

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
24 de diciembre de 2020 (24.12.2020) WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/254711 A1

- (51) Clasificación internacional de patentes:
C12Q 1/10 (2006.01) G01N 33/84 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2020/070406
- (22) Fecha de presentación internacional:
22 de junio de 2020 (22.06.2020)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201930573 21 de junio de 2019 (21.06.2019) ES
- (71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Av de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Paseo de las Delicias s/n, Pabellón de Brasil, 41013 Sevilla (ES).
- (72) Inventores: **SMANI, Younes**; c/o Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n., 41013 Sevilla (ES). **RODRÍGUEZ VILLODRES, Ángel**; c/o Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n., 41013 Sevilla (ES). **LEPE JIMÉNEZ, José Antonio**; c/o Instituto de

Biomedicina de Sevilla (IBiS), Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n., 41013 Sevilla (ES). **PACHÓN DÍAZ, Jerónimo**; c/o Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot, s/n., 41013 Sevilla (ES).

- (74) Mandatario: **CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel** et al.; C/ SUERO DE QUIÑONES, 34-36, 28002 MADRID (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL,

(54) Title: KIT AND METHOD FOR RAPID DETECTION OF BACTERIA RESISTANT TO COMBINATIONS OF B-LACTAM ANTIBIOTIC WITH A B-LACTAMASE INHIBITOR, AND FOR RAPID DETECTION OF EXTENDED-SPECTRUM RESISTANCE TO B-LACTAMS IN CLINICAL ISOLATES

(54) Título: KIT Y MÉTODO DE DETECCIÓN RÁPIDA DE BACTERIAS RESISTENTES A LAS COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICO B-LACTÁMICO CON UN INHIBIDOR DE B-LACTAMASA, Y DE LA RESISTENCIA DE ESPECTRO EXTENDIDO A LOS B-LACTÁMICOS EN AISLADOS CLÍNICOS

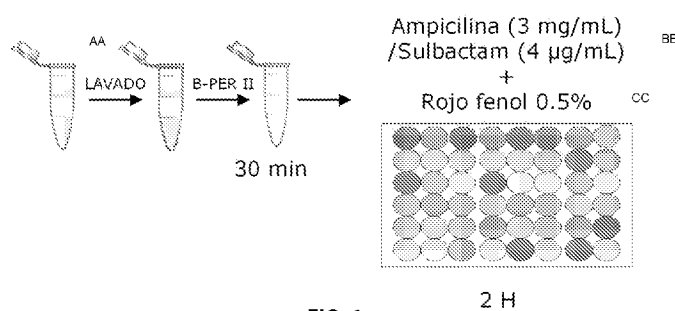


FIG. 1

AA Washing
BB Amp c lin / Sulbactam
CC Phenol red

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying bacterial isolates resistant to combinations of β -lactam antibiotic with β -lactamase inhibitors, able to hydrolyse the β -lactam ring of a combination of a β -lactam antibiotic with β -lactamase inhibitors (BL/IBL); to a method for determining the capacity to develop extended-spectrum resistance to β -lactams (ESRI); and to a kit.

(57) Resumen: Método de identificación de aislados bacterianos resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con inhibidores de β -lactamasa, capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de una combinación de un antibiótico β -lactámico con un inhibidores de β -lactamasa (BL/IBL), método para determinar la capacidad de desarrollo de resistencia de espectro extendido a los β -lactámicos (REEI), y kit.



ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

**KIT Y MÉTODO DE DETECCIÓN RÁPIDA DE BACTERIAS RESISTENTES A LAS
COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICO B-LACTÁMICO CON UN INHIBIDOR DE B-
LACTAMASA, Y DE LA RESISTENCIA DE ESPECTRO EXTENDIDO A LOS B-
LACTÁMICOS EN AISLADOS CLÍNICOS.**

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a kits y métodos para la detección de ausencia o presencia de β -lactamasa, tales como penicilinas, cefalosporinas o carbapenemas, en una muestra así como a un método la resistencia de espectro extendido a los β -lactámicos en aislados clínicos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La resistencia microbiana a los antibióticos (RMA) constituye un serio problema a nivel mundial (O'Neill, 2016; WHO, 2017). La RMA es un proceso natural que se ha observado desde el descubrimiento de los primeros antibióticos (Alós, 2015). El uso excesivo e indiscriminado de antibióticos, ha acelerado la aparición y propagación de la resistencia bacteriana a los antibióticos a nivel mundial. Como resultado, los tratamientos disponibles se vuelven ineficaces frente a estas bacterias resistentes. Se ha estimado que, de seguir así, el número de muertes por bacterias multirresistentes en el año 2050 llegará a ser de 10 millones de personas al año, superando así a las muertes por cáncer (O'Neill, 2016). En consecuencia, el desarrollo de nuevas estrategias para enfrentar este peligro inminente se ha convertido en una prioridad urgente para la OMS y muchos gobiernos. Estas estrategias incluyen regulaciones más estrictas sobre el uso de antibióticos, para minimizar la aparición de resistencia a los antibióticos, y la financiación de investigación para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos. Además, la detección y caracterización rápida de bacterias resistentes a antibióticos mediante el uso de técnicas fiables tiene una gran importancia tanto en el tratamiento de las infecciones como en el control de la propagación de estos aislados.

15

20

25

E. coli es uno de los patógenos más importantes en los seres humanos. Entre las bacterias gramnegativas, *E. coli* es la principal responsable de infecciones del torrente sanguíneo e infecciones del tracto urinario. Para el tratamiento de las infecciones causadas por *E. coli* se utilizan los antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasa (BL/IBL), como

30

ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam. Sin embargo, el uso excesivo e indiscriminado de esta familia de antibióticos está produciendo la aparición de cepas resistentes y la disminución de la eficacia de los tratamientos disponibles. Asimismo, la aplicación inadecuada de antibióticos puede dar la oportunidad a las bacterias de modular su propia patogenicidad y/o resistencia (Adamus-Bialek et al., 2019).

En la práctica clínica diaria, las muestras procedentes de pacientes con posibles infecciones intraabdominales y del torrente sanguíneo son inoculadas en frascos de hemocultivo, los cuales se incuban en un sistema automático que detecta el crecimiento bacteriano. En aquellos frascos que resulten con crecimientos positivos, se procede a realizar una identificación del microorganismo y un perfil de resistencia a diferentes antibióticos. Esta información le permitirá al clínico decidir qué tratamiento es el más adecuado. En la actualidad, se necesitan más de 24 h para llevar a cabo este proceso. Para optimizar este proceso, se requiere de un método rápido, sencillo y fácil de interpretar, que detecte bacterias resistentes a los BL/IBL (Burnham et al., 2017; Sommer et al., 2017).

Recientemente, con el objetivo de cubrir esta necesidad, varios grupos de investigación están desarrollando nuevos métodos para la detección de cepas *E. coli* resistentes a ampicilina (Lee et al., 2019; Pitruzzello et al., 2019). La implementación de estos nuevos métodos en la práctica clínica podría suponer un gran avance en la detección de variantes resistentes. Sin embargo, estas técnicas actualmente no son factibles debido a su alto coste y la necesidad de personal cualificado para desarrollarlas e interpretarlas.

