttcatcgctc aaagtatcca gtggctgcag acgcacagca atgcctatga tgtctcaatg	1380
40	ctgtatgtca gcgatcatgg cgaaagtctg ggtgagaacg gtgtctatct acatggtatg	1440
	ccaaatgcct ttgcaccaaa agaacagcgC agtgtgcctg catttttctg gacggataag	1500
45	caaactggca tcacgccaat ggcaaccgat accgtcctga cccatgacgc gatcacgccg	1560
	acattattaa agctgtttga tgtcaccgcg gacaaagtca aagaccgcac cgcattcatc	1620
	cgctga	1626
50	<210> 5 <211> 1626 <212> ADN <213> Escherichia coli	
55	<400> 5 atgatgcagc atacttctgt gtggTaccga cgctcggtca gtccgtttgt tcttgTggcg	
	60	
	agtgttgccg ttttcttgac cgcgaccgcc aatcttacct tttttgataa aatcagccaa	120
60	acctatccca tcgcggaaca tctcggtttt gtgctgacga tcgctgtcgt gctctttggc	180
	gcgatgctac tgatcaccac gctgttatca tcgtatcgct atgtgctaaa gcctgtgttg	240
65	atTTtgctat taatcatggg cgcggtgacc agttatttta ctgacactta tggcacggtc	300
	tatgatacga ccatgctcca aaatgcccta cagaccgacc aagccgagac caaggatcta	360

ES 2 898 688 T3

	ttaaacgcag	cgtttatcat	gcgtatcatt	ggtttgggtg	tgctaccaag	tttgcttgtg	420
	gcttttgtta	aggtggatta	tccgacttgg	ggcaagggtt	tgatgcgccg	attgggcttg	480
5	atcgtggcaa	gtcttgcgct	gattttactg	cctgtggtgg	cgttcagcag	tcattatgcc	540
	agtttctttc	gcgtgcataa	gccgctgcgt	agctatgtca	atccgatcat	gccaatctac	600
10	tcggtgggta	agcttgccag	tattgagtat	aaaaaagcca	gtgcgccaaa	agataaccatt	660
	tatcacgcca	aagacgcggt	acaagcaacc	aagcctgata	tgcgtaagcc	acgcctagtg	720
	gtgttcgctg	tcggtgagac	ggcacgcgcc	gatcatgtca	gcttcaatgg	ctatgagcgc	780
15	gatactttcc	cacagcttgc	caagatcgat	ggcgtgacca	attttagcaa	tgtcacatcg	840
	tgcggcacat	cgacggcgta	ttctgtgccg	tgtatgttca	gctatctggg	cgcggatgag	900
	tatgatgtcg	ataccgcca	ataccaagaa	aatgtgctgg	atacgctgga	tcgcttgggc	960
20	gtaagtatct	tgtggcgta	taataattcg	gactcaaaag	gcgtgatgga	taagctgcca	1020
	aaagcgcaat	ttgccgatta	taaatccgcg	accaacaacg	ccatctgcaa	caccaatcct	1080
25	tataacgaat	gccgcgatgt	cggtatgctc	gttggcttag	atgactttgt	cgctgccaat	1140
	aacggcaaag	atatgctgat	catgctgcac	caaatgggca	atcacggggc	tgcgatattt	1200
	aagcgatatg	atgaaaagtt	tgccaaattc	acgccagtgt	gtgaaggtaa	tgagcttgcc	1260
30	aagtgcgaac	atcagtcctt	gatcaatgct	tatgacaatg	ccttgcttgc	caccgatgat	1320
	ttcatcgctc	aaagtatcca	gtggctgcag	acgtacagca	atgcctatga	tgtctcaatg	1380
35	ctgtatgtca	gcgatcatgg	cgaaagtctg	ggtgagaacg	gtgtctatct	acatggtatg	1440
	ccaaatgcct	ttgcaccaa	agaacagcgc	agtgtgcctg	catttttctg	gacggataag	1500
	caaactggca	tcacgccaat	ggcaaccgat	accgtcctga	cccatgacgc	gatcacgccg	1560
40	acattattaa	agctgtttga	tgtcaccgcg	gacaaagtca	aagaccgcac	cgattcatc	1620
	cgctga						1626
45	<210> 6						
	<211> 1626						
	<212> ADN						
	<213> Escherichia coli						
50	<400> 6						
	atgatgcagc	atacttctgt	gtggtaccga	cgctcgggtca	gtccgtttgt	tcttgtggcg	60
	agtgttgccg	ttttcttgac	cgcgaccgcc	aatcttacct	tttttgataa	aatcagccaa	120
55	acctatccca	tcgcggaaca	tctcggcttt	gtgctgacga	tcgctgtcgt	gctctttggc	180
	gcgatgctac	tgatcaccac	gctgttatca	tcgtatcgct	atgtgctaaa	gcctgtgttg	240
60	attttgctat	taatcatggg	cgcggtgacc	agttatttta	ctgacactta	tggcacggtc	300
	tatgatacga	ccatgctcca	aaatgcccta	cagaccgacc	aagccgagac	caaggatcta	360
	ttaaacgcag	cgtttatcat	gcgtatcatt	ggtttgggtg	tgctaccaag	tttgcttgtg	420
65	gcttttgtta	aggtggatta	tccgacttgg	ggcaagggtt	tgatgcgccg	attgggcttg	480
	atcgtggcaa	gtcttgcgct	gattttactg	cctgtggtgg	cgttcagcag	tcattatgcc	540

	agtttctttc	gcgtgcataa	gccgctgcgt	agctatgtca	atccgatcat	gccaatctac	600
5	tcggtgggta	agcttgccag	tattgagtat	aaaaaagcca	gtgcgccaaa	agataaccatt	660
	tatcacgcca	aagacgcggt	acaagcaacc	aagcctgata	tgcgtaagcc	acgcctagt	720
	gtgttcgctg	tcggtgagac	ggcacgcgcc	gatcatgtca	gcttcaatgg	ctatgagcgc	780
10	gatactttcc	cacagcttgc	caagatcgat	ggcgtgacca	atttttagcaa	tgtcacatcg	840
	tgcggcacat	cgacggcgta	ttctgtgccg	tgtatgttca	gctatctggg	cgcggatgag	900
	tatgatgtcg	ataccgccaa	ataccaagaa	aatgtgctgg	atacgctgga	tcgcttgggc	960
15	gtaagtatct	tgtggcggtga	taataattcg	gactcaaaaag	gcgtgatgga	taagctgcca	1020
	aaagcgcaat	ttgccgatta	taaatccgcg	accaacaacg	ccatctgcaa	caccaatcct	1080
20	tataacgaat	gccgcgatgt	cggtatgctc	gttggcttag	atgactttgt	cgctgccaat	1140
	aacggcaaag	atatgctgat	catgctgcac	caaattgggca	atcacggggc	tgcgatatttt	1200
	aagcgatatg	atgaaaagtt	tgccaaattc	acgccagtgt	gtgaaggtaa	tgagcttgcc	1260
25	aaatgcgaac	atcagtcctt	gatcaatgct	tatgacaatg	ccttgcttgc	caccgatgat	1320
	ttcatcgctc	aaagtatcca	gtggctgcag	acgcacagca	atgcctatga	tgtctcaatg	1380
30	ctgtatgtca	gcgatcatgg	cgaaagtctg	ggtgagaacg	gtgtctatct	acatggtatg	1440
	ccaaatgcct	ttgcacccaa	agaacagcgc	agtgtgcctg	catttttctg	gacggataag	1500
	caaactggca	tcacgccaat	ggcaaccgat	accgtcctga	cccatgacgc	gatcacgccg	1560
35	acattattaa	agctgtttga	tgtcaccgcg	gacaaagtca	aagaccacac	cgattcatc	1620
	cgctga						1626
40	<210> 7						
	<211> 1626						
	<212> ADN						
	<213> Escherichia coli						
45	<400> 7						
	atgatgcagc	atacttctgt	gtggtaccga	cgctcgggtca	gtccgtttgt	tcttgtggcg	60
	agtgttgccg	ttttcttgac	cgcgaccgcc	aatcttacct	tttttgataa	aatcagccaa	120
50	acctatccca	tcgcggaaca	tctcggcttt	gtgctgacga	tcgctgtcgt	gctctttggc	180
	gcgatgctac	tgatcaccac	gctgttatca	tcgtatcgct	atgtgctaaa	gcctgtgttg	240
55	attttgctat	taatcatggg	cgcggtgacc	agttatttta	ctgacactta	tggcacggtc	300
	tatgatacga	ccatgctcca	aaatgcccta	cagaccgacc	aagccgagac	caaggatcta	360
	ttaaacgcag	cgtttatcat	gcgtatcatt	ggtttggggtg	tgctaccaag	tttgcttgtg	420
60	gcttttggtta	aggtggatta	tccgacttgg	ggcaagggtt	tgatgcgccg	attgggcttg	480
	atcgtggcaa	gtcttgcgct	gattttactg	cctgtgggtg	cgttcagcag	tcattatgcc	540
65	agtttctttc	gcgtgcataa	gccgctgcgt	agctatgtca	atccgatcat	gccaatctac	600
	tcggtgggta	agcttgccag	tattgagtat	aaaaaagcca	gtacgccaaa	agataaccatt	660

ES 2 898 688 T3

	tatcacgcc	aagacgcggt	acaagcaacc	aagcctgata	tgcgtaagcc	acgcctagtg	720
	gtgttcgctg	tcggtgagac	ggcacgcgcc	gatcatgtca	gcttcaatgg	ctatgagcgc	780
5	gatactttcc	cacagcttgc	caagatcgat	ggcgtgacca	atttttagcaa	tgtcacatcg	840
	tgcggcacat	cgacggcgta	ttctgtgccg	tgtatgttca	gctatctggg	cgcggatgag	900
10	tatgatgtcg	ataccgccaa	ataccaagaa	aatgtgctgg	atacgctgga	tcgcttgggc	960
	gtaagtatct	tgtggcggtga	taataattcg	gactcaaaaag	gcgtgatgga	taagctgcc	1020
	aaagcgcaat	ttgccgatta	taaatccgcg	accaacaacg	ccatctgcaa	caccaatcct	1080
15	tataacgaat	gccgcgatgt	cggtatgctc	gttggcttag	atgactttgt	cgctgccaat	1140
	aacggcaaag	atatgctgat	catgctgcac	caaatgggca	atcacgggcc	tgcgatatttt	1200
20	aagcgatatg	atgaaaagtt	tgccaaattc	acgccagtg	gtgaaggtaa	tgagcttgcc	1260
	aagtgcgaac	atcagtcctt	gatcaatgct	tatgacaatg	ccttgcttgc	caccgatgat	1320
	ttcatcgctc	aaagtatcca	gtggctgcag	acgcacagca	atgcctatga	tgtctcaatg	1380
25	ctgtatgtca	gcgatcatgg	cgaaagtctg	ggtgagaacg	gtgtctatct	acatgggatg	1440
	ccaaatgcct	ttgcacccaa	agaacagcgc	agtgtgcctg	catttttctg	gacggataag	1500
30	caaaactggca	tcacgccaat	ggcaaccgat	accgtcctga	cccatgacgc	gatcacgccg	1560
	acattattaa	agctgtttga	tgtcaccgcg	gacaaagtca	aagaccgcac	cgcatcctac	1620
	cgctga						1626
35	<210> 8						
	<211> 1626						
	<212> ADN						
	<213> Escherichia coli						
40	<400> 8						
	atgatgcggc	atacttctgt	gtgggtaccga	cgctcgggtca	gtccgtttgt	tcttgtggcg	60
45	agtgttgccg	ttttcttgac	cgcgaccgcc	aatcttacct	tttttgataa	aatcagccaa	120
	acctatccca	tcgcggaaca	tctcggcttt	gtgctgacga	tcgctgtcgt	gctctttggc	180
	gcgatgctac	tgatcaccac	gctgttatca	tcgtatcgct	atgtgctaaa	gcctgtgttg	240
50	attttgctat	taatcatggg	cgcggtgacc	agttatttta	ctgacactta	tggcacggtc	300
	tatgatacga	ccatgctcca	aaatgcccta	cagaccgacc	aagccgagac	caaggatcta	360
55	ttaaacgcag	cgtttatcat	gcgtatcatt	ggtttggggtg	tgctaccaag	tttgcttgtg	420
	gcttttggtta	aggtggatta	tccgacttgg	ggcaagggtt	tgatgcgccg	attgggcttg	480
	atcgtggcaa	gtcttgcgct	gattttactg	cctgtgggtg	cgttcagcag	tcattatgcc	540
60	agttttctttc	gcgtgcataa	gccgctgcgt	agctatgtca	atccgatcat	gccaatctac	600
	tcggtgggta	agcttgccag	tattgagtat	aaaaaagcca	gtgcgccaaa	agataaccatt	660
65	tatcacgcc	aagacgcggt	acaagcaacc	aagcctgata	tgcgtaagcc	acgcctagtg	720
	gtgttcgctg	tcggtgagac	ggcacgcgcc	gatcatgtca	gcttcaatgg	ctatgagcgc	780
	gatactttcc	cacagcttgc	caagatcgat	ggcgtgacca	atttttagcaa	tgtcacatcg	840

ES 2 898 688 T3

	tgcggcacat	cgacggcgta	ttctgtgccg	tgtatgttca	gctatctggg	cgcggatgag	900
5	tatgatgtcg	ataccgccaa	ataccaagaa	aatgtgctgg	atacgctgga	tcgcttgggc	960
	gtaagtatct	tgtggcgta	taataattcg	gactcaaaag	gcgtgatgga	taagctgcca	1020
	aaagcgcaat	ttgccgatta	taaatccgcg	accaacaacg	ccatctgcaa	caccaatcct	1080
10	tataacgaat	gccgcgatgt	cggtatgctc	gttggttag	atgactttgt	cgctgccaat	1140
	aacggcaaag	atatgctgat	catgctgcac	caaatgggca	atcacggggc	tgctatattt	1200
	aagcgatatg	atgaaaagtt	tgccaaattc	acgccagtgt	gtgaaggtaa	tgagcttgcc	1260
15	aagtgcgaac	atcagtcctt	gatcaatgct	tatgacaatg	ccttgcttgc	caccgatgat	1320
	ttcatcgctc	aaagtatcca	gtggctgcag	acgcacagca	atgcctatga	tgtctcaatg	1380
20	ctgtatgtca	gcgatcatgg	cgaaagtctg	ggtgagaacg	gtgtctatct	acatggtatg	1440
	ccaaatgcct	ttgcaccaa	agaacagcgc	agtgtgcctg	catttttctg	gacggataag	1500
	caaactggca	tcacgccaat	ggcaaccgat	accgtcctga	cccatgacgc	gatcacgccg	1560
25	acattattaa	agctgtttga	tgtcaccgcg	gacaaagtca	aagaccgcac	cgcatcatc	1620
	cgctga						1626
30	<210> 9						
	<211> 1608						
	<212> ADN						
	<213> Escherichia coli						
35	<400> 9						
	gtgtggtacc	gacgctcggt	cagtccggtt	gttcttgtgg	cgagtgttgc	cgttttcttg	60
	accgcgaccg	ccaatcttac	cttttttgat	aaaatcagcc	aaacctatcc	catcgcgga	120
40	aatctcggct	ttgtgctgac	gatcgtgtc	gtgctctttg	gcgcgatgct	actgatcacc	180
	acgctgttat	catcgtatcg	ctatgtgcta	aagcctgtgt	tgattttgct	attaatcatg	240
45	ggcgcgggtga	ccagttatatt	tactgacact	tatggcacgg	tctatgatac	gaccatgctc	300
	caaatgccc	tacagaccga	ccaagccgag	accaaggatc	tattaaacgc	agcgtttatc	360
	atgcgtatca	ttggtttggg	tgtgctacca	agtttgcttg	tggtttttgt	taagggtggat	420
50	tatccgactt	ggggcaaggg	tttgatgcgc	cgattgggct	tgatcggtgc	aagtcttgcg	480
	ctgattttac	tgctgtggt	ggcgttcagc	agtcattatg	ccagtttctt	tcgctgcat	540
55	aagccgctgc	gtagctatgt	caatccgatc	atgccaatct	actcgggtggg	taagcttgcc	600
	agtattgagt	ataaaaaagc	cagtgcgcca	aaagatacca	tttatcacgc	caaagacgcg	660
	gtacaagcaa	ccaagcctga	tatgcgtaag	ccacgcctag	tggtgttcgt	cgtcggtgag	720
60	acggcacgcg	ccgatcatgt	cagcttcaat	ggctatgagc	gcgatacttt	cccacagctt	780
	gccaagatcg	atggcgtgac	caatttttagc	aatgtcacat	cgtgcggcac	atcgacggcg	840
65	tattctgtgc	cgtgtatgtt	cagctatctg	ggcgcggatg	agtatgatgt	cgataccgcc	900
	aaataccaag	aaaatgtgct	ggatacgctg	gatcgcttgg	gcgtaagtat	cttgtggcgt	960

ES 2 898 688 T3

	gataataatt cggactcaaa aggcgtgatg gataagctgc caaaagcgca atttgccgat	1020
	tataaatccg cgaccaacaa cgccatctgc aacaccaatc cttataacga atgccgcat	1080
5	gtcggatatgc tcgttggctt agatgacttt gtcgctgcca ataacggcaa agatatgctg	1140
	atcatgctgc accaaatggg caatcacggg cctgcgtatt ttaagcgata tgatgaaaag	1200
10	tttgccaaat tcacgccagc gtgtgaaggt aatgagcttg ccaagtgcga acatcagtcc	1260
	ttgatcaatg cttatgacaa tgccttgctt gccaccgatg atttcatcgc tcaaagtatc	1320
	cagtggctgc agacgcacag caatgcctat gatgtctcaa tgctgtatgt cagcgatcat	1380
15	ggcgaagtc tgggtgagaa cggtgtctat ctacatggta tgccaaatgc ctttgcacca	1440
	aaagaacagc gcagtgtgcc tgcatttttc tggacggata agcaaactgg catcacgcca	1500
20	atggcaaccg ataccgtcct gacccatgac gcgatcacgc cgacattatt aaagctgttt	1560
	gatgtcaccg cggacaaagt caaagaccgc accgcattca tccgctga	1608
25	<210> 10 <211> 1608 <212> ADN <213> Escherichia coli	
30	<400> 10 gtgtggtacc gacgctcggc cagtccgttt gttcttgtgg cgagtgttgc cgttttcttg	60
	accgcgaccg ccaatcttac cttttttgat aaaatcagcc aaacctatcc catcgcgga	120
35	aatctcggct ttgtgctgac gatcgtgtc gtgctctttg gcgcatgct actgatcacc	180
	acgctgttat catcgtatcg ctatgtgcta aagcctgtgt tgattttgct attaatcatg	240
	ggcgcggtga ccagttattt tactgacact tatggcacgg tctatgatac gaccatgctc	300
40	caaaatgccc tacagaccga ccaagccgag accaaggatc tattaaacgc agcgtttatc	360
	atgcgtatca ttggtttggg tgtgctacca agtttgcttg tggcttttgt taagggtgat	420
45	tatccgactt ggggcaaggg tttgatgcgc cgattgggct tgatcgtggc aagtcttgcg	480
	ctgattttac tgcctgtggc ggcgttcagc agtcattatg ccagtttctt tcgctgcat	540
	aagccgctgc gtagctatgt caatccgatc atgccaatct actcgggtgg taagcttgcc	600
50	agtattgagt ataaaaaagc cagtgcgcca aaagatacca tttatcacgc caaagacgcg	660
	gtacaagcaa ccaagcctga tatgcgtaag ccacgcctag tgggtgttcgt cgtcggtgag	720
55	acggcacgcg ccgatcatgt cagcttcaat ggctatgagc gcgatacttt cccacagctt	780
	gccaagatcg atggcgtgac caattttagc aatgtcacat cgtgcggcac atcgacggcg	840
	tattctgtgc cgtgtatgtt cagctatctg ggcgcggatg agtatgatgt cgataccgcc	900
60	aaataccaag aaaatgtgct ggatacgtg gatcgcttgg gcgtaagtat cttgtggcgt	960
	gataataatt cggactcaaa aggcgtgatg gataagctgc caaaagcgca atttgccgat	1020
65	tataaatccg cgaccaacaa cgccatctgc aacaccaatc cttataacga atgccgcat	1080
	gtcggatatgc tcgttggctt agatgacttt gtcgctgcca ataacggcaa agatatgctg	1140
	atcatgctgc accaaatggg caatcacggg cctgcgtatt ttaagcgata tgatgaaaag	1200

ES 2 898 688 T3

	tttgccaaat tcacgccagc gtgtgaaggt aatgagcttg ccaagtgcga acatcagtcc	1260
5	ttgatcaatg cttatgacaa tgccttgctt gccaccgatg atttcatcgc tcaaagtatc	1320
	cagtggctgc agacgcacag caatgcctat gatgtctcaa tgctgtatgt cagcgatcat	1380
	ggcgaaagtc tgggtgagaa cgggtgtctat ctacatggta tgccaaatgc ctttgcacca	1440
10	aaagaacagc gcagtgtgcc tgcatttttc tggacggata agcaaaactgg catcacgcca	1500
	atggcaaccg ataccgtcct gacctatgac gcgatcacgc cgacattatt aaagctgttt	1560
15	gatgtcaccg cggacaaagt caaagaccgc accgcattca tccgctga	1608
	<210> 11	
	<211> 1617	
	<212> ADN	
20	<213> Escherichia coli	
	<400> 11	
	atgacatcac atcactcttg gtatcgctat tctatcaatc cttttgtgct gatggggttg	60
25	gtggcggttat ttttggcagc gacagcgaac ctgacatttt ttgaaaaagc gatggcggtc	120
	tatcctgtat cggataactt aggctttatc atctcaatgg cgggtggcgggt gatgggtgct	180
30	atgctactga ttgtcgtgct gttatcctat cgctatgtgc taaagcctgt cctgattttg	240
	ctactgatta tgggtgcgggt gacgagctat tttaccgata cttatggcac ggtctatgac	300
	accacatgc tccaaaatgc catgcaaacc gaccaagccg agtctaagga cttgatgaat	360
35	ttggcgtttt ttgtgcgaat tatcgggctt ggcgtgttgc caagtgtgtt ggtcgcagtt	420
	gccaaagtca attatccaac atggggcaaa ggtctgattc agcgtgcgat gacatgggggt	480
40	gtcagccttg tgctgttgct tgtgccgatt ggactattta gcagtcagta tgcgagtttc	540
	tttcgggtgc ataagccagt gcgtttttat atcaaccgga ttacgccgat ttattcggtg	600
	ggtaagcttg ccagtatcga gtacaaaaaa gccactgcgc caacagacac catctatcat	660
45	gccaaagacg ccgtgcagac caccaagccg agcgagcgta agccacgcct agtgggtgttc	720
	gtcgtcggtg agacggcgcg tgctgaccat gtgcagttca atggctatgg ccgtgagact	780
50	ttcccgcagc ttgccaaagt tgatggcttg gcgaatttta gccaaagtac atcgtgtggc	840
	acatcgacgg cgtatttctgt gccgtgtatg ttcagctatt tgggtcaaga tgactatgat	900
	gtcgataccg ccaaatacca agaaaatgtg ctagatacgc ttgaccgctt ggggtgtgggt	960
55	atcttgtggc gtgataataa ttcagactca aaaggcgtga tggataagct acctgccacg	1020
	cagtattttg attataaatc agcaaccaac aataccatct gtaacaccaa tccctataac	1080
60	gaatgccgtg atgtcgggtat gcttgtcggg ctagatgact atgtcagcgc caataatggc	1140
	aaagatatgc tcatcatgct acaccaaagt ggcaatcatg ggccggcgta ctttaagcgt	1200
	tatgatgagc aatttgccaa attcaccccc gtgtgcgaag gcaacgagct tgccaaatgc	1260
65	gaacaccaat cactcatcaa tgcctatgac aatgcgctac ttgcgactga tgattttatc	1320
	gccaaaagca tcgattggct aaaaacgcat gaagcgaact acgatgtcgc catgctctat	1380

ES 2 898 688 T3

	gtcagtgacc acggcgagag cttgggcgaa aatgggtgtct atctgcatgg tatgccaaat	1440
	gcctttgcac caaaagaaca gcgagctgtg cctgcgtttt tttgggtcaaa taatacgaca	1500
5	ttcaagccaa ctgccagcga tactgtgtctg acgcatgatg cgattacgcc aacactgctt	1560
	aagctgtttg atgtcacagc gggcaagggtc aaagaccgcg cggcatttat ccagtaa	1617
10	<210> 12 <211> 1608 <212> ADN <213> Escherichia coli	
15	<400> 12 gtgtggtacc gacgctcggg cagtccgttt gttcttgtgg cgagtgttgc cgttttcttg	60
	accgcgaccg ccaatcttac cttttttgat aaaatcagcc aaacctatcc catcgcggac	120
20	aatctcggct ttgtgtctgac gatcgtgtc gtgctctttg gcgcatgct actgatcacc	180
	acgctgttat catcgtatcg ctatgtgcta aagcctgtgt tgattttgct attaatcatg	240
	ggcgcggtga ccagttattht tactgacact tatggcacgg tctatgatac gaccatgctc	300
25	caaaatgccc tacagaccga ccaagccgag accaaggatc tattaacgc agcgtttatc	360
	atgcgtatca ttggtttggg tgtgctacca agtttgcttg tggcttttgt taagggtggat	420
30	tatccgactt ggggcaaggg tttgatgcgc cgattgggct tgatcgtggc aagtcttgcg	480
	ctgattttac tgcctgtggg ggcgttcagc agtcattatg ccagtttctt tcgctgtcat	540
	aagccgctgc gtagctatgt caatccgatc atgccaatct actcgggtggg taagcttgcc	600
35	agtattgagt ataaaaaagc cagtgcgcca aaagatacca tttatcacgc caaagacgcg	660
	gtacaagcaa ccaagcctga tatgcgtaag ccacgcctag tgggtgttcgt cgtcggtgag	720
40	acggcacgcg ccgatcatgt cagcttcaat ggctatgagc gcgatacttt cccacagctt	780
	gccaagatcg atggcgtgac caatthtagc aatgtcacat cgtgcggcac atcgacggcg	840
	tattctgtgc cgtgtatgtt cagctatctg ggcgcggatg agtatgatgt cgataccgcc	900
45	aaataccaag aaaatgtgct ggatacgtg gatcgcttg gcgtaagtat cttgtggcgt	960
	gataataatt cggactcaaa aggcgtgatg gataagctgc caaaagcgca atttgccgat	1020
50	tataaatccg cgaccaacaa cgccatctgc aacaccaatc cttataacga atgccgcgat	1080
	gtcgggtatgc tcgttggctt agatgacttt gtcgctgcca ataacggcaa agatatgctg	1140
	atcatgctgc accaaatggg caatcacggg cctgcgtatt ttaagcgata tgatgaaaag	1200
55	tttgccaaat tcacgccagc gtgtgaagggt aatgagcttg ccaagtgcga acatcagtcc	1260
	ttgatcaatg cttatgacaa tgccttgctt gccaccgatg atttcatcgc tcaaagtatc	1320
60	cagtggctgc agacgcacag caatgcctat gatgtctcaa tgctgtatgt cagcgatcat	1380
	ggcgaaagtc tgggtgagaa cgggtgtctat ctacatggta tgccaaatgc ctttgcacca	1440
	aaagaacagc gcagtgtgcc tgcatttttc tggacggata agcaaaactgg catcacgcca	1500
65	atggcaaccg ataccgtcct gacctatgac gcgatcacgc cgacattatt aaagctgttt	1560
	gatgtcaccg cggacaaagt caaagaccgc accgcattca tccgctga	1608

ES 2 898 688 T3

```

5  <210> 13
   <211> 1626
   <212> ADN
   <213> Escherichia coli

   <400> 13
10 atgccttccc ttataaaaat aaaaattggt cgccttatgt tctttttggc actgtatttt 60
   gcatttatgc tgaactggcg tggagttctc cttttttacg aaatccttta caaattagaa 120
   gattttaagt ttggtttcgc catttcatta ccaatattgc ttgttgcagc gcttaacttt 180
15 gtatttggtt ctttttcgat acggtattta ataaagcctt tttttgcact tcttatcgca 240
   cttagtgcaa tcgttagtta cacaatgatg aagtatagag tcttgtttga tcaaaacatg 300
   attcagaata tttttgaaac caatcaaaat gaggcgtag catatttaag cttaccaatt 360
20 atagtatggg ttactattgc tggttttatc cctgccattt tacttttctt tgttgaaatt 420
   gaatatgagg aaaaatgggt caaagggatt ctaactcgtg ccctatcgat gtttgcata 480
25 cttatagtga ttgcgggttat tgcagcacta tactatcaag attatgtgtc agtggggcgc 540
   aacaattcaa acctccagcg tgagattggt ccagccaatt tcgttaatag taccgttaaa 600
   tacgtttaca atcgttatct tgctgaacca atcccattta caactttagg tgatgatgca 660
30 aaacgggata ctaatcaaag taagcccacg ttgatgtttc tggtcggttg tgaaaccgct 720
   cgtggtaaaa atttctcgat gaatggctat gagaaagaca ccaatccatt taccagtaaa 780
35 tctggtggcg tgatctcctt taatgatgtt cgttcgtgtg ggactgcaac cgctgtatcc 840
   gtcccctgca tgttctccaa tatggggaga aaggagtttg atgataatcg cgctcgcaat 900
   agcgagggcc tgctagatgt gttgcaaaaa acggggatct ccattttttg gaaggagaac 960
40 gatggaggct gcaaaggcgt ctgcgaccga gtacctaaca tcgaaatcga accaaaggat 1020
   caccctaagt tctgcgataa aaacacatgc tatgacgagg ttgtccttca agacctcgat 1080
45 agtgaaattg ctcaaataaa aggggataag ctggttggct tccacctgat aggtagccat 1140
   ggcccaacct actacaagcg ctacctgat gctcatcgtc agttcacccc tgactgtcca 1200
   cgcagtgata ttgaaaactg cacagatgaa gagctcacca acacctatga caacaccatc 1260
50 cgctacaccg atttcgtgat tggagagatg attgccaaag tgaaaaccta cgaagataag 1320
   tacaacaccg cgttgctcta cgtctccgat catggtgaat cactgggagc attagggctt 1380
55 tacctacacg gtacaccgta ccagtttgca ccggatgatc agacccgtgt tcctatgcag 1440
   gtgtggatgt cacctggatt taccaaagag aaaggcggtg atatggcgtg tttgcagcag 1500
   aaagccgctg atactcgtaa ctcacacgat aatattttct catctgtatt gggatatctg 1560
60 gacgtcaaaa catcagttta cgaaaagggt ctagatatatt tcagtcaatg tcgtaatggt 1620
   caataa 1626

65 <210> 14
   <211> 1626
   <212> ADN

```


<213> Escherichia coli

<400> 14

5	atgccttccc ttataaaaat aaaaattggt cgccttatgt tctttttggc actgtatttt	60
	gcatttatgc tgaactggcg tggagttctc cattttttacg aaatccttta caaattagaa	120
	gattttaagt ttggtttcgc catttcatta ccaatattgc ttgttgagc gcttaacttt	180
10	gtatttggtt cattttcgat acggtattta ataaagcctt tttttgcact tcttatcgca	240
	cttagtgcaa tcgttagtta cacaatgatg aagtatagag tcttggttga tcaaaacatg	300
	attcagaata tttttgaaac caatcaaaat gaggcgttag catatttaag cttaccaatt	360
15	atagtatggg ttactattgc tgggtttatc cctgccattt tacttttctt tgttgaaatt	420
	gaatatgagg aaaaatgggt caaagggatt ctaactcgtg ccctatcgat gtttgcatca	480
20	cttatagtga ttgcggttat tgcagcacta tactatcaag attatgtgtc agtggggcgc	540
	aacaattcaa acctccagcg tgagattggt ccagccaatt tcgttaatag taccgttaaa	600
	tacgtttaca atcgttatct tgctgaacca atcccattta caactttagg tgatgatgca	660
25	aaacgggata ctaatcaaag taagccacg ttgatgtttc tggtcgttgg tgaaaccgct	720
	cgtggtaaaa atttctcgat gaatggctat gagaaagaca ccaatccatt taccagtaaa	780
30	tctggtggcg tgatctcctt taatgatggt cgttcgtgtg ggactgcaac cgctgtatcc	840
	gtcccctgca tgtttctcaa tatggggaga aaggagtttg atgaaaatcg cgctcgcaat	900
	agcgagggcc tgctagatgt gttgcaaaaa acggggatct ccattttttg gaaggagaac	960
35	gatggaggct gcaaaggcgt ctgcgaccga gtacctaa ca tcgaaatcga accaaaggat	1020
	caccctaagt tctgcgataa aaacacatgc tatgacgagg ttgtccttca agacctcgat	1080
40	agtgaaattg ctcaaataaa aggggataag ctggttggct tccacctgat aggtagccat	1140
	ggcccaacct actacaagcg ctacctgat gctcatcgtc agttcacccc tgactgtcca	1200
	cgcagtgata ttgaaaactg cacagatgaa gagctcacca acacctatga caacaccatc	1260
45	cgctacaccg atttcgtgat tggagagatg attgccaagt tgaaaacct cgaagataag	1320
	tacaacaccg cgttgctcta cgtctccgat catggtgaat cactgggagc attagggctt	1380
50	tacctacacg gtacaccgta ccagtttgca ccggatgatc agacctgtgt tcctatgcag	1440
	gtgtggatgt cacctggatt taccaaagag aaaggcgttg atatggcgtg tttgcagcag	1500
	aaagccgctg atactcgtaa ctcacacgat aatattttct catctgtatt gggatatctg	1560
55	gacgtcaaaa catcagttta cgaaaagggt ctagatatatt tcagtcaatg tcgtaatggt	1620
	caataa	1626

<210> 15

<211> 1626

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 15

65	gtgatttcta gatttaagac gttatcgggt aaccaattca ctttcatcac tgcgttggtt	60
----	---	----