Por ello, es necesario desarrollar un nuevo método capaz de detectar cepas de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, y en concreto de *E. coli*, resistentes a piperacilina/tazobactam (P/T) y cepas que pueden desarrollar una resistencia de espectro extendido a los BL/IBL (REEI) debido a una exposición ineficaz a los BL/IBL, mediante un test rápido, sencillo y barato.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig.1. Método de detección de resistencia de espectro extendido a los β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas (REEI).

Fig.2. Tiempo de detección en cepas resistentes a P/T y sensibles al mismo, pero con capacidad de desarrollar REEI. S: sensible, R: resistente, P/T: piperacilina/tazobactam.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Los inventores han desarrollado un método que solo necesita aproximadamente 10 min para detectar aislados resistentes, y un máximo de 2 h para identificar aislados que puedan desarrollar una REEI. Estos tiempos de detección son un gran avance si se comparan con las 24 h que se necesita actualmente. La detección temprana de estas resistencias, con resultados obtenidos durante el mismo día del crecimiento bacteriano, permitiría una mejor optimización en el uso de los antibióticos BL/IBL, la toma de decisión del tratamiento y el manejo del paciente. Su implementación en la práctica clínica sería viable, debido a su fácil preparación y ejecución, sin la necesidad de reactivos ni aparatos especiales, y con la ventaja de que la solución de ampicilina/sulbactam es bastante estable en el tiempo. Además la implementación del nuevo método en la práctica clínica no produciría un gran aumento de los costes totales del proceso.

20

El test desarrollado en este estudio es capaz, tanto de detectar resistencias, como de identificar un posible desarrollo de REEI por un uso inadecuado del antibiótico.

MÉTODO PARA DETECTAR RESISTENCIAS A INHIBIDORES DE B-LACTAMASAS

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a un método de identificación de aislados bacterianos resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa, capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de una combinación de un antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa (BL/IBL), de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende la detección de los protones que se desprenden del anillo β -lactámico.

30

Preferiblemente la combinación BL/IBL se selecciona de la lista que consiste en: ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam, o cualquiera e sus combinaciones.

Piperacilina/tazobactam es un antibiótico de amplio espectro recomendado para el tratamiento empírico de las infecciones graves, como sepsis o infección intraabdominal. Sin embargo, el

uso abusivo de este antimicrobiano está llevando a la aparición de cepas resistentes al mismo. Por tanto, aún más preferiblemente, la combinación BL/IBL es piperacilina/tazobactam.

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección se realiza en un hemocultivo o en un líquido corporal, preferiblemente un líquido corporal inoculado en frascos de hemocultivo.

En otra realización preferida la detección de los protones se realiza mediante un indicador de cambio de pH.

10 El método de la invención permite identificar aislados capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico del antibiótico, llevada a cabo por la enzima β -lactamasa. Para ello, se realizó un ensayo enzimático colorimétrico utilizando el rojo fenol. El rojo fenol es un indicador de pH que vira a tonalidades naranjas y amarillas cuando el medio se acidifica. Por lo tanto, la presencia de una enzima β -lactamasa, hidroliza el anillo β -lactámico del antibiótico, se desprenden protones que acidifican el medio, y se puede visualizar un cambio de color a tonalidades amarillas. Por el contrario, si no hay enzima, el medio se mantiene con el mismo
15 pH y no cambia de color (tonalidad rojo-rosa).

Por ejemplo, los métodos colorimétricos que permite detectar la hidrólisis del antibiótico mediante el **cambio de color** en el medio (de **rosa** a **amarillo**), como resultado de la **disminución del pH** tras la acción de la β -lactamasa.

20 Por tanto, en una realización preferible de este aspecto de la invención, el cambio de pH se mide mediante un método colorimétrico. Más preferiblemente, el método colorimétrico es un método enzimático con rojo fenol.

25 El tiempo que tarda en cambiar de color el medio va a indicar si el aislado clínico presenta resistencia a piperacilina/tazobactam (**≤ 10 minutos**) o posible adquisición de resistencia al mismo (entre **11 y 120 minutos**).

El método de detección se llevó a cabo tanto a las 6-8 horas como a las 24 horas.

30 La detección temprana de este mecanismo, en aislados de *E. coli* resistentes o potencialmente resistentes a piperacilina/tazobactam es fundamental, para poder establecer un **tratamiento antibiótico adecuado** de las infecciones graves, especialmente durante las primeras 24 horas, momento en el que el uso de piperacilina/tazobactam tiene especial

relevancia, evitando así un posible fracaso terapéutico por la presencia de bacterias resistentes.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los aislados bacterianos son del orden *Enterobacteriales*, preferiblemente de la familia *Enterobacteriaceae* y aún más preferiblemente de género *Escherichia*. Aún más preferiblemente son de la especie *Escherichia coli*.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los aislados bacterianos son del orden *Enterobacteriales*, preferiblemente de la familia *Enterobacteriaceae* y aún más preferiblemente de género *Klebsiella*. Más preferiblemente son de la especie que se selecciona de la lista que consiste en: *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella africana*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella grimontii*, *Klebsiella huaxiensis*, *Klebsiella kielensis*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella milletis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pasteurii*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella quasivariicola*, *Klebsiella senegalensis*, *Klebsiella spallanzanii*, *Klebsiella steroids*, *Klebsiella variicola* o cualquiera de sus combinaciones.

En los servicios de Microbiología, es frecuente observar un patrón de resistencia gradual y unidireccional a los BL/IBL en *E. coli*, que se extiende desde ampicilina/sulbactam hasta piperacilina/tazobactam, pasando por amoxicilina/clavulánico. De esta forma, un aislado de *E. coli* puede presentar diferentes fenotipos de resistencia: 1) RSS, resistente a ampicilina/sulbactam pero sensible a amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam, 2) RRS, resistente a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/clavulánico pero sensible a piperacilina/tazobactam, y 3) RRR, resistente a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam. Se ha demostrado la capacidad que tiene *E. coli* para adquirir resistencia a las tres combinaciones de antibióticos (RRR) a partir de aislados que presentan un bajo nivel de resistencia a los mismos (fenotipo RSS o RRS). Estos resultados han permitido describir un nuevo fenómeno en *E. coli*: el desarrollo de resistencia de espectro extendido a los BL/IBL (REEI).

La detección temprana de este mecanismo, en aislados de *E. coli* resistentes o potencialmente resistentes a piperacilina/tazobactam es fundamental, para poder establecer un **tratamiento antibiótico adecuado** de las infecciones graves, especialmente durante las primeras 24 horas, momento en el que el uso de piperacilina/tazobactam tiene especial relevancia, evitando así un posible fracaso terapéutico por la presencia de bacterias resistentes.

MÉTODO PARA DETECTAR RESISTENCIAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

La combinación de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasa (BL/IBL) representa la principal estrategia para combatir la resistencia bacteriana frente a estos antibióticos. El uso de estos antibióticos permite hacer frente a las infecciones urinarias, intraabdominales y del torrente sanguíneo provocadas por *Escherichia coli*. Sin embargo, el uso excesivo e indiscriminado de estos BL/IBL (ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam) ha producido la aparición de variantes resistentes. Actualmente, no existen métodos disponibles en la práctica clínica que identifiquen rápidamente aislados resistentes y/o que puedan desarrollar una posible resistencia a los BL/IBL, causando en muchas ocasiones el fracaso terapéutico. Por ello, el objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un método capaz de detectar cepas de *E. coli* resistentes a piperacilina/tazobactam y cepas que pueden a desarrollar una resistencia a las tres combinaciones de BL/IBL “resistencia de espectro extendido a los BL/IBL” (REEI). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la eficacia y sensibilidad del método de detección desarrollado, mostrando un gran potencial en su posible aplicación clínica, lo que provocaría una reducción en costes innecesarios, tratamientos inefectivos y el uso inadecuado de los BL/IBL.