ES 2 898 688 T3

	tatgtttgcc	ttttcaatct	accgctcttt	ggtatagtgc	gaaaaggaat	tgaaaaacaa	120
	ccagaagttg	atcccccttt	catcgcatct	atgccgctat	ttttaacatt	tgcgctgagt	180
5	tttttgtttt	caatttttac	cgtcaaatac	ctgctgaagc	ccttttttat	cgtattgacg	240
	ttactttcct	caagtgtatt	ttttgcagcc	tatcaataca	atgtcgtggt	tgactacggc	300
10	atgatagaaa	acacgtttca	aacacatcct	gctgaagcat	tgatgtatgt	aaatcttgca	360
	tcaattacca	atctactgct	gactgggcta	ttaccgtcat	atcttattta	taaggccgat	420
	attcattatc	agcccccttt	taaggagtta	ttgcataaat	tagcccttat	gctgctaattg	480
15	ttcgttggca	ttgggatagt	cgcctttttt	tactatcaag	attatgctgc	atttgttcga	540
	aacaacagtg	agttaaggcg	ttacattgtc	cctacctatt	ttgtcagtag	tgcatctaaa	600
20	tatctcaatg	agcactattt	gcagacgccc	atggaatacc	aacaacttgg	cctagatgcg	660
	aagaatgcc	gtcgtaaccc	gaacactaaa	cctaacttat	tagtggttgt	tgtgggtgaa	720
	actgcgcgct	caatgagcta	tcaatattat	ggatataaca	agccaaccaa	tgctcatacc	780
25	caaaatcagg	ggctgattgc	gtttaacgat	actagctcat	gcggcacggc	cacggcgggtg	840
	tctctaccct	gtatgttttc	acgaatgggg	cgggcagact	atgatcctcg	ccgtgctaatt	900
30	gctcaagaca	cagtgtattg	tgtgttaagt	catagtggta	taaaagtaca	gtggtttgat	960
	aatgattctg	gctgtaaagg	tgtgtgtgat	caggttgaaa	atctcacgat	agatttgaag	1020
	agtgatccga	agctgtgttc	tggccaatat	tgttttgacc	aagtattgct	caacaaatta	1080
35	gataaaattc	tggcagtagc	accaagtcaa	gatacagtaa	tttttttgca	tatcattggt	1140
	agtcattggc	caacttatta	tcttagatac	ccgccagagc	atcgtaaatt	tataccggat	1200
40	tgtccgcgca	gtgatattca	aaattgcagt	caagaagaac	tgattaacac	ctacgacaac	1260
	actattctat	atacggattt	tattctcagt	gaagtgggtga	ataaattaaa	aggtaagcag	1320
	gatattgttcg	atactgcaat	gctgtatctc	tctgaccatg	gtgagtcctt	gggtgaaaag	1380
45	ggcatgtatt	tacatgggtgc	gccctatagt	attgcaccga	aagaacaaac	tagcgtacca	1440
	atgctggcct	gggtatctaa	tgacttttagc	caagataatc	agttgaacat	gacttgtggt	1500
50	gcacagcgag	cagaacaggg	cggcttttcc	cacgacaatt	tgttcgacag	tttgctagga	1560
	cttatgaatg	taaaaaccac	cgtctatcag	agccaactcg	atatttttgc	accttgcagg	1620
	tattag						1626
55	<210> 16 <211> 1644 <212> ADN <213> Escherichia coli						
60	<400> 16 atgcggttgt ctgcatttat cactttcttg aaaatgcgcc cgcaagtgcg cactgaattt						60
65	ttgactctgt tcatcagcct tgtgttcacc ctgctgtgca atggcgtggt ttggaatgcc						120
	cttcttgctg gacgcgactc cctaacttct ggaacatggc taatgctcct ttgcactggg						180
	ttgctgatca ccgggctgca atgggtgttg ctccttctgg tggccacgcg ctggagtgtc						240

ES 2 898 688 T3

	aagccactac	tgattctgct	tgctgtcatg	acgcccgccg	ccgtttat	catgcgcaac	300
5	tacgggggtt	atctcgacaa	ggccatgctg	cggaatctga	tggagacgga	cgtcagggaa	360
	gccagtgagc	tgttgcaatg	gagaatgctg	ccctacttgt	tggttgcagc	cgtatccgtg	420
	tgggtggattg	cgagagtcag	ggttttacga	acgggctgga	aacaagcggg	aatgatgcgc	480
10	agcgcttgct	tggctggcgc	tctcgccatg	atttccatgg	gtctgtggcc	agtcatggat	540
	gtgctgatac	ccacgcttcg	tgaaaacaag	ccgcttcgct	atttgatcac	tcctgcaaac	600
	tacgtcatct	cgggcattcg	ggttttgact	gaacaggcgt	catcgtcagc	agacgaagca	660
15	aggggaagtcg	ttgcagccga	tgcgcatcga	gggcctcaag	aacaaggccg	ccgtcctcgt	720
	gctctcgtag	tggttgtcgg	ggaaaccgtc	agggcggtca	attgggggtt	gagcggctat	780
20	gaacgacaaa	ccaccctga	gttggccgca	cgcgacgtga	tcaatttttc	cgatgtcacc	840
	agttgcggga	cggatacggc	tacatccctt	ccctgcatgt	tttccctcaa	tggtcggcgc	900
	gactacgacg	aacgccagat	tcgtcggcgc	gagtccgtgc	tgcacgtttt	aaaccgtagt	960
25	gacgtcaaca	ttctctggcg	cgataaccag	tcgggctgta	aaggcgtctg	tgatggactg	1020
	ccctttgaaa	acctgtcttc	ggcaggccat	cccacactgt	gccatggcga	gcgctgcctg	1080
30	gatgaaattc	tgctcgaagg	gttggccgag	aagataacaa	caagccgcag	cgatatgctg	1140
	atcgttctgc	atatgctggg	caatcacggc	ccagcgtatt	tccagcgcta	tcccgaagc	1200
	taccgacgct	ggtcgccaac	ctgcgacacc	accgatctgg	ccagctgttc	gcatgaagcc	1260
35	ttggtgaaca	cctacgacaa	cgccgtgctt	tacaccgatc	atgtgcttgc	ccgtaccatt	1320
	gacctgctgt	ccggcatccg	ctcacacgac	acggcgctgc	tgtacgtttc	cgatcatggg	1380
40	gaatcgctcg	gcgagaaaag	cctgtatctc	catggcatac	cttacgtcat	cgcgccggat	1440
	gagcagatca	aggtgccgat	gatctgggtg	cagtcgagtc	aggtttatgc	cgaccaagcc	1500
	tgtatgcaaa	ctcatgcctc	tcgggcaccg	gtaagtcacg	atcacctgtt	tcacaccttg	1560
45	ctcgggatgt	tcgacgtgaa	aaccgctgcc	tacacgccag	agttggacct	tctggcaaca	1620
	tgcagaaaag	gacaaccaca	atga				1644

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, que comprende:
 - 5 a. someter una muestra de ensayo a análisis de espectrometría de masas y generar una salida de espectro de masas;
 - b. identificar en dicha salida de espectro de masas un primer pico definido indicativo de la presencia de lípido A modificado por fosfoetanolamina, en el que dicho primer pico definido es un pico presente en una salida de espectro de masas para el lípido A modificado por fosfoetanolamina y en el que dicho primer pico definido está ausente de una salida de espectro de masas correspondiente para el lípido A nativo; y
 - 10 c. en el que la presencia de dicho primer pico definido indica la presencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico, y en el que la ausencia de dicho primer pico definido indica la ausencia de una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho lípido A modificado por fosfoetanolamina es una parte integral de una membrana bacteriana o un fragmento de la misma; y/o
 - 15 en el que dicho análisis de espectrometría de masas comprende análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF; y/o
 - en el que dicho primer pico definido comprende una relación masa/carga (m/z) de 120 a 125 unidades m/z mayor que un segundo pico definido indicativo de la presencia de lípido A nativo.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que dicho segundo pico definido se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1793 a 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;
 - 25 b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1820 a 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - c. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1837 a 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - d. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1847 a 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - 30 e. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 2059 a 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 2075 a 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - 35 g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1614 a 1620 m/z, preferiblemente 1617,2 m/z, para *Pseudomonas aeruginosa*;
 - h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1907 a 1913 m/z, preferiblemente 1910,3 m/z, para *Acinetobacter baumannii*;
 - i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1793 a 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp.*;
 - 40 j. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1820 a 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para *Salmonella spp.*; o
 - k. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 2031 a 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella spp.*; y/o
 - 45 en el que una relación de intensidad de:
el primer pico definido; con respecto al
segundo pico definido es al menos 0,10:1.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además identificar en dicha salida de espectro de masas un tercer pico definido que comprende una relación masa/carga (m/z) de 22 a 28 unidades m/z mayor que un segundo pico definido indicativo de la presencia de lípido A nativo.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que dicho segundo pico definido se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1793 a 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella oxytoca*;
 - 55 b. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1820 a 1826 m/z, preferiblemente 1823,9 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - c. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1837 a 1843 m/z, preferiblemente 1840 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - 60 d. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1847 a 1853 m/z, preferiblemente 1850 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - e. un pico que comprende una relación masa-carga (m/z) de 2059 a 2065 m/z, preferiblemente 2062 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;
 - 65 f. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 2075 a 2081 m/z, preferiblemente 2078 m/z, para *Klebsiella pneumoniae*;

- g. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1793 a 1799 m/z, preferiblemente 1796,2 m/z, para *Salmonella spp*;
- h. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 1820 a 1826 m/z, preferiblemente 1824 m/z, para *Salmonella spp*; o
- 5 i. un pico que comprende una relación masa/carga (m/z) de 2031 a 2037 m/z, preferiblemente 2034 m/z, para *Salmonella spp*.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una relación de intensidad de:
el tercer pico definido; con respecto al
10 segundo pico definido es al menos 0,15:1, o al menos 0,6:1; y/o
en el que una relación de:
la suma de la intensidad de dicho primer pico definido y la intensidad de dicho tercer pico definido; con respecto a
la intensidad de dicho segundo pico definido es al menos 0,15:1; preferiblemente al menos 0,5:1.
- 15 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico a través de la resistencia codificada por plásmido comprende un plásmido que tiene un gen de resistencia a colistina movilizado; opcionalmente
en el que dicho gen de colistina movilizado comprende uno o más de un gen similar a *mcr*, *mcr-1*, *mcr-1.1*, *mcr-1.2*,
20 *mcr-1.3*, *mcr-1.4*, *mcr-1.5*, *mcr-1.6*, *mcr-1.7*, *mcr-1.8*, *mcr-1.9*, *mcr-1.10*, *mcr-2*, *mcr-2.2*, *mcr-3*, *mcr-3.2*, *mcr-4*, *mcr-5*,
SEQ ID: 1, SEQ ID: 2, SEQ ID: 3, SEQ ID: 4, SEQ ID: 5, SEQ ID: 6, SEQ ID: 7, SEQ ID: 8, SEQ ID: 9, SEQ ID: 10,
SEQ ID: 11, SEQ ID: 12, SEQ ID: 13, SEQ ID: 14, SEQ ID: 15, SEQ ID: 16, o una secuencia que tiene al menos un
50% de homología con las mismas.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra de ensayo se mezcla
25 con una solución matriz antes de someter dicha muestra de ensayo a análisis de espectrometría de masas,
opcionalmente en el que dicha solución matriz permite la extracción selectiva, co-cristalización e ionización de lípido
A nativo y/o lípido A modificado como parte integral de una membrana bacteriana; y/o
en el que la solución matriz comprende ácido 2,5-dihidroxibenzoico suspendido en un disolvente orgánico,
opcionalmente en el que dicho disolvente orgánico comprende cloroformo y metanol en una relación de 6:1 a 12:1, o
30 en una relación de 9:1 v/v.
en el que dicho disolvente orgánico comprende cloroformo, metanol, diclorometano, éter, éter dietílico, éter de petróleo,
isopropanol, butanol, hexano o una combinación de los mismos; opcionalmente
9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que la relación de la muestra de ensayo con respecto a la solución
35 matriz está entre 0,1:1 y 2:1 v/v, o 0,66:1 v/v.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra de ensayo comprende
entre 10^1 y 10^{10} células bacterianas; y/o
en el que dicho antibiótico de polipéptido catiónico cíclico es un antibiótico de polimixina; preferiblemente
40 en el que dicho antibiótico de polimixina es uno o más de colistina (polimixina E), polimixina B, matacina (polimixina
M) o una sal de las mismas.
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha bacteria se selecciona entre
45 los siguientes géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shigella*, *Salmonella*,
Citrobacter, *Raoultella* y combinaciones de los mismos; y/o
en el que dicha bacteria se selecciona entre las siguientes especies: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,
Klebsiella oxytoca, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Pseudomonas aeruginosa*,
Acinetobacter baumannii, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter*
50 *koseri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter youngae* y combinaciones de las mismas.
12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha bacteria se inactiva por calor
o en el que dicha bacteria no se inactiva por calor; y/o en el que dicha muestra de ensayo se procesa para eliminar la
sal; y/o
que comprende además la etapa de registrar los datos obtenidos en la etapa (a) en un soporte de datos adecuado.
- 55 13. Procedimiento de cribado para identificar un inhibidor de la resistencia a antibióticos de polipéptidos catiónicos
cíclicos en una bacteria, que comprende:
a. incubar una muestra que comprende una bacteria resistente a un antibiótico de polipéptido catiónico cíclico con un
inhibidor candidato;
60 b. someter dicha muestra a análisis de espectrometría de masas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y
generar una salida de espectro de masas; y
c. identificar la presencia o ausencia de dicho primer pico definido en la salida del espectro de masas;
en el que la presencia de dicho primer pico definido indica que dicho inhibidor candidato no es una sustancia capaz
de inhibir la resistencia a antibióticos de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria, y en el que la ausencia de dicho
65 primer pico definido indica que dicho inhibidor candidato es una sustancia capaz de inhibir la resistencia a antibióticos
de polipéptido catiónico cíclico en una bacteria.

- 5 14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que dicho inhibidor candidato se selecciona entre cualquiera de un compuesto natural, un compuesto químico sintético, péptido, un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento de anticuerpo, preferiblemente en el que dicho inhibidor candidato es una sustancia química o sustancia farmacéutica seleccionada de una biblioteca de tales inhibidores candidatos; y/o en el que dicha muestra es de un ser humano o de un animal no humano.

FIGURA 1

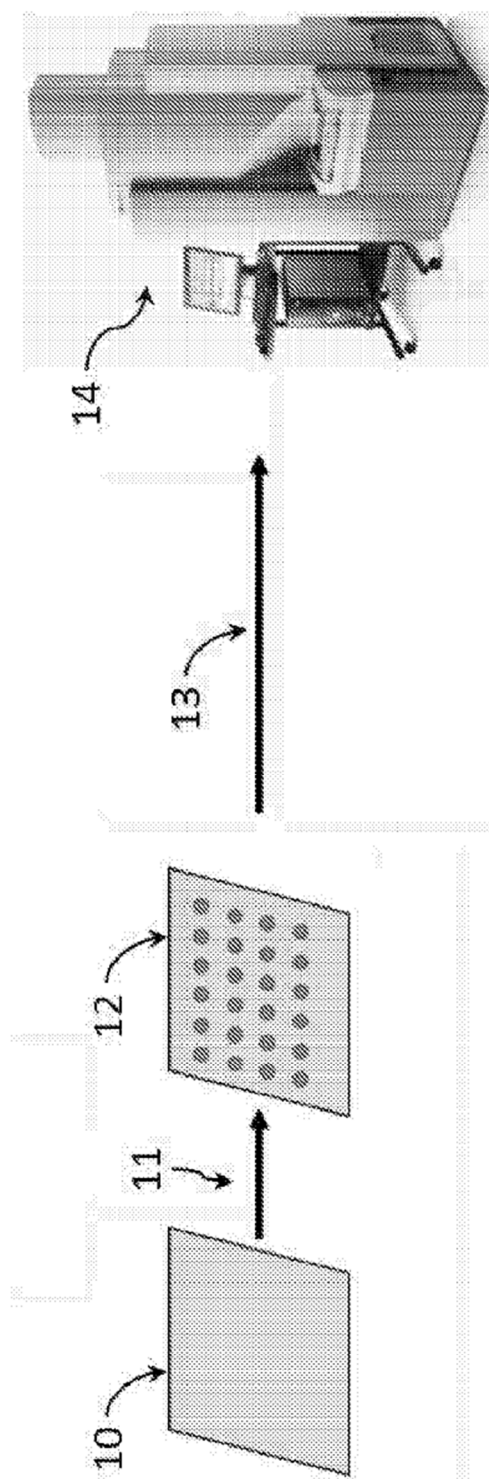


FIGURA 2A

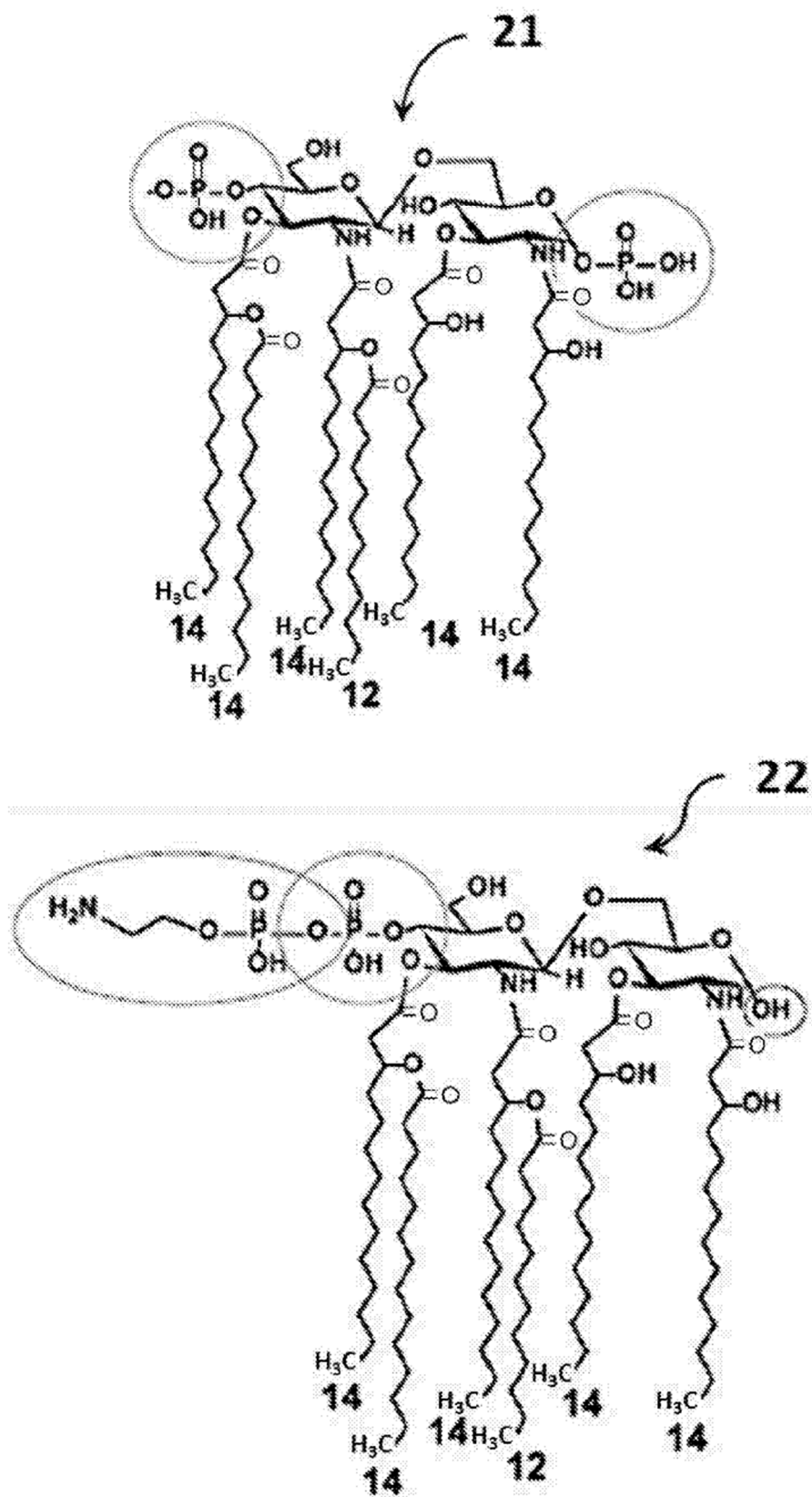


FIGURA 2B

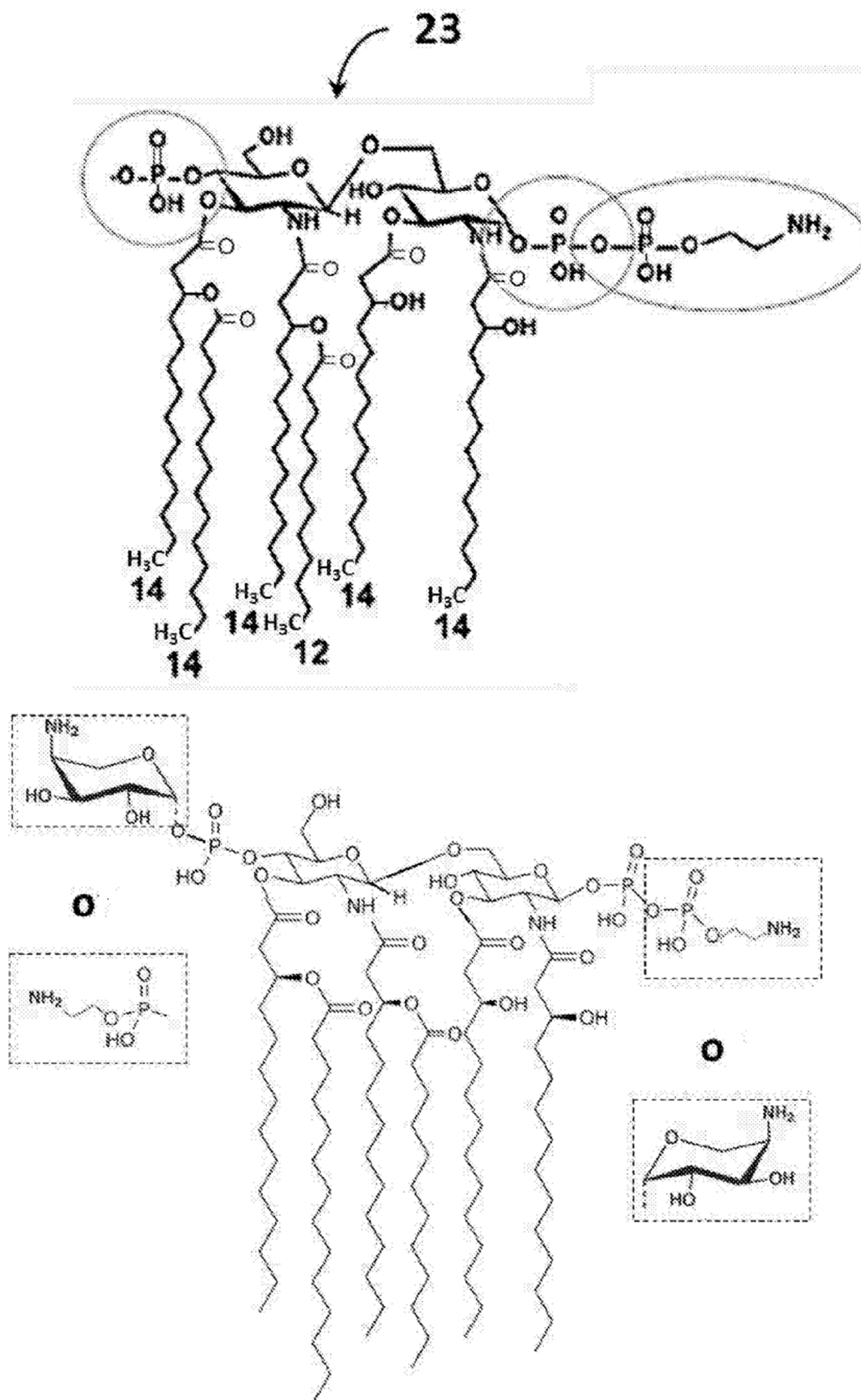


FIGURA 3

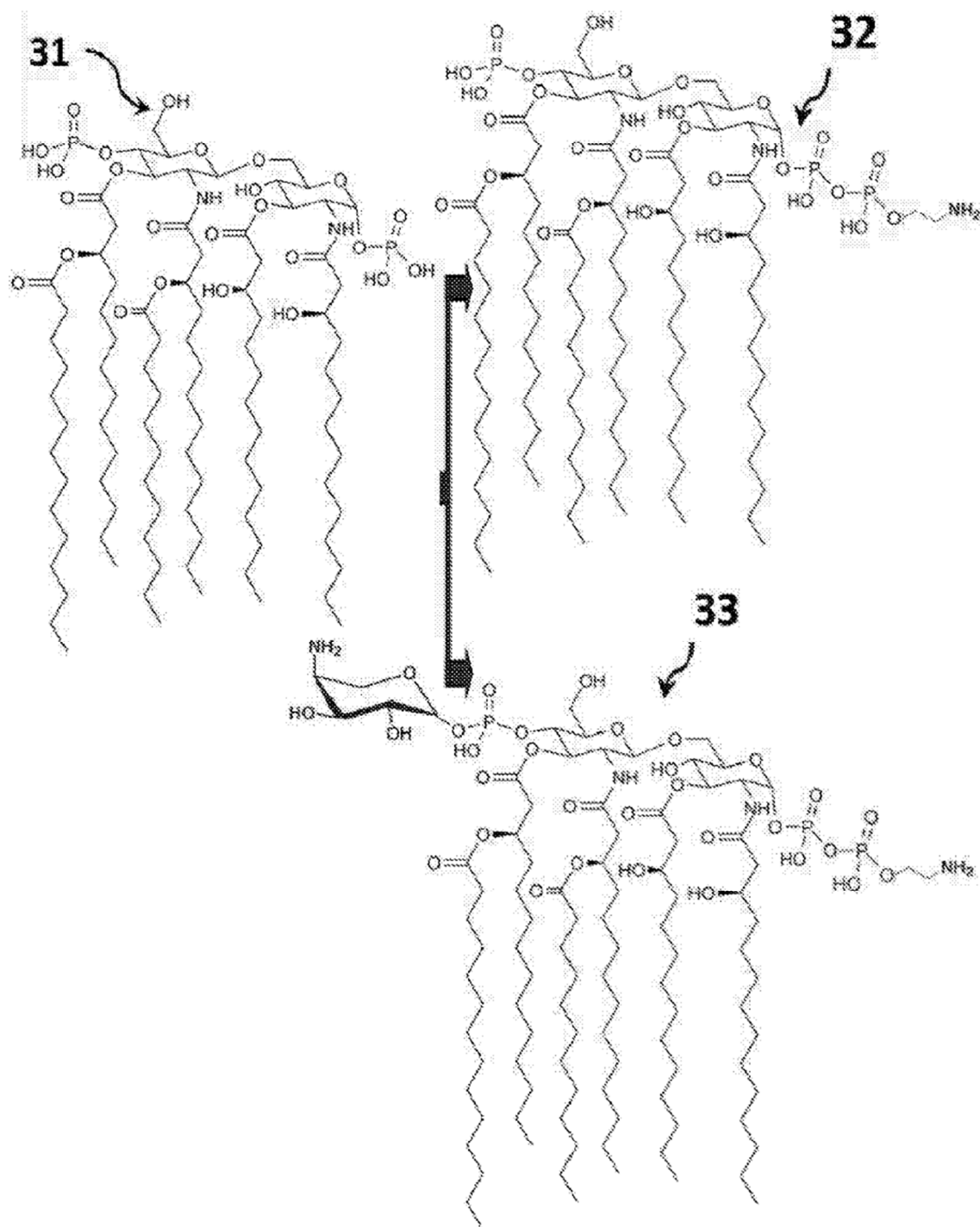


FIGURA 4

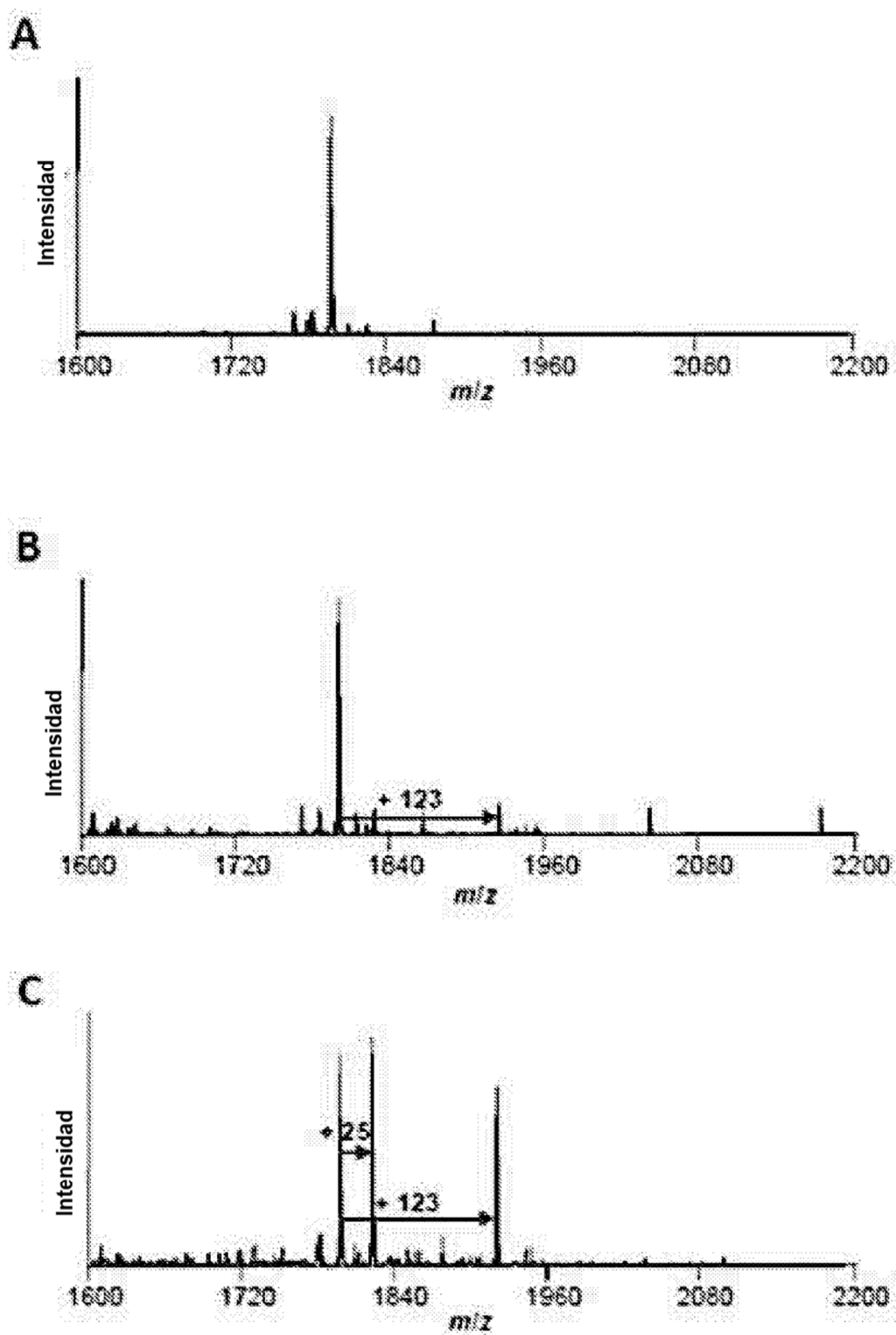


FIGURA 5

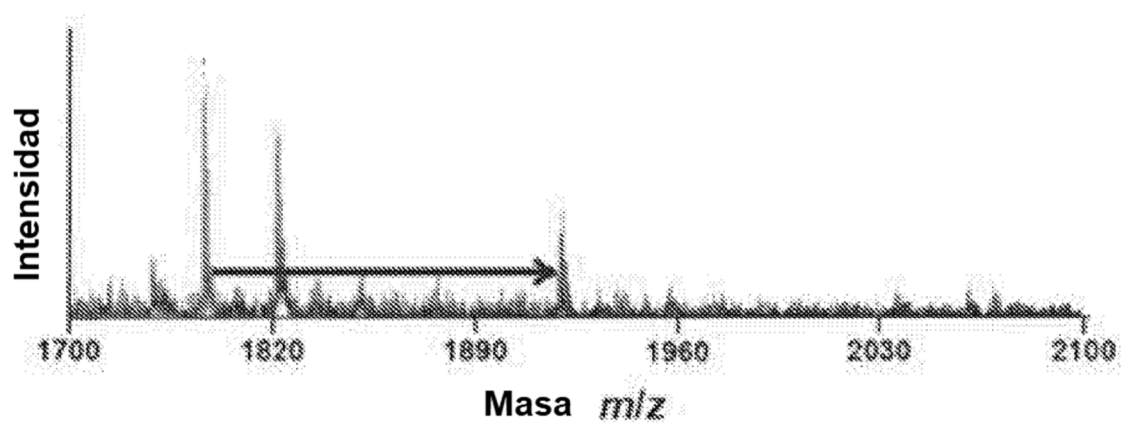
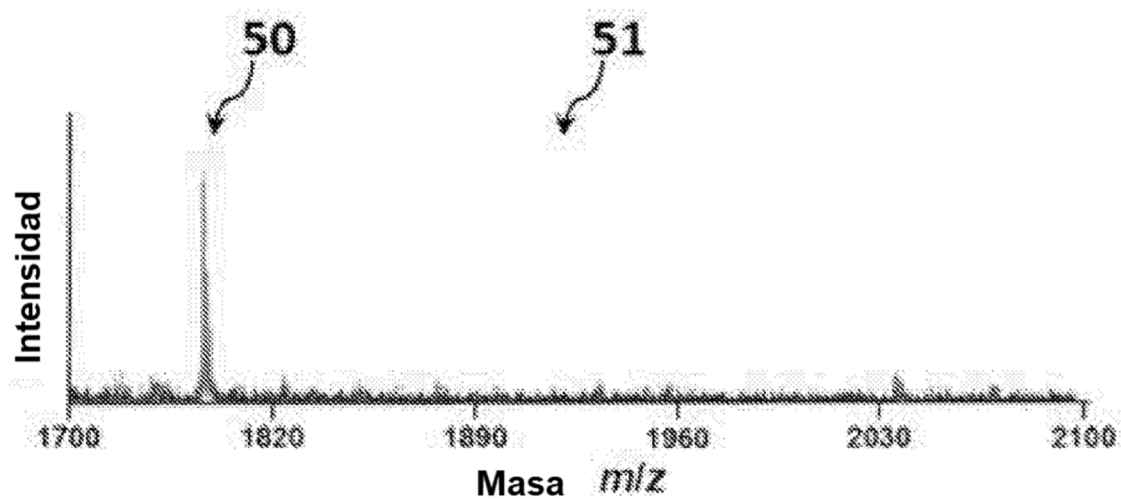