En los servicios de Microbiología, es frecuente observar un patrón de resistencia gradual y unidireccional a los BL/IBL en *E. coli*, que se extiende desde ampicilina/sulbactam hasta piperacilina/tazobactam, pasando por amoxicilina/clavulánico. De esta forma, un aislado de *E. coli* puede presentar diferentes fenotipos de resistencia: 1) RSS, resistente a ampicilina/sulbactam pero sensible a amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam, 2) RRS, resistente a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/clavulánico pero sensible a piperacilina/tazobactam, y 3) RRR, resistente a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam. En un estudio realizado en el grupo de Enfermedades Infecciosas en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), se ha demostrado la capacidad que tiene *E. coli* para adquirir resistencia a las tres combinaciones de antibióticos (RRR) a partir de aislados que presentan un bajo nivel de resistencia a los mismos (fenotipo RSS o RRS). Estos resultados han permitido describir un nuevo fenómeno en *E. coli*: el desarrollo de REEI.

La relevancia clínica de este fenómeno hace que sea de especial importancia la identificación temprana de aislados clínicos tanto resistentes a piperacilina/tazobactam, en los que el tratamiento empírico con este antibiótico no sería apropiado, como aquellos sensibles a piperacilina/tazobactam, pero que puedan desarrollar una REEI, en los que el tratamiento con

piperacilina/tazobactam podría llevar a un posible fracaso terapéutico por adquisición de resistencia al mismo. Sin embargo, actualmente no se dispone de ningún método que pueda detectar rápidamente si un aislado clínico de *E. coli* es resistente a piperacilina/tazobactam y/o puede desarrollar una REEI.

5

1) la resistencia a piperacilina/tazobactam mediada por β -lactamasas conlleva también una resistencia a ampicilina/sulbactam y

2) el desarrollo de una REEI siempre comienza por una resistencia a ampicilina/sulbactam, lo que nos permite detectar hidrólisis del antibiótico, aunque el aislado sea sensible a piperacilina/tazobactam, evitando así falsos negativos.

10

Por tanto, un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método para determinar la capacidad de desarrollo de resistencia de espectro extendido a los β -lactámicos (REEI), de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende inducir un proceso de presión antibiótica en aquellos aislados que presenten un bajo nivel de resistencia a BL/IBL (RSS y RRS), identificados por el primer método de la invención.

15

Preferiblemente el segundo método de la invención comprende:

a) inocular concentraciones subinhibitorias de piperacilina/tazobactam (ratio 8:1), correspondientes a concentraciones una dilución por debajo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en los aislados que presenten un bajo nivel de resistencia a BL/IBL (RSS y RRS), identificados por el método según las reivindicaciones 1-10,

20

b) repetir el proceso hasta alcanzar la concentración de 256/32 mg/L de piperacilina/tazobactam, o hasta la concentración que no permitía el crecimiento bacteriano, y

c) cultivar los aislados clínicos presionados en cada una de las concentraciones de piperacilina/tazobactam para su determinación posterior.

25

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), también llamadas β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), son enzimas producidas por bacilos gramnegativos fundamentalmente enterobacterias, con más frecuencia por *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Son capaces de inactivar además de a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam. El primer aislamiento tuvo lugar en Alemania en 1983 a partir de una cepa de *K. Ozaenae* recibiendo el nombre de SHV-2. En España la

30

primera se describió en 1988. Las BLEE «clásicas» derivan de las β -lactamasas de amplio espectro del grupo 2b (TEM-1, TEM-2, y SHV-1) de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros; poseen actividad penicilinasas y pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico.

5 *KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCION*

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un Kit o dispositivo para identificar aislados bacterianos resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende medios para la detección de los protones que se desprenden del anillo β -lactámico.

Preferiblemente el o dispositivo de la invención comprende medios para identificar el pH del medio, y aún más preferiblemente son medios colorimétricos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención los reactivos colorimétricos se seleccionan de entre rojo fenol, azul de bromotimol y más preferiblemente es rojo fenol.

15

AUTOMATIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE LA INVENCION IMPLEMENTÁNDOLO EN UN PROGRAMA DE ORDENADOR

Otro aspecto de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones para realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

20

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa y que se haya adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de los procesos correspondientes.

25

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora

transmisible; por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Los programas
5 de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Otros aspectos de la invención se refieren al medio de almacenamiento legible y a la señal transmisible que comprende instrucciones de programa necesarias para la ejecución del método de invención por un ordenador.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no
10 pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15 **TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS**

SEQ ID NO: 1

<223> blaTEM Forward

SEQ ID NO: 2

<223> blaTEM Reverse

20 SEQ ID NO: 3

<223> blaOXA-1 Forward

SEQ ID NO: 4

<223> blaOXA-1 Reverse

SEQ ID NO: 5

25 <223> blaSHV Forward

SEQ ID NO: 6

<223> blaSHV Reverse

EJEMPLOS DE LA INVENCION

MATERIALES Y MÉTODOS

5 Aislados clínicos

Para la realización de este estudio, se utilizaron 115 aislados clínicos de *Escherichia coli* obtenidos a partir de muestras de sangre y muestras intraabdominales de pacientes con bacteriemia o infección intraabdominal ingresados en el Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla (**Tabla 1-3**). Para todos los experimentos se utilizó como referencia la cepa de
10 colección *E. coli* ATCC 25922.

Ensayos de sensibilidad antimicrobiana

Previamente a este trabajo, se determinaron los perfiles de resistencia a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam mediante el método de microdilución en
15 caldo a través del sistema semi-automatizado MicroScan Walk Away NM44 panels (Beckman Coulter, Inc., USA) (**Tabla 1-3**). La selección de los aislados clínicos de *E. coli* para este estudio se realizó teniendo en cuenta estos perfiles de resistencia a los BL/IBL (SSS, RSS, RRS, RRR). Posteriormente se confirmó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de estos aislados a piperacilina/tazobactam mediante el método estándar de microdilución en caldo
20 Mueller Hinton Broth (MHB) (Sigma-Aldrich, Spain), recomendado por el *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) (CLSI 2015, 2019). La combinación piperacilina/tazobactam se utilizó en un ratio de 8:1 en lugar de una concentración de tazobactam fija a 4 mg/L (como recomienda el CLSI). Esta modificación se ha hecho en base a que este cociente permite obtener una relación entre piperacilina y tazobactam más similar
25 a la alcanzada en el cuerpo humano tras una dosis de piperacilina/tazobactam. Para realizar las diluciones se utilizaron placas Microtiter con pocillos en fondo "U" y se realizaron diluciones seriadas con concentraciones de piperacilina/tazobactam comprendidas entre 0,125/0,015-512/64 mg/L. Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de suspensiones a 0,5 en la escala de McFarland (1×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL), y realizando
30 diluciones hasta obtener una concentración final en la placa de 5×10^5 UFC/mL. Posteriormente, la placa se incubó a 37°C durante 18-20 horas y se procedió a la lectura de

la misma. La sensibilidad de los aislados clínicos se realizó en los aislados originales (aisladas del paciente y sin haber sido sometidas a presión antibiótica con piperacilina/tazobactam) y, posteriormente, en estos mismos aislados presionados con concentraciones crecientes de piperacilina/tazobactam (ver sección **Presión Antibiótica**).