FIGURA 6

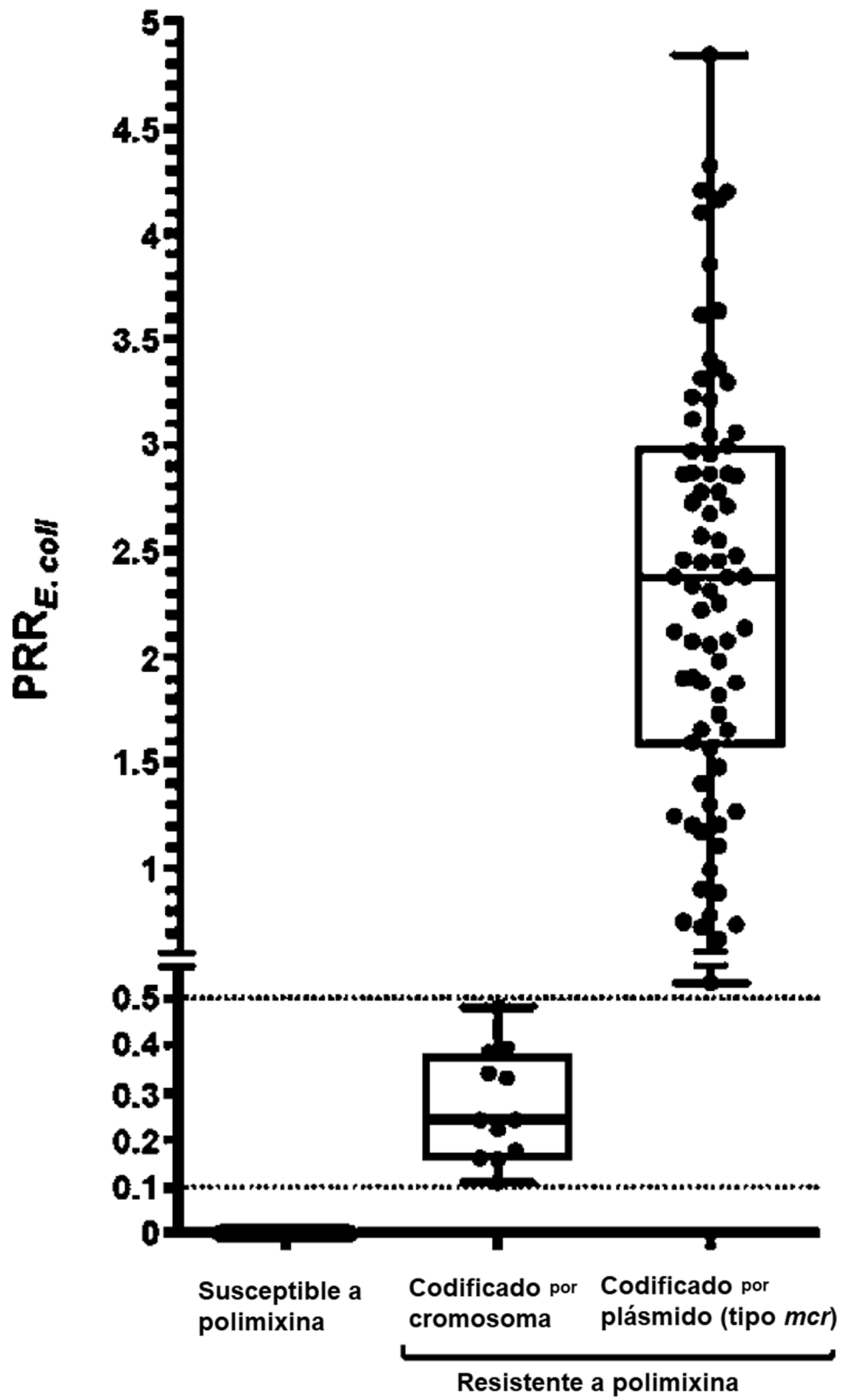


FIGURA 7

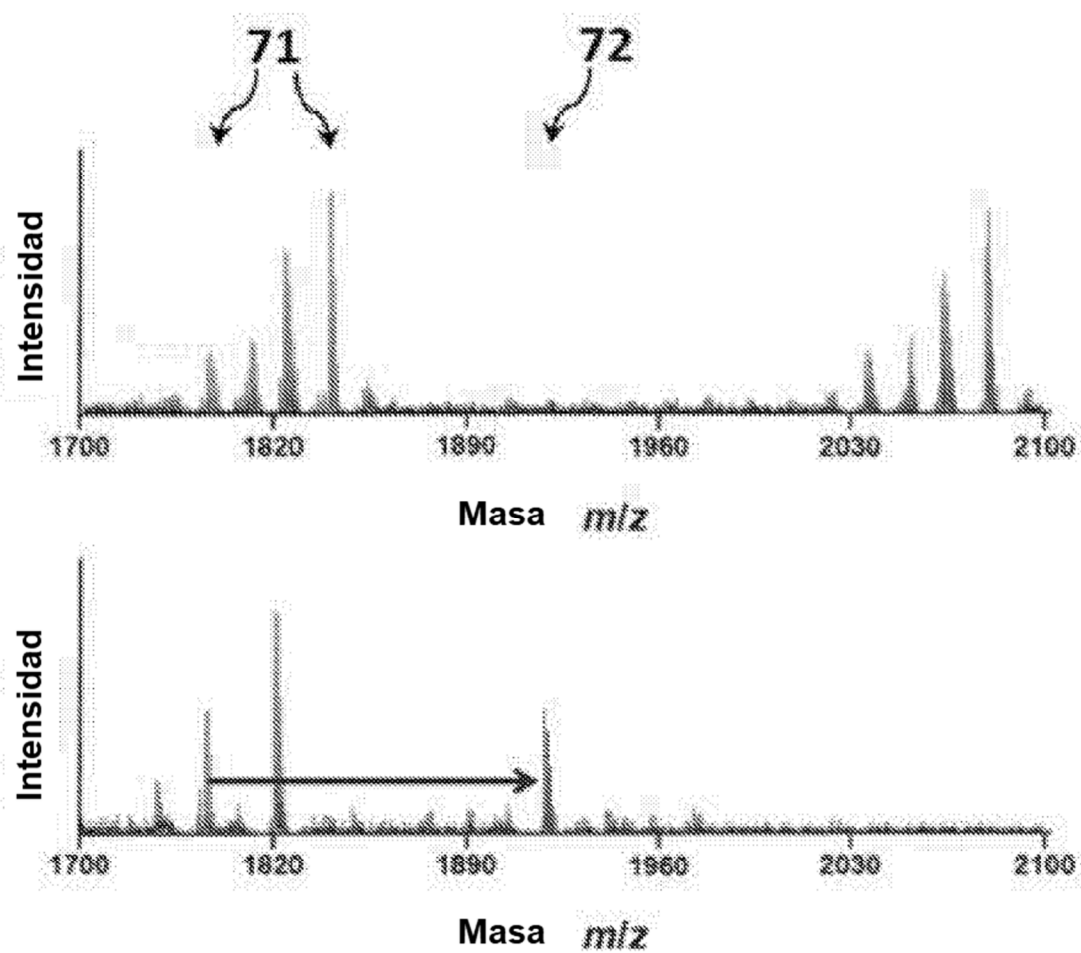


FIGURA 8

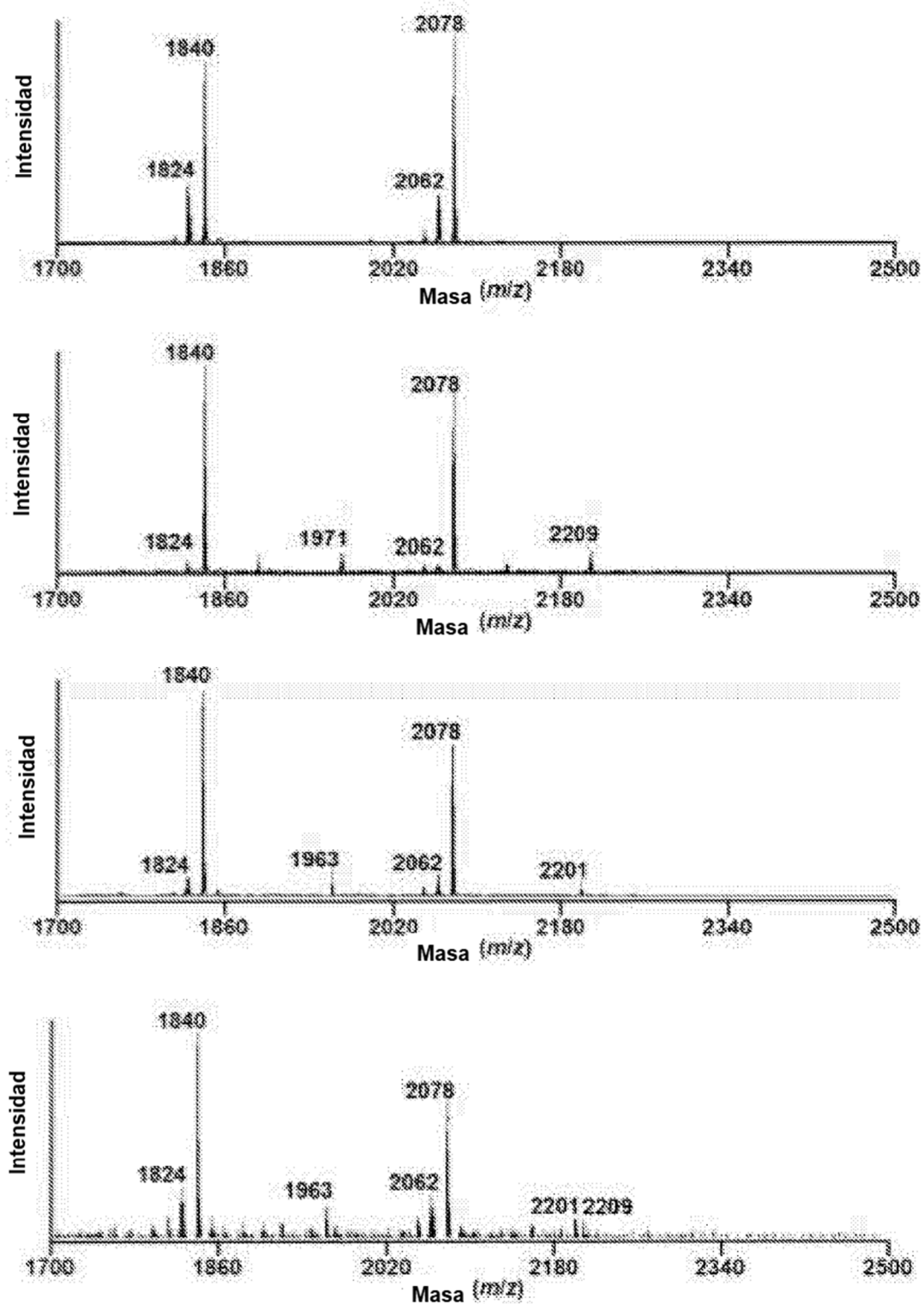


FIGURA 9

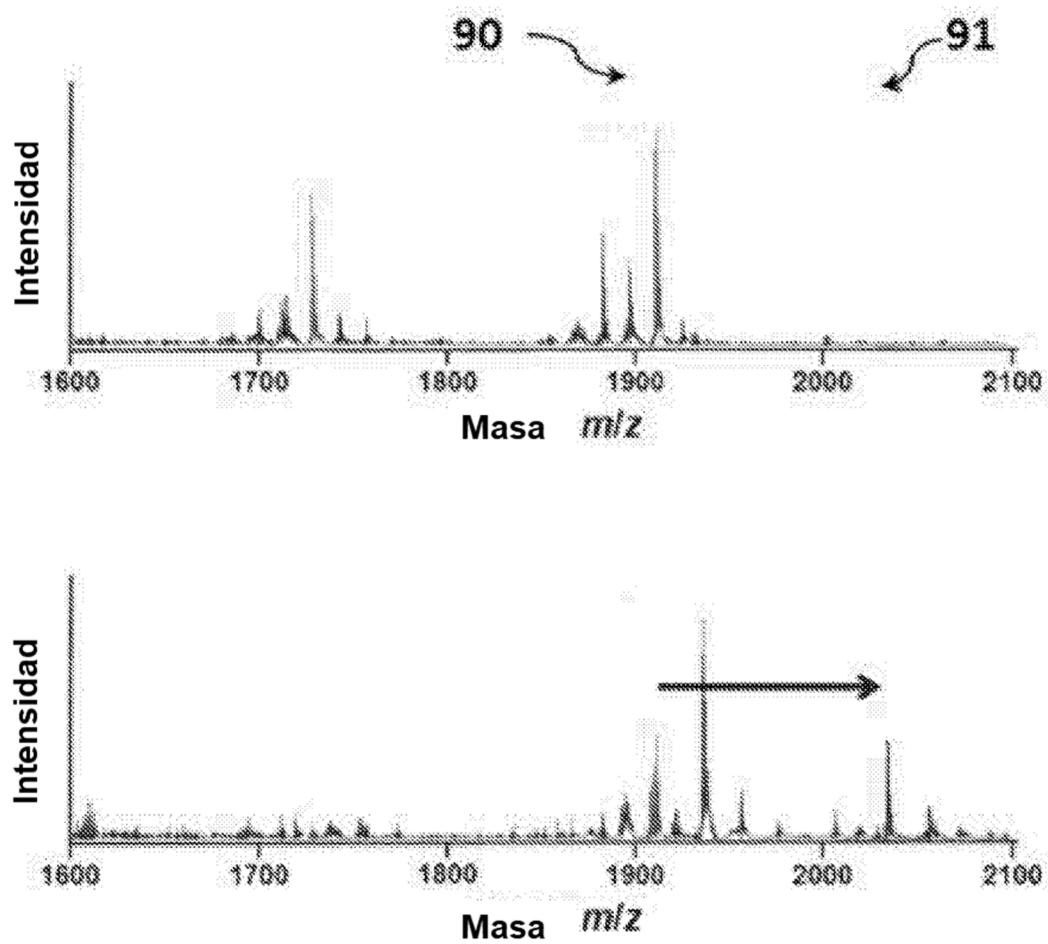


FIGURA 10

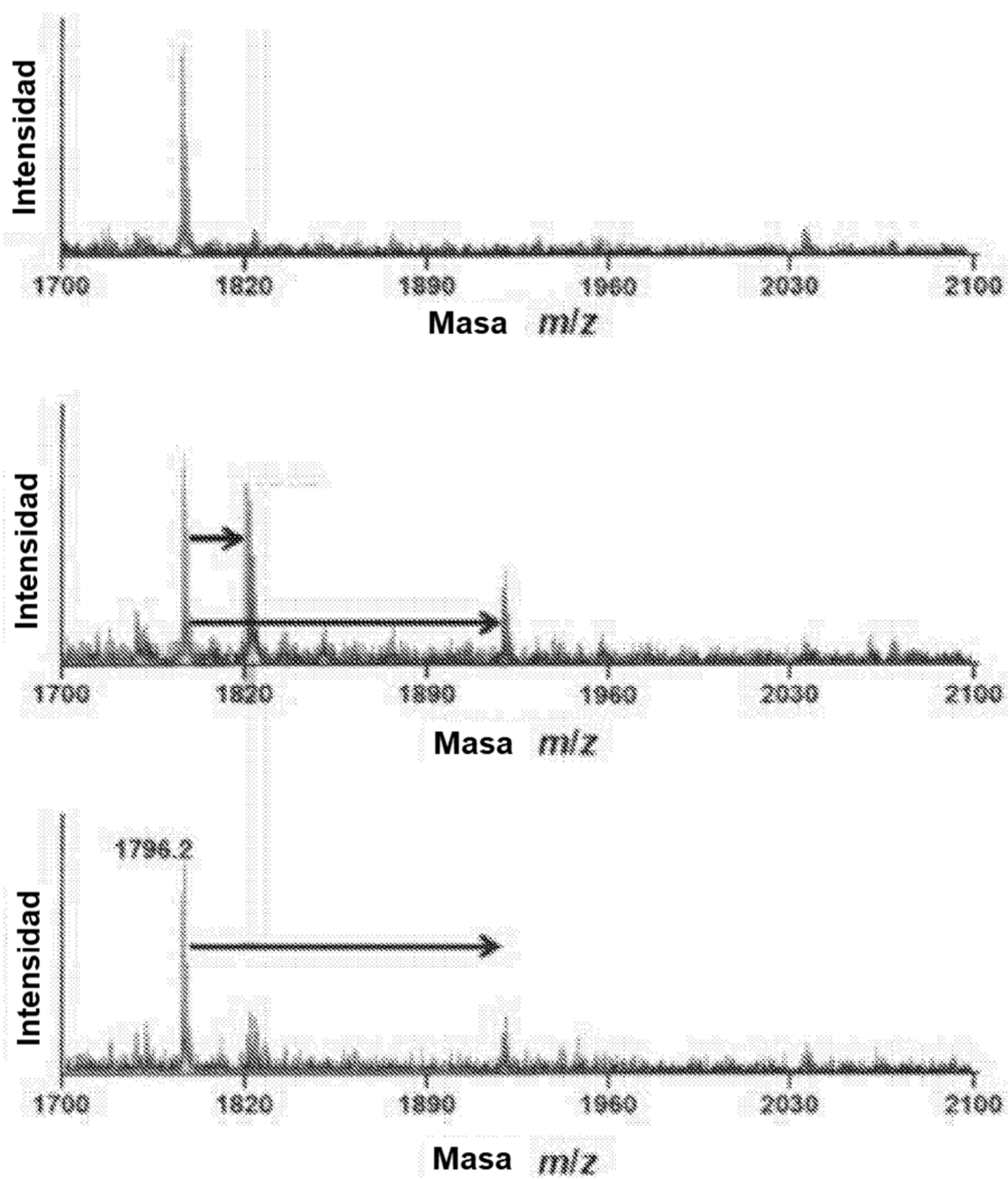


FIGURA 11

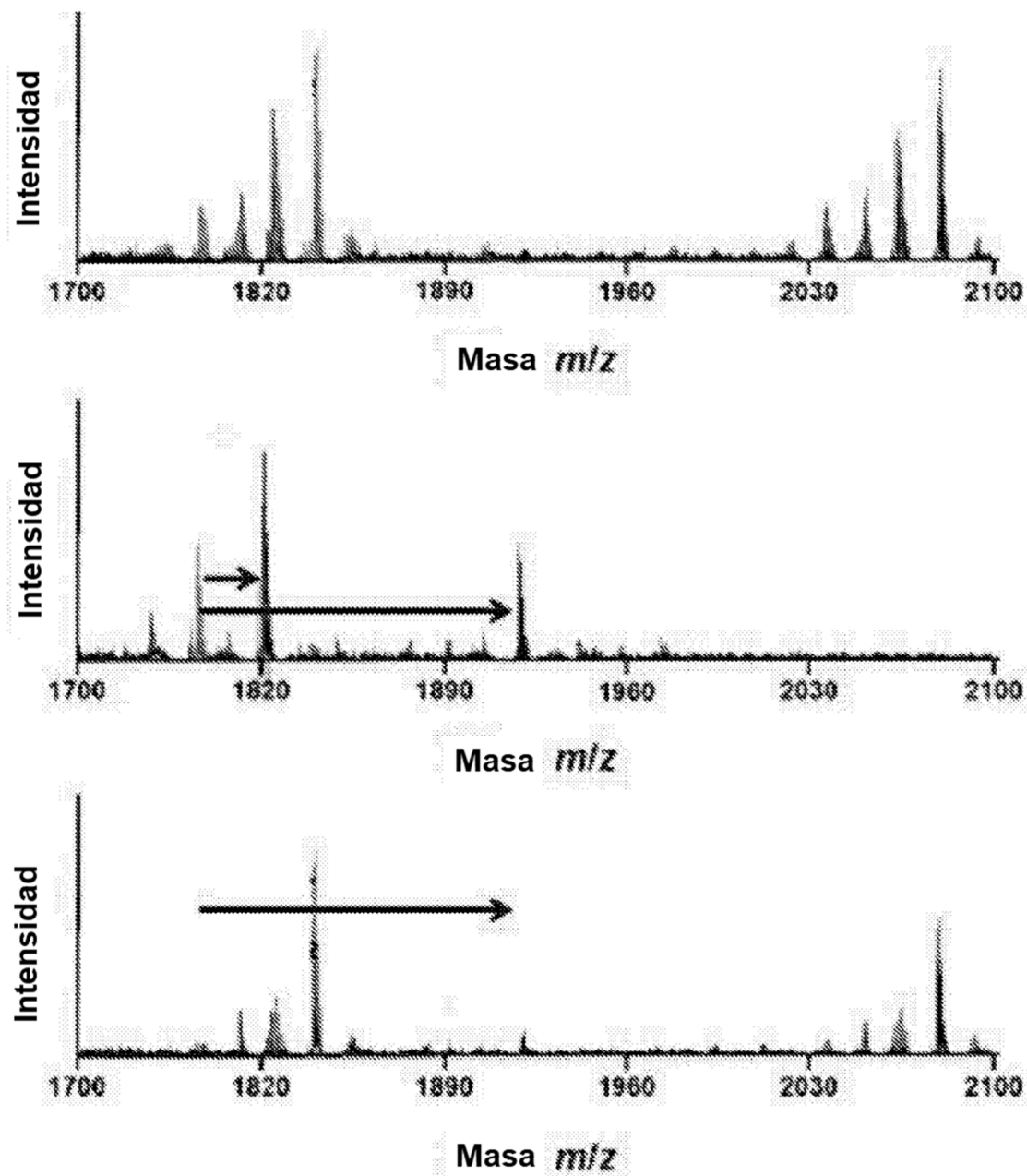


FIGURA 12

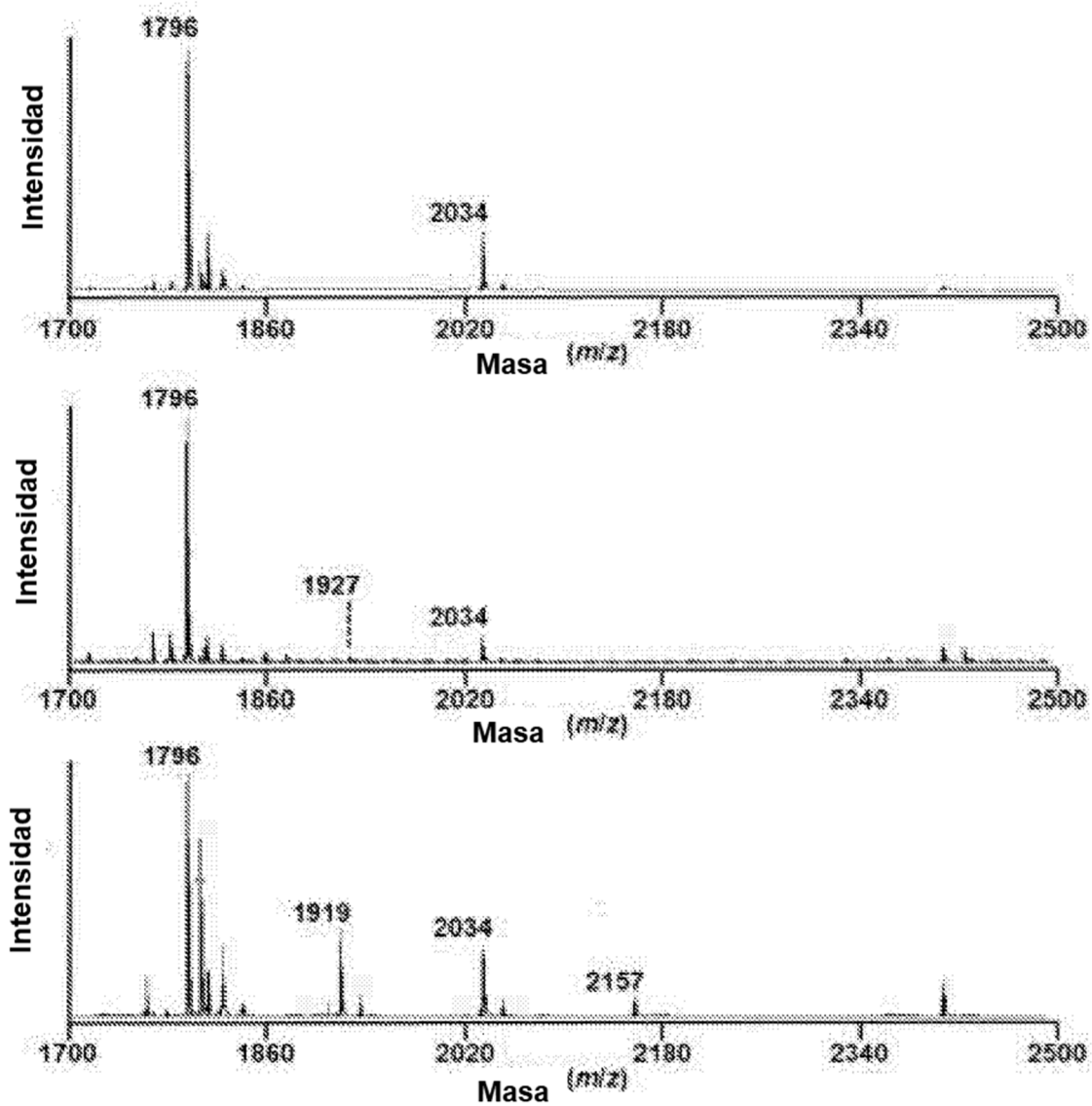


FIGURA 13

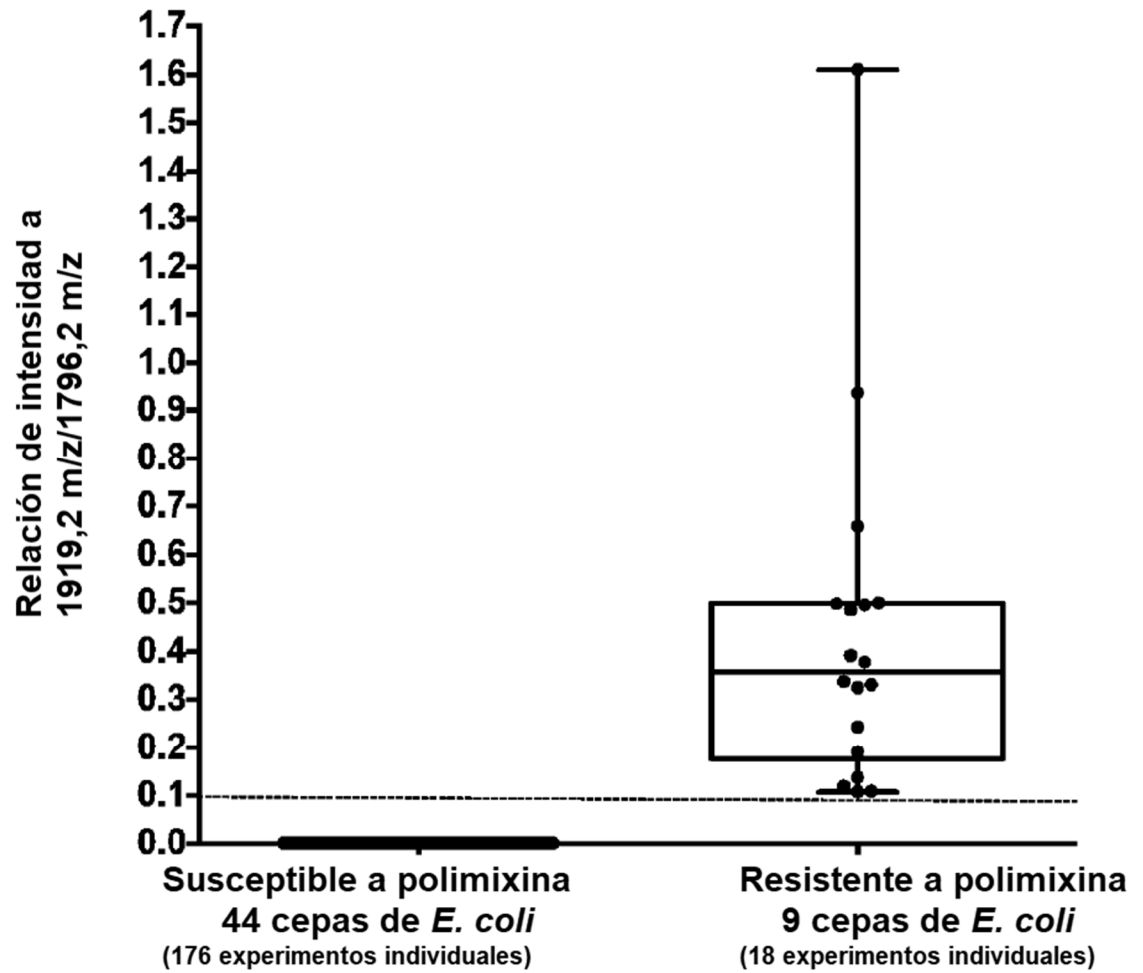


FIGURA 14A

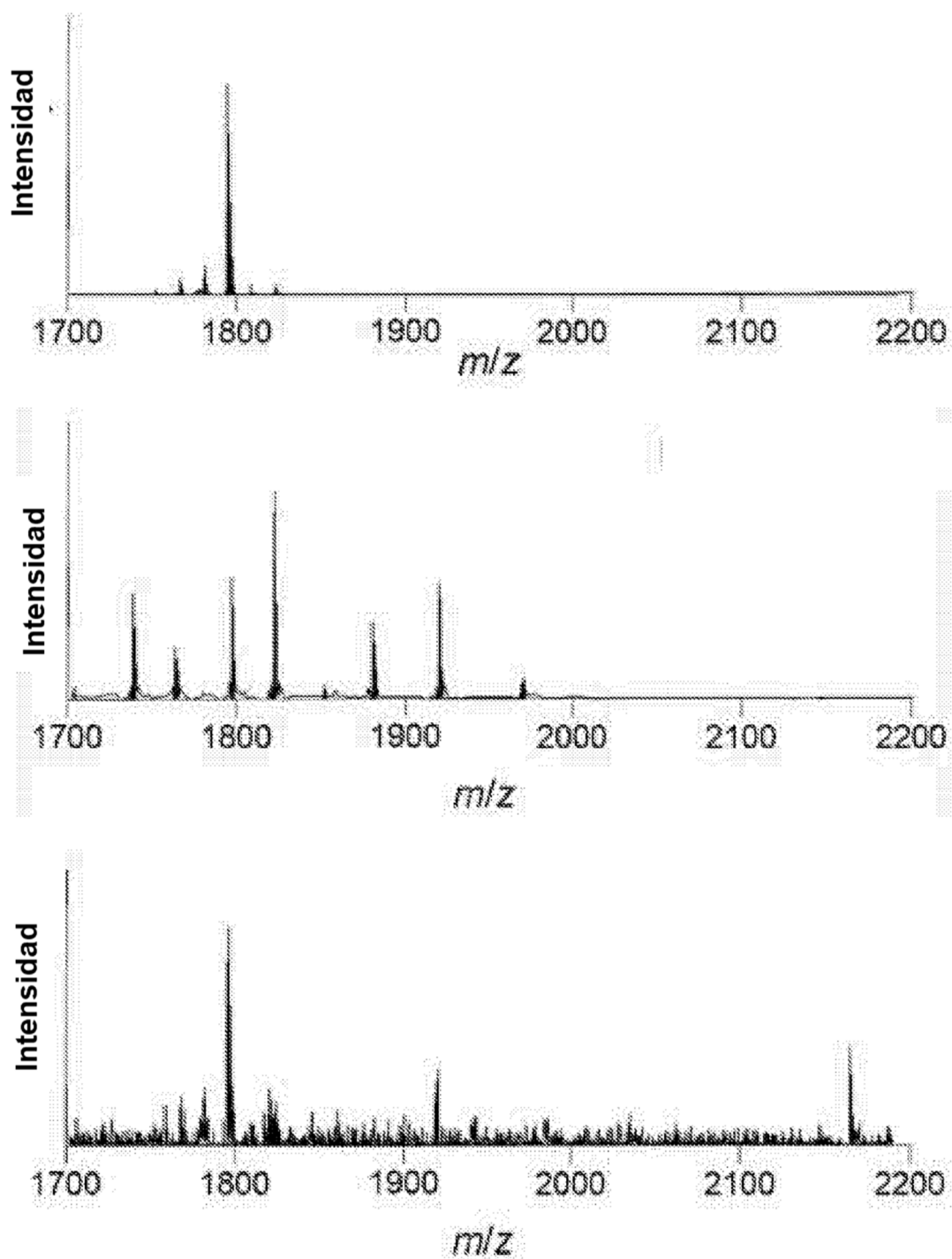


FIGURA 14B

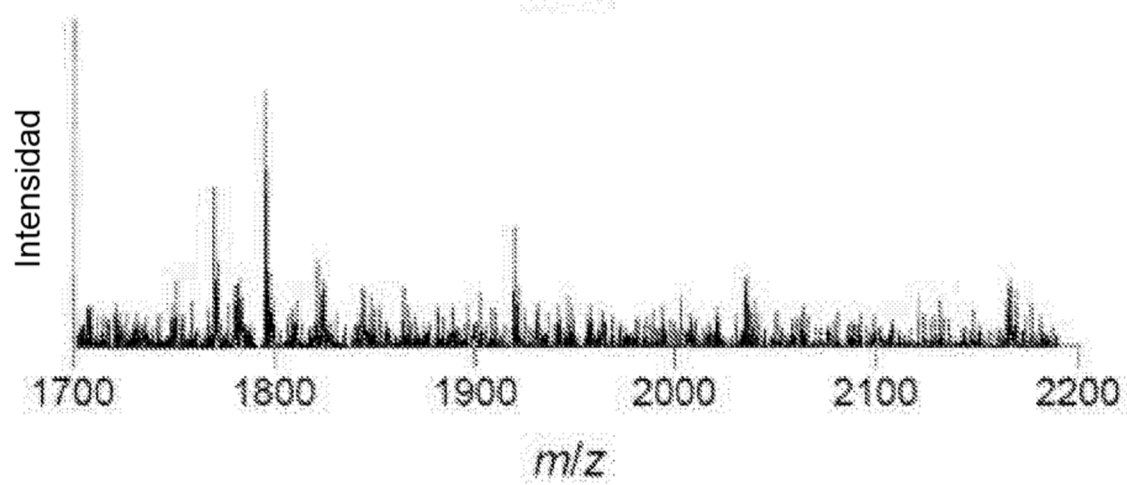
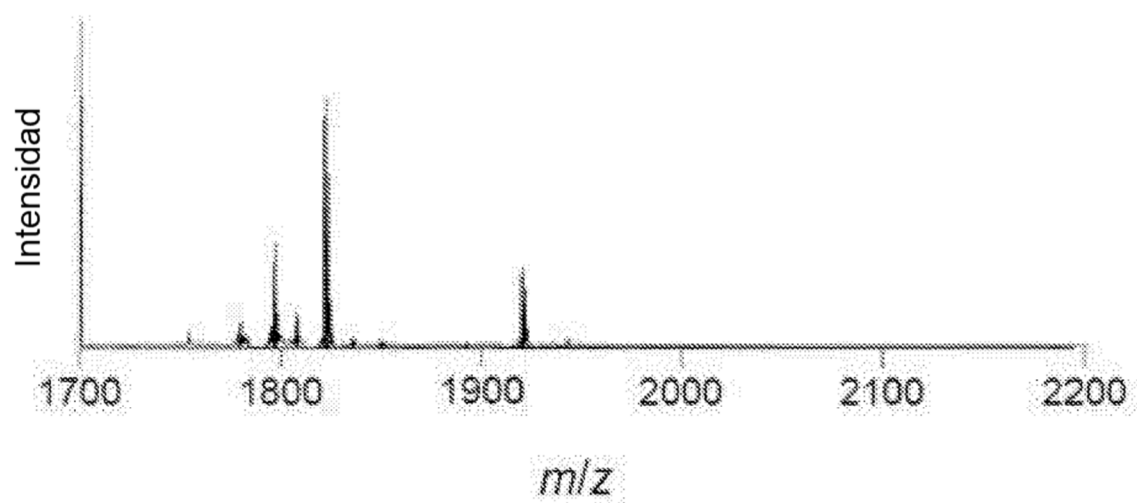
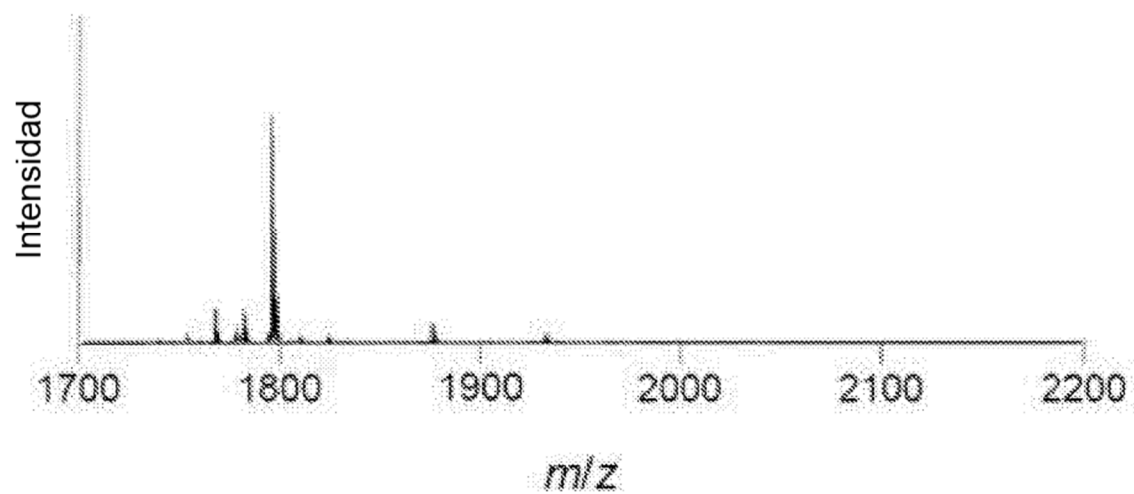