5

Método de detección de resistencia de espectro extendido a los β -lactámicos en combinación con inhibidores de β -lactamasas (REEI)

Se realizó un diseño basado en un ensayo colorimétrico. El fundamento de este test está basado en la capacidad de poner de manifiesto la hidrólisis del anillo β -lactámico por parte de la betalactamasa. Esta hidrólisis produce la acidificación del medio, la cual puede ser detectada mediante la adición de un indicador de pH, como el rojo fenol.

Para el desarrollo del método de detección, se inocularon los aislados clínicos a testar en diferentes frascos de hemocultivos (BACTECTM Standard/10Aerobic/F y BACTECTM Lytic/10Anerobic/F, Becton Dickinson, Estados Unidos) a una concentración de 1×10^6 UFC/mL, y se incubaron a 37°C con agitación a 180 rpm durante 6-8 y 24 horas. Transcurridos estos tiempos, se procedió al procesamiento de las muestras y la validación del método de detección. Para ello, se cogieron 2 mL de suspensión bacteriana crecida en el hemocultivo, se pasaron a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 mL de suero fisiológico. De nuevo, la muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Después, el pellet se resuspendió en 100 μ L de buffer de lisis B-PER II (*Bacterial Protein Extraction Reagent*, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se procedió a centrifugar nuevamente la muestra a 10.000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, en una placa multipocillo de fondo plano, se añadieron 30 μ L del sobrenadante a una solución de 195 μ L compuesta por 190 μ L de ampicilina (3 mg/mL) + sulbactam (4 μ g/mL) + 5 μ L de rojo fenol al 0,5% v/v. Finalmente, la placa se incubó a 37°C durante 120 minutos, con lectura cada 10 minutos (**Figura 1**). Para interpretar los resultados, se consideró como resultado positivo aquellas muestras con el mínimo cambio de color con respecto al control negativo.

Cabe destacar que, aunque el test está diseñado para detectar tanto la resistencia a piperacilina/tazobactam como el posible desarrollo de una REEI, el antibiótico utilizado en el mismo es ampicilina/sulbactam en lugar de piperacilina/tazobactam. Esto es debido a dos

motivos: 1) la resistencia a piperacilina/tazobactam mediada por β -lactamasas conlleva también una resistencia a ampicilina/sulbactam y 2) el desarrollo de una REEI siempre comienza por una resistencia a ampicilina/sulbactam, lo que nos permite detectar hidrólisis del antibiótico, aunque el aislado sea sensible a piperacilina/tazobactam, evitando así falsos negativos.

Presión antibiótica

Con el objetivo de determinar la capacidad de desarrollo de REEI en aquellos aislados con bajo nivel de resistencia a BL/IBL (RSS y RRS) en los que el test ha resultado positivo, se procedió a aplicar el método de presión antibiótica. Para iniciar el proceso de presión antibiótica y asegurar un crecimiento adecuado, se utilizaron las concentraciones sub-inhedoras de piperacilina/tazobactam (ratio 8:1), correspondientes a concentraciones una dilución por debajo de la CMI. Para ello, se inocularon los diferentes aislados en tubos Falcon, que contenían 10 mL de MHB (Sigma-Aldrich, España) y piperacilina/tazobactam a la concentración adecuada, con una suspensión bacteriana ajustada a 1×10^5 UFC/mL. Posteriormente se incubaron a 37°C con agitación a 180 rpm durante 18-20 h. Transcurrido este tiempo, en los cultivos con crecimiento positivo se volvió a repetir la inoculación con 1×10^5 UFC/mL de suspensión bacteriana en medio con una concentración 2 veces mayor de P/T. Este proceso se repitió hasta alcanzar la concentración de 256/32 mg/L de P/T, o hasta la concentración que no permitía el crecimiento bacteriano. En cada una de las concentraciones de P/T, los aislados clínicos presionados se cultivaron en placas de agar sangre (Thermo Fisher Diagnostics, España) a 37°C para realizar determinaciones posteriores (p. ej.: CMIs).

Extracción de ADN, PCR, purificación, secuenciación y ensamblaje

Para determinar posibles mecanismos de resistencia antibiótica presentes en los aislados bacterianos de este estudio, se determinó la presencia de los genes que codifican las β -lactamasas más comunes (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{SHV}) en los aislados analizados. Para ello, los genes codificantes de estas β -lactamasas fueron caracterizados utilizando cebadores específicos para *bla*_{TEM} (Forward: 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG, Reverse: 5'-CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA), *bla*_{OXA-1} (Forward: 5'-GGA TAA AAC CCC CAA AGG AA-3', Reverse: 5'-TGC ACC AGT TTT CCC ATA CA-3'), y *bla*_{SHV} (Forward: 5'-GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC, Reverse: 5'-TTA GCG TTG CCA GTG CTC).

En primer lugar, se realizó la extracción de ADN bacteriano con una suspensión de varias colonias frescas de la bacteria en un tubo Eppendorf en agua Milli-Q a 96°C durante 10 minutos. A continuación, se preparó la reacción de PCR que contenía 10 µL de tampón de PCR, 2,5 µL de cada cebador, 0,5 µL de polimerasa MyTaq y 29,5 µL de agua Milli-Q. Se añadieron 5 µL del sobrenadante del ADN extraído a la reacción de PCR, con un volumen final de 50 µL. Se utilizó un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) con el siguiente programa para la amplificación de los respectivos genes: un ciclo de desnaturalización de 4 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de amplificación de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C para *bla_{TEM}*, 46°C para *bla_{OXA-1}* y 62°C para *bla_{SHV}*, y 1 minuto y 15 segundos a 72°C, y un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72°C. Se realizó una comprobación de la amplificación del gen mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) y la visualización de la banda generada con un tamaño correspondiente al gen de estudio. Para la secuenciación del gen, se purificaron los productos de PCR utilizando E.Z.N.A. Gel extraction kit 02500-02 (OMEGA bio.tek, Estados Unidos). Las secuencias se analizaron en el servicio de genómica y secuenciación del Instituto de Biomedicina de Sevilla equipado con el secuenciador Sanger ABI3500 Genetic 121 Analyzer (Applied Biosystems, Foster, VA, Estados Unidos). Las secuencias se analizaron utilizando el software SnapGene® Viewer 2.7.2 y los servicios de Internet de BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

20

Validación del método de detección

Los parámetros estadísticos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron utilizados en la determinación de la validez del método de detección desarrollado y puesto a punto en este trabajo.