FIGURA 14C

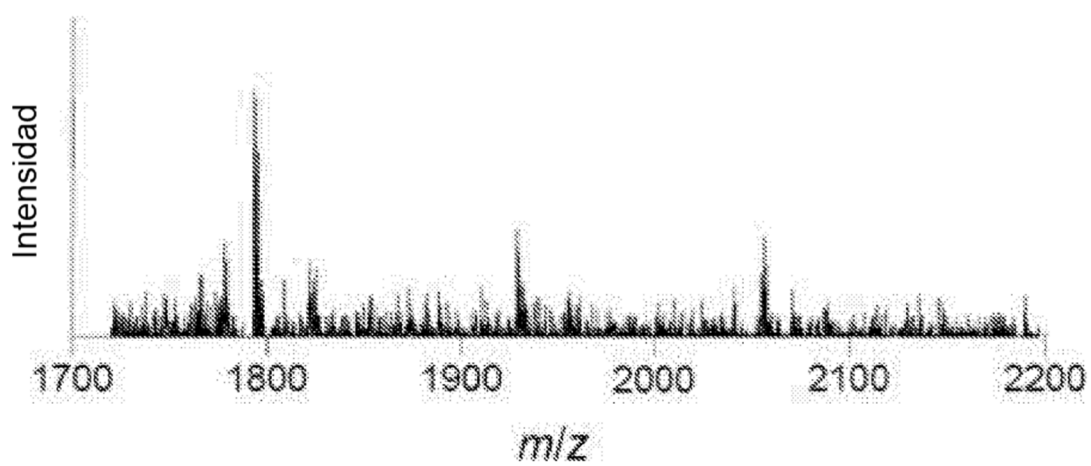
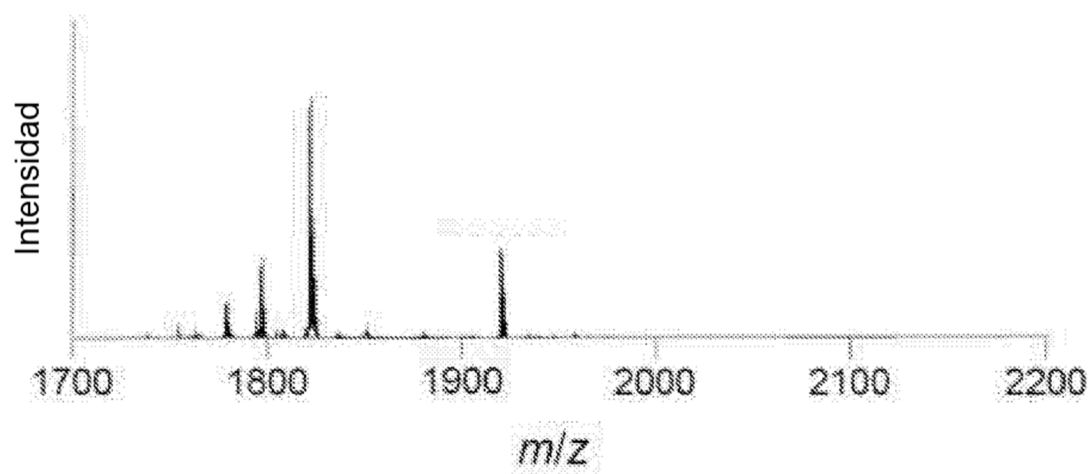


FIGURA 14D

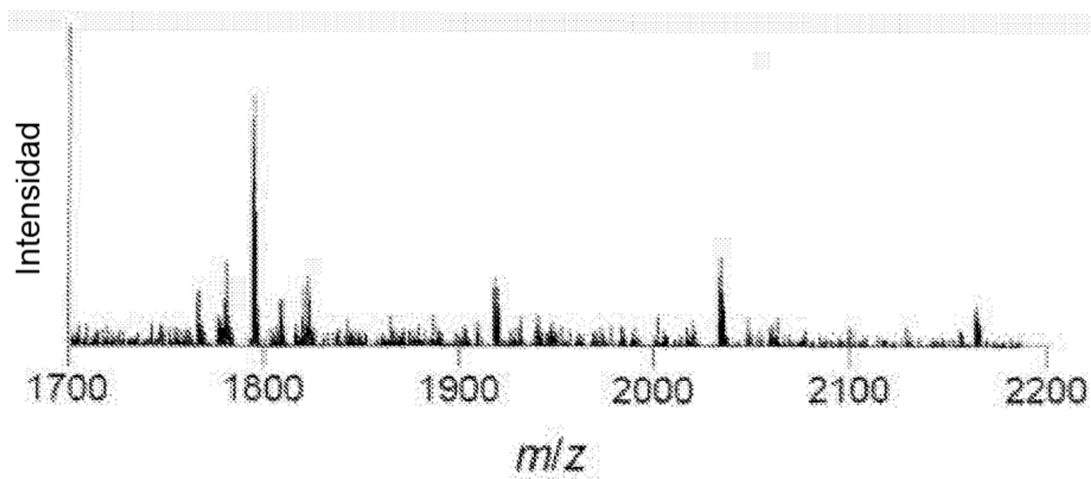
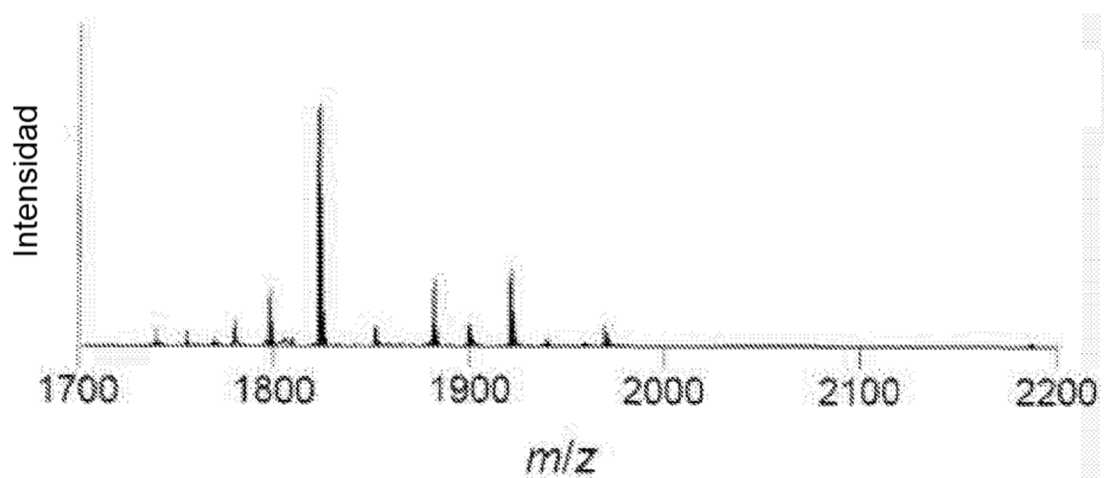


FIGURA 15

Especies	susceptibilidad a polimixinas	Mecanismo de resistencia	Picos								
		codificado por cromosoma vs. plásmido	1796	1821	1824	1840	1850	1919	1910	1927	1955
<i>E. coli</i>	Susceptible		++	-		-		-			
	Resistente	Plásmido	+	++		-		++			
	Resistente	cromosoma	+	-		-		+			
<i>K. pneumoniae</i>	Susceptible		+/-	-	+	++	+	-			-
	Resistente	Plásmido	+	++	+	-	+	++			-
	Resistente	cromosoma	+	-	+	++	+	+			+
<i>A. baumannii</i>	Susceptible								++		
	Resistente	Plásmido									
	Resistente	cromosoma							+		
<i>Salmonella Spp.</i>	Susceptible		++		+			-		-	
	Resistente	Plásmido	++		+			+		-	
	Resistente	cromosoma	++		+					+	

Especies	susceptibilidad a polimixinas	codificado por cromosoma vs. plásmido	1963	1971	2033	2034	2062	2078	2157	2193	2201	2209
<i>E. coli</i>	Susceptible											
	Resistente	Plásmido										
	Resistente	cromosoma										
<i>K. pneumoniae</i>	Susceptible		-	-			+	++		-	-	-
	Resistente	Plásmido	+	-			+	++		-	+	-
	Resistente	cromosoma	+/-	+			+	++		+	+/-	+
<i>A. baumannii</i>	Susceptible				-							
	Resistente	Plásmido										
	Resistente	cromosoma			++							
<i>Salmonella Spp.</i>	Susceptible					+			-			
	Resistente	Plásmido				+			+			
	Resistente	cromosoma				+						

FIGURA 16

[illegible]

FIGURA 16 (continuación)

[illegible]

FIGURA 16 (continuación)

```

MCR-1.2 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1.8 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1.7 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1.5 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1.4 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1.6 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1.3 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1.10 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-1.9 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-2.2 GACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGG
MCR-2 GACCAAGCCGAGTCTAAGGACTTGATGAATTTGGCGTTTGTGCGAATTATCGGGCTTG
MCR-5 GACGTGAGGGAAGCCAGTGAAGTGTGCA-ATGGAGAATGCTGCCCTACTTGTGGTTGCA
MCR-3 AATCAAAATGAGGCGTTAGCATATTTAAGCTTACCAATTATAGTATGGGTTACTATTGCTG
MCR-3.2 AATCAAAATGAGGCGTTAGCATATTTAAGCTTACCAATTATAGTATGGGTTACTATTGCTG
MCR-4 CATCCTGCTGAAGCATGATGATGATAAATCTTGCATCAATTAC-CAATCTACTGCTGACT
      *      **      *      *
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GTG-TGCTACCAAGTTTGGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGG---ATTATCCGACTTGGGG
GCG-TGTTGCCAAGTGTGTTGGTCCGAGTTGCCAAAGTCA---ATTATCCAACATGGGG
GC---CGTATCCGTGTG-CGCGATTGCGAGAGTCAGGCTTTT---ACGAACGGGCTGAAA
GTTTTATCCCTGCCATTTTACTTTTCTTTG-TTGAAATTGAATATGAGCAAAAATGCTT
GTTTTATCCCTGCCATTTTACTTTTCTTTG-TTGAAATTGAATATGAGCAAAAATGCTT
GGGCTATTACCGTCATATCTTATTATAAGGCCGATATTCATTATCAGCC---CTTTTT
      *      *      *      *      *
MCR-1.2 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1.8 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1.7 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1.5 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1.4 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1.6 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1.3 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1.10 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-1.9 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-2.2 CAAGGGTT--TGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTACTGC
MCR-2 CAAAGGTC--TGATTCAGCGTGCGATGACATGGGGTGTGAGCCTTGTGCTGTTGCTGTGTC
MCR-5 CAAGCGGTAATGATGCGCAGCGCTTGTCTGGCTGGCGC---TCTCGCCATGATTTCCATGG
MCR-3 CAAAGGGA--TTCTAACTCGTGCCTTATCGATGTTTGCATCATTATAGTCAATTGCGGTTA
MCR-3.2 CAAAGGGA--TTCTAACTCGTGCCTTATCGATGTTTGCATCATTATAGTCAATTGCGGTTA
MCR-4 TAAGGAGT--TATTGCATAAAATTAGCCTTTATGCTGCTAATGTTTCTGCTTGGCATTGGGATAG
      **      *      *      *      *

```

FIGURA 16 (continuación)

[illegible]

[illegible]

FIGURA 16 (continuación)

[illegible]

FIGURA 16 (continuación)

[illegible]

FIGURA 16 (continuación)

ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACGCCAGTGTGTTGAAGGTAATGAGCTTGCCAAAGTCGCAACATCAGTCCTTGATCAATG
ACCCCAGTGTGCGAAGGCCAACGAGCTTGCCAAATGCGAACACC AATCACTCATCAATG
TCGCCAACCTGCGACACACCGATCTGGCCAGCTGTTTCGCATGAAGCCTTGGTGAACA
ACCCCTGACTGTCCACGCAGTGATATTGAAA ACTGCACAGATGAAGAGCTCACCAACA
ACCCCTGACTGTCCACGCAGTGATATTGAAA ACTGCACAGATGAAGAGCTCACCAACA
ATACCGGATTGTCCGCCAGTGATATTCAA AAATTGCAGTCAAGAAGAACTGATTAACA

MCR-1.2 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1.8 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1.7 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1.5 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1.4 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATAATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1.6 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1.3 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1.10 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-1.9 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-2.2 CTTATGACAATGCCCTTGCTTGCCACCGATGATTTTCATCGCTCAAAGTATCCAGTGGCTGCAG
MCR-2 CCTATGACAATGCCCTTACCTTGCGACTGATGATTTTTATCGCCAAAGCATCGATTGGCTAAAA
MCR-5 CCTACGACAACGCCCGTGTCTTACACCGATCATGTGCTTGCCCCGTACCATTGACCTGCTGT---
MCR-3 CCTATGACAACACCATCCGCTACACCGATTTCGTGATTGGAGAGATGATTGCCAAGTTGAAA
MCR-3.2 CCTATGACAACACCATCCGCTACACCGATTTCGTGATTGGAGAGATGATTGCCAAGTTGAAA
MCR-4 CCTACGACAACACTATTCTATATA CGGATTTTATTCTCAGTGAAGTGGTGAATAAAT'AAAA

* * * * *

ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCACAGCAATGCCCTATGATGTCTCAATGCTGTATGTTCAGCGATCATGGCGAAAGTC
ACGCATGAAGCGAACTACGATGTCCGCATGCTCTATGTTCAGTGANACGGCGAGAGCT
-CGGCATCCGCTCACACGACACGGCGCTGCTGTACGPTTCCGATCATGGGAATCGC
ACCTACGAAGATAAGTACAACACCGCGTTGCTCTACGPTCTCCGATCATGGTGAATCAC
ACCTACGAAGATAAGTACAACACCGCGTTGCTCTACGPTCTCCGATCATGGTGAATCAC
GGTAAGCAGGATATGTTCCGATACTGCAATGCTGTATCTCTCTGACCATGGTGAGTCTT

* * * * *

FIGURA 16 (continuación)

MCR-1.2 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1.8 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1.7 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1.5 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1.4 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1.6 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1.3 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1.10 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-1.9 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-2.2 TGGGTGAGAACGGTGTCTATCTACATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-2 TGGGCGAAAATGGTGTCTATCTGCATGGTATGCCAAATGCCCTTTGCACCAAAAGAACAGCGC
 MCR-5 TGGGCGAGAAAAGGCGCTGTATCTCCATGGCATACTTACGTCATCGCGCGCGATGACGAGATC
 MCR-3 TGGGAGCATTAGGCGCTTACCTACACGGTACACCGTACCAGTTTGCACCGGATGATCAGACCT
 MCR-3.2 TGGGAGCATTAGGCGCTTACCTACACGGTACACCGTACCAGTTTGCACCGGATGATCAGACCT
 MCR-4 TGGGTGAAAAGGCCATGTATTTACATGGTGGCGCCCTATAGTATTGCACCGAAAGAACAACT
 * * * * *
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 AGTGTGCGCTGCATTTTCTGG---ACGGAT-----AAGCAAACCTGGCATC
 GCTGTGCGCTGCGTTTCTGG---TCAAAT-----A---ATACGACATTC
 AAGGTGCGCGATGATCTGGTGGCAGTCCAGTC-----AGGTTTATGCCGACC
 CGTGTTCCTATGCAGGTGTGGATGTACCTGGATTTACCAAAGAGAAAGGCGTTGATA
 CGTGTTCCTATGCAGGTGTGGATGTACCTGGATTTACCAAAGAGAAAGGCGTTGATA
 AGCGTACCAATGCTGGCTTGGCTATCTAATGACTTTAGCCAACATAATCAGTTGAACA
 * * * * *
 MCR-1.2 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1.8 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1.7 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1.5 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1.4 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1.6 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1.3 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1.10 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-1.9 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-2.2 ACGCCA--ATGGCAACCGATACCGTCTGACCC---ATGACCGGATCAGC-----CCGACA
 MCR-2 AAGCCA--ACTGCCAGCGATACTGTGCTGACGC---ATGATGCGATTACG-----CCAACA
 MCR-5 AAGCCTGTATGCAAACTCATGCTCTCGGGCACCGGTAAGTCACGATCACCTGTTTCACACC
 MCR-3 TGGCGTGTTCGACGAGAAAGCCGCTGATACTCGTTACTCACACGATAATATTTTCTCATCT
 MCR-3.2 TGGCGTGTTCGACGAGAAAGCCGCTGATACTCGTTACTCACACGATAATATTTTCTCATCT
 MCR-4 TGACTTGTGTGTCACAGCGAGCAGAACAGGGCGGCTTTTCCACGACAATTTGTTCGACAGT
 * * * * *