25 La sensibilidad se define como: Verdaderos Positivos / (Verdaderos Positivos + Falsos Negativos).

La especificidad se define como: Verdaderos Negativos / (Verdaderos Negativos + Falsos Positivos)

El valor predictivo positivo (VPP) se define como: Verdaderos Positivos / (Verdaderos Positivos + Falsos Positivos)

30

El valor predictivo negativo (VPN) se define como: Verdaderos Negativos / (Verdaderos Negativos + Falsos Negativos)

RESULTADOS

5 Sensibilidad antimicrobiana en los aislados clínicos de *Escherichia coli*

Los perfiles de resistencia de los aislados clínicos que se han utilizado en este estudio fueron previamente analizados (**Tabla 1-3**). Estos resultados permitieron seleccionar 115 *E. coli* con diferentes perfiles de resistencia para desarrollar y validar el método de detección de estudio. La evaluación de la sensibilidad a piperacilina/tazobactam por el método de microdilución en caldo, confirmó el perfil de resistencia de la mayoría de aislados clínicos de *E. coli* a este antibiótico. Sesenta y siete aislados de *E. coli* (58,3%) mostraron sensibilidad a piperacilina/tazobactam, según los puntos de corte establecidos por el CLSI (CLSI, 2019). Por el contrario, 41 aislados de *E. coli* (35,7%) presentaron resistencia a piperacilina/tazobactam, con CMI ≥ 128 mg/L. El resto de aislados (6,1%) presentaron un perfil intermedio. Aunque en la mayoría de los casos los resultados obtenidos por E-test y/o Microscan, en el servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, y microdilución en caldo, en el Instituto de Biomedicina de Sevilla, fueron los mismos, se observaron algunas excepciones que a continuación se van a detallar. C2-169 con un perfil de resistencia RRR tuvo una CMI de 64 mg/L (**Tabla 1**). Las cepas C1-8 y C1-102 con una CMI de 4 mg/L tenían un perfil RRR (**Tabla 2**). Finalmente, las cepas C1-136 (RRS) y C1-166 (RSS) con una CMI >512 mg/L, y C1-189 (RSS) con una CMI de 128 mg/L (**Tabla 3**). En todos los aislados con resultados discordantes entre ambos métodos, se realizaron réplicas biológicas para confirmar los valores de CMI, obteniendo los mismos resultados. En el primer caso, la cepa C2-169 muestra una CMI próxima al punto de corte, lo que podría explicar su perfil intermedio-resistente (CLSI, 2019). En el resto de cepas, las diferencias se podrían deber a problemas técnicos en el desarrollo de E-test.

Tabla 1. Aislados clínicos de *Escherichia coli* con resultado negativo para el test de detección (N=24)

Aislado	Origen	Perfil de resistencia*	CMI (mg/L)	Mecanismo de resistencia	Test (6-8h)	Tiempo (min)	Test (24 h)	Tiempo (min)	Presión	Nueva CMI (mg/L)
C1-74	Sangre	RRS	16	NEG	-	>120	-	>120	-	32
C1-83	Sangre	RRS	8	NEG	-	>120	-	>120	-	8
C1-90	Sangre	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C1-95	Sangre	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	8
C1-97	Sangre	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	16
C1-100	Sangre	SSS	2-4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-110	Sangre	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-111	Sangre	SSS	2-4	NEG	-	>120	-	>120	-	16
C1-128	Sangre	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	8
C1-138	Sangre	RSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-144	Sangre	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-146	Sangre	SSS	2-4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-152	Sangre	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-155	Sangre	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C1-157	Sangre	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C1-168	Sangre	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4

C1-169	Sangre	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C1-172	Sangre	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C1-177	Sangre	SSS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C2-4	Bilis	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2
C2-8	Bilis	SSS	8	NEG	-	>120	-	>120	-	8
C2-12	Bilis	RRS	4	NEG	-	>120	-	>120	-	4
C2-169	Bilis	RRR (64)	64	NEG	-	>120	-	>120	-	64
ATCC25922	ATCC	SSS	2	NEG	-	>120	-	>120	-	2

* SSS: Sensible a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam

RSS: Resistente a ampicilina/sulbactam y sensible a amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam

RRS: Resistente a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/clavulánico sensible a piperacilina/tazobactam

RRR: Resistente a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam

- Resultado negativo (test de detección o presión)

+Resultado positivo (test de detección o presión)

NEG: resultado negativo en relación a los mecanismos de resistencia estudiados (TEM, OXA-1, SHV)

CMI: concentración mínima inhibitoria

Tabla 2. Aislados clínicos de *Escherichia coli* con resultado positivo para el test de detección, sensibles a piperacilina/tazobactam y que desarrollan resistencia de espectro extendido a los β-lactámicos con inhibidores de β-lactamasas (N=47).

Aislado	Origen	Perfil de resistencia*	CMI (mg/L)	Mecanismo de resistencia	Test (6-8 h)	Tiempo (min)	Test (24 h)	Tiempo (min)	Presión	Nueva CMI (mg/L)
C1-8	Sangre	RRR	4	NEG	+	25	+	60	+	256
C1-31	Sangre	RRS	8	TEM-40/SHV	+	25	+	60	+	64
C1-38	Sangre	RRS	16	TEM-35	+	1	+	1	+	256
C1-48	Sangre	RRS	4	TEM-1	+	20	+	30	+	128
C1-65	Sangre	RRS	8	TEM-1/SHV	+	60	+	60	+	512
C1-72	Sangre	RRS	16	TEM-1	+	30	+	60	+	512
C1-81	Sangre	RRS	16	TEM-30	+	2	+	1	+	512
C1-82	Sangre	RRS	32	TEM-1	+	10	+	10	+	512
C1-91	Sangre	RSS	1	NEG	+	40	+	20	+	256
C1-93	Sangre	RSS	2	SHV	+	20	+	10	+	512
C1-94	Sangre	RRS	32	TEM-1	+	15	+	10	+	256
C1-99	Sangre	RSS	8	TEM-1v/SHV	+	40	+	30	+	>512
C1-102	Sangre	RRR	4	TEM	+	1	+	2	+	32
C1-103	Sangre	RSS	8	TEM	+	40	+	100	+	512
C1-106	Sangre	RSS	8	TEM-1	+	40	+	25	+	512

C1-108	Sangre	RSS	2	TEM	+	40	+	30	+	512
C1-118	Sangre	RRS	16	NEG	+	30	+	10	+	256
C1-120	Sangre	RSS	8	TEM-1	+	40	+	20	+	>512
C1-121	Sangre	RSS	8	TEM-1v/SHV	+	30	+	30	+	256
C1-126	Sangre	RSS	8	TEM-1	+	30	+	30	+	512
C1-129	Sangre	RSS	16	TEM	+	40	+	25	+	256
C1-130	Sangre	RSS	8	TEM-1v	+	40	+	25	+	256
C1-137	Sangre	RSS	8	TEM-1	+	40	+	25	+	>512
C1-139	Sangre	RSS	8	TEM-1	+	30	+	120	+	>512
C1-141	Sangre	RSS	4	TEM-1/SHV	+	30	+	10	+	>512
C1-142	Sangre	RRS	4	TEM-135/SHV	+	10	+	10	+	512
C1-143	Sangre	RSS	8	TEM-1	+	30	+	60	+	>512
C1-153	Sangre	RSS	8	TEM-1/SHV	+	50	+	90	+	>512
C1-159	Sangre	RSS	2	TEM-1	+	100	+	30	+	512
C1-160	Sangre	RSS	4	TEM-1	+	50	+	60	+	512
C1-161	Sangre	RSS	16	TEM-1	+	100	+	60	+	>512
C1-162	Sangre	RSS	4	NEG	+	30	+	30	+	512
C1-164	Sangre	RSS	8	TEM-1v	+	30	+	30	+	512
C1-170	Sangre	RSS	4	TEM-1	+	30	+	60	+	>512

C1-171	Sangre	RSS	8	NEG	-	>120	+	40	+	512
C1-174	Sangre	SSS	2	TEM	+	>120	+	120	+	>512
C1-175	Sangre	RSS	16	TEM-1	+	30	+	60	+	512
C1-183	Sangre	RSS	8	TEM-1	+	30	+	40	+	512
C1-187	Sangre	RSS	2	TEM-1	+	100	+	40	+	>256
C1-190	Sangre	RSS	16	SHV	-	>120	+	120	+	512
C1-191	Sangre	RSS	8	TEM-1	+	60	+	100	+	256
C1-306	Sangre	RSS	16	TEM-1/SHV	+	30	+	30	+	128
C2-14	Bilis	RRS	8	TEM-1	+	10	+	10	+	512
C2-47	Absceso intraabdominal	RSS	8	TEM-1	+	20	+	30	+	512
C2-49	Líquido peritoneal	RSS	8	TEM-1	+	15	+	30	+	512
C2-54	Intraabdominal	RRS	8	TEM-1	+	15	+	30	+	256
PT3	Sangre	RSS	8	TEM-1/SHV	+	30	+	50	+	256 (PT4)

* SSS: Sensible a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam

RSS: Resistente a ampicilina/sulbactam sensible a amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam

RRS: Resistente a ampicilina/sulbactam amoxicilina/clavulánico sensible a piperacilina/tazobactam

RRR: Resistente a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico piperacilina/tazobactam

- Resultado negativo (test de detección o presión)
- + Resultado positivo (test de detección o presión)

NEG: resultado negativo en relación a los mecanismos de resistencia estudiados (TEM, OXA-1, SHV)

CMI: concentración mínima inhibitoria

Tabla 3. Aislados clínicos de *Escherichia coli* que son positivos para el test de detección, resistentes a piperacilina/tazobactam (N=45)

Aislado	Origen	Perfil de resistencia*	CMI (mg/L)	Mecanismo de resistencia	Test (6-8 h)	Tiempo (min)	Test (24 h)	Tiempo (min)
C1-23	Sangre	RRR	>256	TEM-1	+	2	+	10
C1-109	Sangre	RRR	>256	SHV	+	2	+	2
C1-116	Sangre	RRR	256	TEM-1v	+	5	+	4
C1-136	Sangre	RRS	>512	TEM	+	20	+	25
C1-166	Sangre	RSS	>512	TEM-1	+	100	+	30
C1-189	Sangre	RSS	128	TEM	+	10	+	10
C1-239	Sangre	RRR	>256	TEM-1	+	2	+	2
C1-436	Sangre	RRR	>256	TEM-1	+	3	+	3
C2-23	Bilis	RRR	>256	TEM-1	+	10	+	10
C2-45	Líquido peritoneal	RRR	256	TEM-1/SHV	+	10	+	60
C2-48	Absceso intraabdominal	RRR	>256	TEM-1/SHV	+	2	+	10
C2-57	Bilis	RRR	>256	NEG	+	2	+	10
C2-72	Absceso intraabdominal	RRR	>256	TEM-1	+	20	+	4
C2-74	Líquido peritoneal	RRR	256	TEM	+	5	+	3
C2-82	Absceso hepático	RRR	>256	TEM-1/SHV	+	3	+	3
C2-90	Líquido peritoneal	RRR	256	TEM-1	+	4	+	2

C2-95	Líquido peritoneal	RRR	64	TEM-1/SHV	+	15	+	15
C2-103	Líquido peritoneal	RRR	256	TEM-1	+	2	+	3
C2-106	Líquido peritoneal	RRR	128	OXA-1/SHV	+	30	+	25
C2-113	Absceso intraabdominal	RRR	256	TEM-1	+	2	+	3
C2-116	Absceso intraabdominal	RRR	256	TEM-1	+	2	+	3
C2-117	Líquido peritoneal	RRR	128	TEM-12	+	5	+	3
C2-136	Líquido peritoneal	RRR	128	TEM-1/SHV	+	5	+	1
C2-146	Líquido peritoneal	RRR	>256	TEM-1	+	1	+	1
C2-147	Absceso intraabdominal	RRR	>256	TEM-1	+	3	+	1
PT4	Sangre	RRR	256	TEM-1/SHV	+	10	+	15
PTR1	Sangre	RRR	64	OXA-1	+	10	+	5
PTR2	Sangre	RRR	256	TEM-1	+	10	+	1
PTR3	Sangre	RRR	256	NEG	+	10	+	1
PTR4	Sangre	RRR	>256	NEG	+	3	+	1
PTR5	Sangre	RRR	>256	TEM-1	+	3	+	1
PTR7	Sangre	RRR	256	SHV	+	15	+	1
PTR8	Sangre	RRR	128	OXA-1	+	30	+	2
PTR9	Sangre	RRR	128	TEM-1/OXA-1	+	3	+	5
PTR10	Sangre	RRR	>256	SHV	+	1	+	1

PTR11	Sangre	RRR	128	TEM-1	+	3	+	1
PTR12	Sangre	RRR	256	NEG	+	3	+	1
PTR13	Sangre	RRR	256	TEM-1	+	3	+	10
PTR14	Sangre	RRR	32	SHV	+	50	+	40
PTR15	Sangre	RRR	128	OXA-1	+	10	+	10
PTR16	Sangre	RRR	128	TEM-1	+	15	+	15
PTR17	Sangre	RRR	>256	TEM-1/OXA-1	+	10	+	3
PTR18	Sangre	RRR	128	TEM-1	+	10	+	10
PTR19	Sangre	RRR	64	OXA-1	+	10	+	10
PTR20	Sangre	RRR	>256	TEM/SHV	+	10	+	3

RSS: Resistente a ampicilina/sulbactam y sensible a amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam

RRS: Resistente a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/clavulánico y sensible a piperacilina/tazobactam

RRR: Resistente a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam

NEG: resultado negativo en relación a los mecanismos de resistencia estudiados (TEM, OXA-1, SHV)

CMI: concentración mínima inhibitoria

Método de detección de resistencia de espectro extendido a los β -lactámicos en combinación con inhibidores de β -lactamasas (REEI)

La principal finalidad del método de detección de REEI es la identificación de aislados de *E. coli* capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico del antibiótico, llevada a cabo por la enzima β -lactamasa. Para ello, se realizó un ensayo enzimático colorimétrico utilizando el rojo fenol. El rojo fenol es un indicador de pH que vira a tonalidades naranjas y amarillas cuando el medio se acidifica. Por lo tanto, la presencia de una enzima β -lactamasa, hidroliza el anillo β -lactámico del antibiótico, se desprenden protones que acidifican el medio, y se puede visualizar un cambio de color a tonalidades amarillas. Por el contrario, si no hay enzima, el medio se mantiene con el mismo pH y no cambia de color (tonalidad rojo-rosa).