FIGURA 16 (continuación)

```

TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
TTATTAAAGCTGTTTGATGTCA---CCGCGGACAAA--GTCAAAG----ACCGCACCG
CTGCTTAAGCTGTTTGATGTCA---CAGCGGCAAG--GTCAAAG----ACCGCGCGG
TTGCTCGGGATGTTTCGACGTGAAAACCGCTGCCTACACGCCAGAGTTGGACCTTCTGG
GTATTGGGTATCTGGGACGTCAAAACATCAGTTTACGAAAAGCGTCTAGATATTTTCA
GTATTGGGTATCTGGGACGTCAAAACATCAGTTTACGAAAAGCGTCTAGATATTTTCA
TTGCTAGGACTTATGAATGTAAAAACACCGTCTATCAGAGCCAACTCGATATTTTTC
* * * * *
MCR-1.2 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1.8 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1.7 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1.5 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1.4 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1.6 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1.3 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1.10 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-1.9 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-2.2 CATTCAATCCGCTGA-----
MCR-2 CATTATCCAGTAA-----
MCR-5 CAA-CATGCAGAAAAGGACAACCACAATGA
MCR-3 GTC-AATGTCGTAATGTTCAATAA-----
MCR-3.2 GTC-AATGTCGTAATGTTCAATAA-----
MCR-4 CAC-CTTGCAG--GTATTAG-----

```

★

FIGURA 17

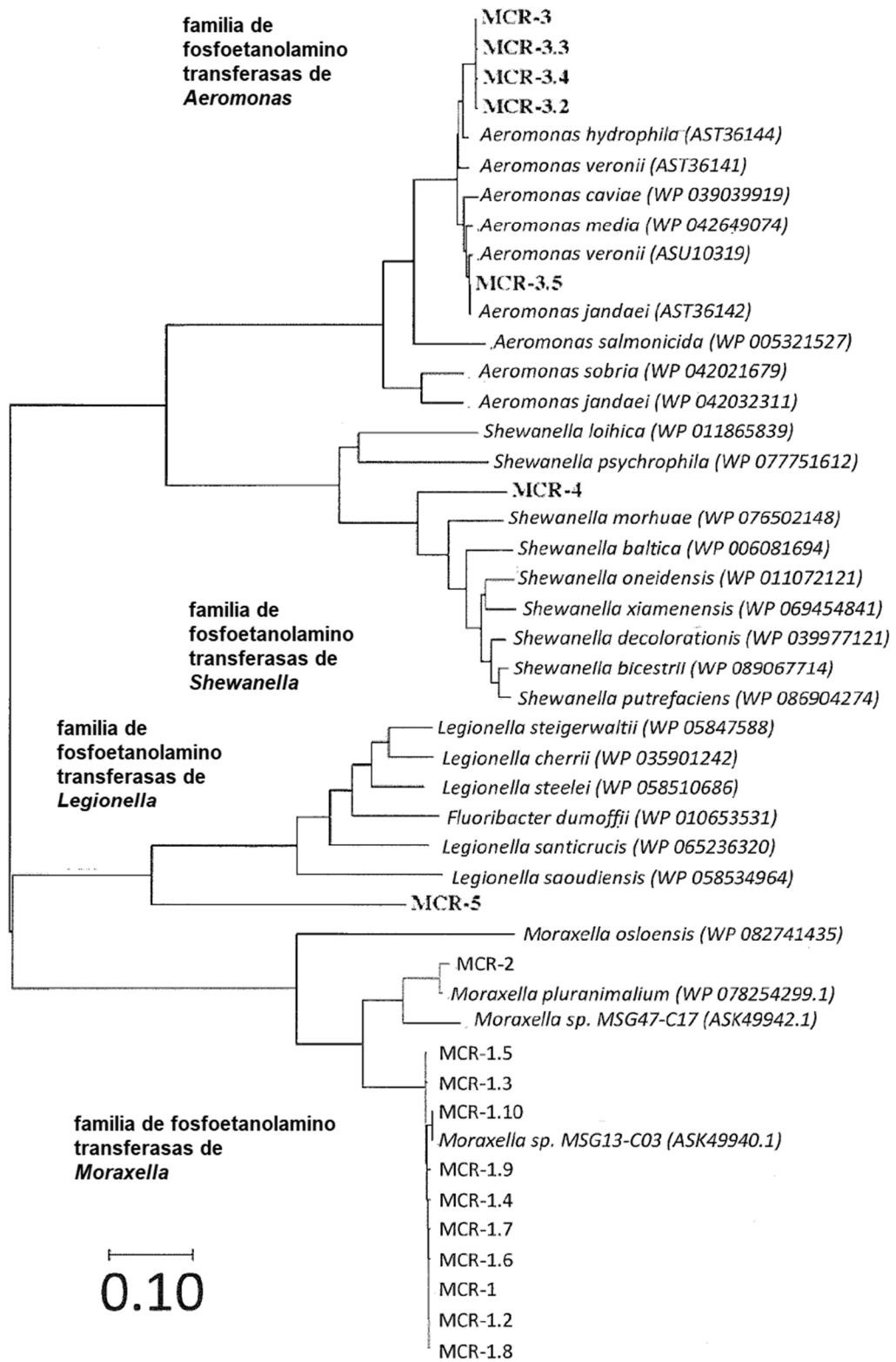


FIGURA 18

Cepa ^a	Resistencia a polimixina			Resistencia adquirida a β -lactamas ^c	^d PRR _{E. coli}
	MIC de colistina (mg/L)	Cromosoma/ Plásmido	Mecanismo ^b		
CNR 111J7	6	Cromosoma	Mutaciones PmrB (D14N, S71C y V83A)	<u>CTX-M-15</u> + TEM-1	0.25 ± 0.08
CNR20160039	4	Cromosoma	Desconocido	Ninguna	0.38 ± 0.02
CNR20160235	8	Cromosoma	Mutación MgrB (V8A)	TEM-1	0.19 ± 0.05
CNR 1728	8	Cromosoma	Mutación PmrB (G160E)	Ninguna	0.30 ± 0.08
41489	4	Plásmido	MCR-1	Ninguna	0.92 ± 0.29
<u>J53 + mcr-1</u>	8	Plásmido	MCR-1	Ninguna	2.43 ± 1.10
CNR20140385	4	Plásmido	MCR-1	OXA-48	1.88 ± 0.28
S08-056	4	Plásmido	MCR-1	OXA-48	3.70 ± 0.40
CNR 117G7	4	Plásmido	MCR-1	NDM-1	2.28 ± 0.59
CNR 121G9	4	Plásmido	MCR-1	OXA-48	0.71 ± 0.04
CNR 1745	4	Plásmido	MCR-1	<u>SHV-12</u>	2.08 ± 0.24
CNR 1604	4	Plásmido	MCR-1	<u>CTX-M-15</u>	3.48 ± 0.25
CNR 1667	4	Plásmido	MCR-1	OXA-48 + <u>KPC-28</u>	1.67 ± 0.80
CNR 1790	4	Plásmido	MCR-1	<u>TEM-15</u>	2.69 ± 0.63
CNR 1859	4	Plásmido	MCR-1	<u>CTX-M-15</u> + <u>SHV-12</u> + TEM-1	2.86 ± 0.37
CNR 1886	4	Plásmido	MCR-1	<u>CTX-M-1</u> + TEM-1	2.61 ± 0.30
4222	4	Plásmido	MCR-1	<u>CTX-M-2</u>	4.32 ± 0.51
4070	4	Plásmido	MCR-1	TEM-1B	1.65 ± 0.28
979	4	Plásmido	MCR-1	<u>CTX-M-2</u>	1.21 ± 0.14
1724	4	Plásmido	MCR-1	Ninguna	2.07 ± 0.37
<u>DH5α + pDM1-mcr-1</u>	4	Plásmido	MCR-1	Ninguna	2.82 ± 0.92

FIGURA 18 (continuación)

MC1000 + pDM1- <i>mcr-1</i> **	4	Plásmido	MCR-1	Ninguna	3·13 ± 0·33
6383	4	Plásmido	MCR-1.5	TEM-1B	2·85 ± 0·76
1670	4	Plásmido	MCR-1.5	CTX-M-2	0·92 ± 0·18
R12 F5	4	Plásmido	MCR-2	Ninguna	3·13 ± 1·05
DH5α + pDM1- <i>mcr-2</i> **	4	Plásmido	MCR-2	Ninguna	2·24 ± 0·51
MC1000 + pDM1- <i>mcr-2</i> **	4	Plásmido	MCR-2	Ninguna	1·80 ± 0·35
DH5α + pDM1- <i>mcr-3</i> **	4	Plásmido	MCR-3	Ninguna	2·62 ± 0·47
MC1000 + pDM1- <i>mcr-3</i> **	4	Plásmido	MCR-3	Ninguna	2·80 ± 0·15
DH5α + pDM1- <i>mcr-5</i> **	4	Plásmido	MCR-5	Ninguna	2·14 ± 0·04
MC1000 + pDM1- <i>mcr-5</i> *	4	Plásmido	MCR-5	Ninguna	3·12 ± 0·57
TOP 10 + <i>mcr-5</i>	8	Plásmido	MCR-5	Ninguna	1·59 ± 0·29
J53 + <i>mcr-5</i>	8	Plásmido	MCR-5	Ninguna	1·54 ± 0·36
J53	0·5	-	-	Ninguna	0·00 ± 0·00
TOP 10	0·25	-	-	Ninguna	0·00 ± 0·00
DH5α	0·5	-	-	Ninguna	0·00 ± 0·00
DH5α + pDM1- Empty	0·5	-	-	Ninguna	0·00 ± 0·00
MC1000 + pDM1-Empty	0·5	-	-	Ninguna	0·00 ± 0·00
1608071881	0·25	-	-	Ninguna	0·00 ± 0·00
1608072264	0·25	-	-	Ninguna	0·00 ± 0·00
1608073740	0·25	-	-	Ninguna	0·00 ± 0·00

FIGURA 18 (continuación)

1608070579	0.5	-	-	-	Ninguna	0.00 ± 0.00
1608073561	0.25	-	-	-	Ninguna	0.00 ± 0.00
1608073733	0.5	-	-	-	Ninguna	0.00 ± 0.00
1608073937	0.25	-	-	-	Ninguna	0.00 ± 0.00
1608079010	0.25	-	-	-	Ninguna	0.00 ± 0.00
1608079029	0.25	-	-	-	Ninguna	0.00 ± 0.00
1608079018	0.25	-	-	-	Ninguna	0.00 ± 0.00
1608075385	0.12	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608078198	0.25	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608073301	0.25	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608078105	0.25	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608073228	0.25	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608078635	0.25	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608078858	0.25	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608062671	0.25	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608064819	0.25	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
1608062559	0.12	-	-	-	TEM-1	0.00 ± 0.00
2E6	0.25	-	-	-	CTX-M-1	0.00 ± 0.00
2E7	0.25	-	-	-	CTX-M-3	0.00 ± 0.00
2E9	0.25	-	-	-	CTX-M-14	0.00 ± 0.00
2E10	0.25	-	-	-	CTX-M-14	0.00 ± 0.00
2H6	0.25	-	-	-	CTX-M-15	0.00 ± 0.00
2F2	0.25	-	-	-	CTX-M-15	0.00 ± 0.00
2F3	0.25	-	-	-	CTX-M-15	0.00 ± 0.00
LAN 10.48	0.25	-	-	-	SHV-2a	0.00 ± 0.00
LEC 11.8	0.5	-	-	-	SHV-12	0.00 ± 0.00
VER 9.39	0.25	-	-	-	TEM-3	0.00 ± 0.00
NEG 11.87	0.25	-	-	-	TEM-24	0.00 ± 0.00
1F1	0.25	-	-	-	KPC-2	0.00 ± 0.00
1A2	0.5	-	-	-	NDM-1 + OXA-1 + TEM-1	0.00 ± 0.00

FIGURA 18 (continuación)

1A6	0.25	-	-	NDM-4 + CTX-M-15 + OXA-1	0.00 ± 0.00
1A8	0.25	-	-	NDM-5 + CTX-M-15 + TEM-1	0.00 ± 0.00
1C2	0.5	-	-	VIM-1	0.00 ± 0.00
1D10	0.25	-	-	IMP-8 + SHV-12	0.00 ± 0.00
2A1	0.25	-	-	OXA-48 + CTX-M-15	0.00 ± 0.00
2C4	0.5	-	-	OXA-181	0.00 ± 0.00
2D5	0.25	-	-	OXA-204 + CMY-4 + CTX-M-15	0.00 ± 0.00
2D9	0.25	-	-	OXA-244	0.00 ± 0.00

FIGURA 19

Cepa ^a	Resistencia a polimixina		PRR _{E. coli} para colonias bacterianas de edad:				
	MIC de colistina (mg/L)	Cromosoma/ plásmido	Mecanismo ^b	24h	48h	1 semana	2 semanas
CNR 111J7	6	Cromosoma	Mutaciones PmrB (D14N, S71C y V83A)	0.25 ± 0.08	0.20 ± 0.06	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.10
CNR20160039	4	Cromosoma	Desconocido	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.08
CNR20160235	8	Cromosoma	Mutación MgrB (V8A)	0.19 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.18 ± 0.03	0.24 ± 0.09
CNR 1728	8	Cromosoma	Mutación PmrB (G160E)	0.30 ± 0.08	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.06	0.32 ± 0.09
41489	4	Plásmido	MCR-1	0.92 ± 0.29	0.89 ± 0.12	0.81 ± 0.13	0.83 ± 0.19
J53 + <i>mcr-1</i> [*]	8	Plásmido	MCR-1	2.43 ± 1.10	1.61 ± 0.90	1.89 ± 0.83	2.06 ± 0.52
CNR20140385	4	Plásmido	MCR-1	1.88 ± 0.28	1.72 ± 0.15	1.68 ± 0.32	1.55 ± 0.22
S08-056	4	Plásmido	MCR-1	3.70 ± 0.40	3.10 ± 0.52	3.01 ± 0.38	2.92 ± 0.61
CNR 117G7	4	Plásmido	MCR-1	2.28 ± 0.59	2.32 ± 0.32	2.23 ± 0.41	2.08 ± 0.14
CNR 121G9	4	Plásmido	MCR-1	0.71 ± 0.04	0.73 ± 0.12	0.81 ± 0.10	0.64 ± 0.08
CNR 1745	4	Plásmido	MCR-1	2.08 ± 0.24	1.92 ± 0.29	1.98 ± 0.27	1.87 ± 0.33
CNR 1604	4	Plásmido	MCR-1	3.48 ± 0.25	3.00 ± 0.52	3.17 ± 0.37	2.88 ± 0.90
CNR 1667	4	Plásmido	MCR-1	1.67 ± 0.80	1.28 ± 0.42	1.46 ± 0.63	1.32 ± 0.86
CNR 1790	4	Plásmido	MCR-1	2.69 ± 0.63	2.04 ± 0.47	2.13 ± 0.74	1.99 ± 0.58
CNR 1859	4	Plásmido	MCR-1	2.86 ± 0.37	2.73 ± 0.41	2.54 ± 0.23	2.06 ± 1.02
CNR 1886	4	Plásmido	MCR-1	2.61 ± 0.30	2.32 ± 0.48	2.31 ± 0.25	2.01 ± 0.67
4222	4	Plásmido	MCR-1	4.32 ± 0.51	4.17 ± 0.63	3.99 ± 0.47	3.71 ± 0.39
4070	4	Plásmido	MCR-1	1.65 ± 0.28	1.55 ± 0.31	1.54 ± 0.24	1.42 ± 0.38
979	4	Plásmido	MCR-1	1.21 ± 0.14	1.25 ± 0.23	1.05 ± 0.18	1.09 ± 0.36
1724	4	Plásmido	MCR-1	2.07 ± 0.37	2.00 ± 0.41	1.92 ± 0.32	1.85 ± 0.33

FIGURA 19 (continuación)

6383	4	Plásmido	MCR-1.5	2.85 ± 0.76	2.66 ± 0.63	2.65 ± 0.48	2.21 ± 0.77
1670	4	Plásmido	MCR-1.5	0.92 ± 0.18	1.06 ± 0.38	0.91 ± 0.15	0.99 ± 0.30
R12 F5	4	Plásmido	MCR-2	3.13 ± 1.05	2.23 ± 0.55	2.79 ± 0.89	2.13 ± 1.17
J53	0.5	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TOP 10	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DH5α	0.5	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608071881	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608072264	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608073740	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608070579	0.5	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608073561	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608073733	0.5	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608073937	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608079010	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608079029	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608079018	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608075385	0.12	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608078198	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608073301	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608078105	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608073228	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608078635	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608078858	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608062671	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1608064819	0.25	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

FIGURA 19 (continuación)

1608062559	0.12	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2E6	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2E7	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2E9	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2E10	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2H6	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2F2	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2F3	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LAN 10.48	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LEC 11.8	0.5	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
VER 9.39	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
NEG 11.87	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1F1	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1A2	0.5	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1A6	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1A8	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1C2	0.5	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1D10	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2A1	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2C4	0.5	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2D5	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2D9	0.25	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00