El método de detección se llevó a cabo tanto a las 6-8 horas como a las 24 horas. Se eligieron estos tiempos con la finalidad de comprobar su eficacia en el lapso de tiempo en el que un hemocultivo de un paciente con bacteriemia por *E. coli* puede resultar positivo, lo que permite una mayor relevancia en la futura aplicación clínica. En las **Tablas 1-3** se pueden observar los resultados de todos los aislados clínicos en los dos tiempos de medida. Las tablas agrupan de manera muy precisa las cepas de *E. coli* en base a los resultados del método de detección de REEI. La **Tabla 1** muestra los aislados con resultados negativos para el test en ambos tiempos. Estos resultados son consistentes con los resultados anteriores, ya que estos aislados son sensibles a piperacilina/tazobactam. En estos aislados no se ha detectado la presencia de las β -lactamasas (TEM, OXA-1 o SHV) que confieren resistencia a piperacilina/tazobactam, por lo que no se hidroliza el anillo β -lactámico durante el método de detección y el color no vira de rosa a tonalidades naranjas-amarillas. Por el contrario, los aislados clínicos de la **Tabla 2 y 3** mostraron resultados positivos para el ensayo. En la **Tabla 2** los aislados son sensibles a piperacilina/tazobactam pero presentan un fenotipo de bajo nivel de resistencia a BL/IBL (RSS o RRS) y con la presencia de TEM, OXA-1 o SHV, excepto para las cepas C1-8, C1-91, C1-93, C1-118, C1-162 y C1-171. Este comportamiento podría traducirse en el desarrollo de una REEI. En la **Tabla 3** los aislados tienen perfil resistente y las enzimas β -lactamasas (TEM y SHV) están presentes, excepto en las cepas C2-57, PTR3, PTR4 y PTR12. Estos resultados nos indican que este método permite identificar y distinguir aislados con o sin resistencia a piperacilina/tazobactam (también a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/clavulánico).

Entre los dos grupos con resultados positivos para el test (**Tabla 2 y 3**) se observaron diferencias en los tiempos de positividad del test o cambio de color. Los aislados sensibles a piperacilina/tazobactam, pero capaces de desarrollar una REEI (**Tabla 2**) tuvieron un tiempo de detección por encima de los 10 minutos, mientras que en los
5 aislados resistentes a piperacilina/tazobactam (**Tabla 3**) este tiempo de positividad fue mayoritariamente en los primeros 10 minutos (**Figura 2**).

Capacidad de desarrollar REEI en aislados clínicos de *Escherichia coli* sensibles a piperacilina/tazobactamP

Los aislados clínicos sensibles a piperacilina/tazobactam (**Tabla 1-2**), fueron
10 presionados a concentraciones crecientes de piperacilina/tazobactam (hasta 256/32 mg/L) para determinar su capacidad de desarrollar una REEI. De esta manera, se ha comprobado la eficacia del método con respecto a las cepas sensibles con un resultado positivo en el test de detección.

En la **Tabla 1** se muestran los 23 aislados clínicos que no adquirieron resistencia al ser
15 presionados con piperacilina/tazobactam y cuyo resultado del test fue negativo. Las CMI's originales y obtenidas después de presionar con piperacilina/tazobactam no fueron significativamente diferentes. En la **Tabla 2** se muestra los 47 aislados clínicos que desarrollaron una REEI al ser presionados con piperacilina/tazobactam. En este caso, las nuevas CMI's aumentaron entre 8-256 veces con respecto a la CMI original,
20 con resultados >512 mg/L (a excepción de C1-102 y C1-31). Los aislados resistentes no fueron presionados (**Tabla 3**). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este apartado afianzan la validez del método de detección, ya que además de identificar resistencia a piperacilina/tazobactam, puede detectar posible desarrollo de REEI.

25 Mecanismos de resistencia a BL/IBL

Uno de los principales mecanismos relacionados con la resistencia a los BL/IBL es la producción de β -lactamasas. Entre estas enzimas, se encuentran especialmente las de tipo TEM (gen *bla*_{TEM}), pero también se pueden observar las de tipo OXA-1 (gen *bla*_{OXA-1}) y SHV (gen *bla*_{SHV}). Por ello, en todas las cepas de estudio se comprobó mediante
30 PCR específica si contenían o no estos genes (**Tabla 1-3**). Los productos de PCR (o amplificaciones) que fueron positivas, fueron secuenciadas para determinar específicamente el tipo de enzima (p. ej.: TEM-1). Los aislados que presentaron algún

mecanismo de resistencia, mostraron concordancia con los resultados obtenidos en todos los ensayos anteriores (CMI, test de detección, presión adquirida). En las cepas sensibles (**Tabla 1**) no se detectó la presencia de ninguna de las β -lactamasas de estudio. Por ello, estas cepas son sensibles a piperacilina/tazobactam a además no pueden desarrollar una REEI. En el resto de cepas sí que se observó la existencia de una o varias β -lactamasas (**Tabla 2 y 3**). Del total de cepas analizadas en las que se detectó alguna betalactamasa, el 86,7% presentaba betalactamasas de tipo TEM, el 27,7% de tipo SHV y el 8,4% de tipo SHV. Las β -lactamasas predominantes fueron los de tipo TEM, especialmente TEM-1 en 58 aislados clínicos. Las enzimas tipo OXA-1 solo se encontraron en el grupo de aislados resistentes (**Tabla 3**).

Validación del método

Todos los aislados resistentes a piperacilina/tazobactam fueron detectados mediante el ensayo de estudio, sin obtener falsos positivos ni falsos negativos. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método resultó del 100% (**Tabla 4**). El test también fue capaz de detectar cepas sensibles que podían desarrollar REEI. En este caso, también se obtuvieron valores del 100% en todos los parámetros estadísticos, excepto cuando el test se realizó a las 6-8 horas y se obtuvo una sensibilidad del 96% y un valor predictivo negativo del 93% (**Tabla 5**).

Tabla 4. Validez del test en la detección de resistencia a piperacilina/tazobactam (N=68)

Test	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
6-8 horas	100%	100%	100%	100%
24 horas	100%	100%	100%	100%

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

Tabla 5. Validez del test en la detección de REEI (N=70)

Test	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
6-8 horas	96%	100%	100%	93%
24 horas	100%	100%	100%	100%

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de identificación de aislados bacterianos resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa, capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de una combinación de un antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa (BL/IBL), que comprende la detección de los protones que se desprenden del anillo β -lactámico.
5
- 2.- El método según la reivindicación anterior donde la combinación BL/IBL se selecciona de la lista que consiste en: ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam, o cualquiera e sus combinaciones.
10
- 3.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la combinación BL/IBL es piperacilina/tazobactam.
- 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la detección se realiza en un hemocultivo o en un líquido corporal, preferiblemente un líquido corporal inoculado en frascos de hemocultivo.
15
- 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la detección de los protones se realiza mediante un indicador de cambio de pH.
- 6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el cambio de pH se mide mediante un método colorimétrico.
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el método colorimétrico es un método enzimático con rojo fenol.
20
- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el método de detección se llevó a cabo tanto a las 6-8 horas como a las 24 horas de hemocultivo.
- 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde los aislados bacterianos son del orden *Enterobacteriales*, preferiblemente de la familia *Enterobacteriaceae* y aún más preferiblemente de género *Escherichia*.
25
- 10.- El método según la reivindicación anterior, donde los aislados bacterianos son de la especie *Escherichia coli*.

11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde los aislados bacterianos son del orden *Enterobacteriales*, preferiblemente de la familia *Enterobacteriaceae* y aún más preferiblemente de género *Klebsiella*.

5 11.- Un método para determinar la capacidad de desarrollo de resistencia de espectro extendido a los β -lactámicos (REEI) que comprende inducir un proceso de presión antibiótica en aquellos aislados que presenten un bajo nivel de resistencia a BL/IBL (RSS y RRS), identificados por el método según las reivindicaciones 1-11.

12.- El método de determinación la capacidad de desarrollo de REEI según la reivindicación anterior, que comprende:

10 a) inocular concentraciones subinhibitorias de piperacilina/tazobactam (ratio 8:1), correspondientes a concentraciones una dilución por debajo de la CMI en los aislados que presenten un bajo nivel de resistencia a BL/IBL (RSS y RRS), identificados por el método según las reivindicaciones 1-11,

15 b) repetir el proceso hasta alcanzar la concentración de 256/32 mg/L de piperacilina/tazobactam, o hasta la concentración que no permitía el crecimiento bacteriano, y

c) cultivar los aislados clínicos presionados en cada una de las concentraciones e piperacilina/tazobactam para su determinación posterior.

20 13.- Un Kit o dispositivo para identificar aislados bacterianos resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa que comprende medios para la detección de los protones que se desprenden del anillo β -lactámico.

25 14.- El Kit o dispositivo para identificar aislados bacterianos resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa según la reivindicación anterior, que comprende medios para identificar el pH del medio.

30 15.- El Kit o dispositivo para identificar aislados bacterianos resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, donde los medios para identificar el pH del medio son reactivos colorimétricos que se seleccionan de entre rojo fenol y azul de bromotimol,

16.- El Kit o dispositivo según la reivindicación anterior donde el reactivo colorimétrico es rojo fenol.

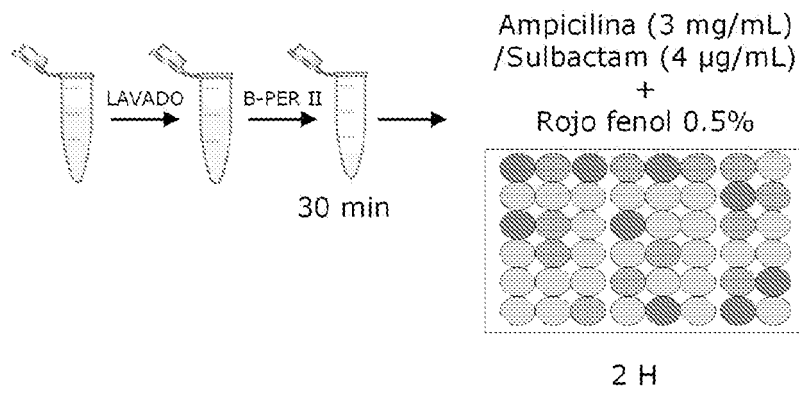


FIG. 1

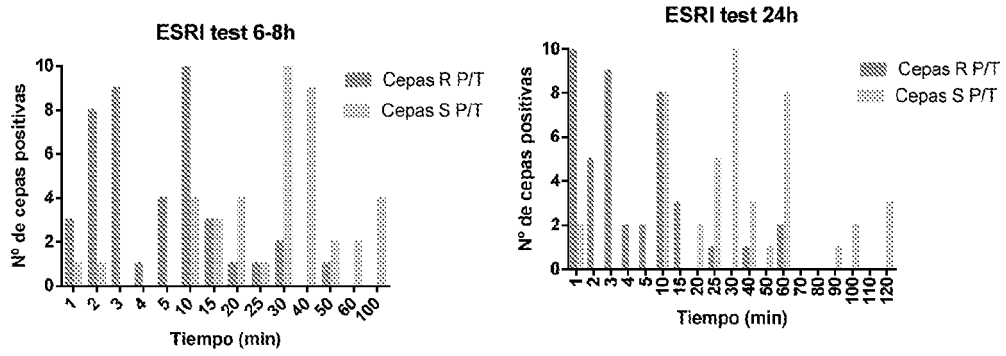


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2020/070406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/10 (2006.01)

G01N33/84 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDILINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP y Bases de Datos TXT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	RODRÍGUEZ VILLODRES, A. "Bacteriemias por <i>Escherichia coli</i> : Análisis clínico-epidemiológico, de factores de patogenicidad y mecanismos de resistencia a betalactámicos/inhibidores de betalactamasas.". Tesis Doctoral, 15/11/2019, pages 1-209 Retrieved from <URL: https://idus.us.es/handle/11441/93377 > chapter III	1-11, 13-16
Y	WO 2015193501 A1 (UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN ET AL.) 23/12/2015, Claims 12 and 13	1-11, 13-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
23/10/2020

Date of mailing of the international search report
(23/10/2020)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. García Coca

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493411

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2020/070406

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental box

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-11 and 13-16**

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

CONTINUATION OF BOX III

The international application lacks a single general inventive concept (PCT Rule 13.1).

The general concept according to claim 1 is a method for identifying bacterial isolates resistant to the combinations of β -lactam antibiotics with β -lactamase inhibitors, which can hydrolyse the β -lactam ring of a combination of a β -lactam antibiotic with a β -lactamase inhibitor (BL/BLI), said method comprising the detection of the protons that detach from the β -lactam ring.

However, claim 11 claims a method for determining the capacity of development of extended-spectrum resistance to β -lactams, comprising inducing a process of antibiotic pressure on the isolates that have a low level of resistance to BL/BLI (RSS and RRS), which are identified by the method according to claims 1-11.

There is no single general inventive concept since there is no technical relationship among these claims involving one or more of the same or corresponding special technical features; said features are, firstly, an identification method based on the detection of protons and, secondly, a method for determining the capacity of development of extended spectrum resistance based on a process of antibiotic pressure.

Since there are no other features that could be regarded as special features within the meaning of PCT Rule 13.2, the application lacks unity of invention.

Consequently, the following inventions are identified:

Invention 1: Claims 1-11 and 13-16 (relating to the identification method)

Invention 2: Claims 11 and 12 (relating to the method for determining the capacity of development of extended-spectrum resistance)

Note: There are two claims numbered 11, the first one being included in invention 1 and the second being included in invention 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070406

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUMAR M S et al.. "Molecular identification of multi drug resistant bacteria from urinary tract infected urine samples". Microbial Pathogenesis Academic Press Limited, New York, Ny, Us. Saito Atsushi, 30/11/0002, Vol. 98, pages 37 - 44, ISSN 0882-4010, <DOI: 10.1016/j.micpath.2016.06.029> point 2.8.2.	1-11, 13-16
A	US 2018105862 A1 (DEQUAIRE-ROCHELET MURIELLE ET AL.) 19/04/2018, the whole document.	1-11, 13-16
A	PASTERAN F et al.. "Simplified protocol for Carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures". Journal of Clinical Microbiology 20151201 American Society for Microbiology Usa., 01/12/2015, Vol. 53, N° 12, pages 3908 - 3911, ISSN 0095-1137 (print) ISSN 1098-660X (electronic), <DOI: 10.1128/JCM.02032-15 pubmed:26424841> The whole document.	1-11, 13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070406

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2018105862 A1	19.04.2018	BR112017021186 A2	03.07.2018 07.06.2018
		JP2018514227 A	02.09.2020
		JP6748701B B2	21.07.2020
		US10718006 B2	02.02.2018
		CN107660233 A	07.02.2018
		EP3278095 A1	06.10.2016
		WO2016156605 A1	07.10.2016
		FR3034523 A1	17.01.2020
----- WO2015193501 A1	----- 23.12.2015	FR3034523 B1	----- 18.08.2017
		CN107076743 A	18.05.2017
		US2017138944 A1	26.04.2017
		EP3158339 A1	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2020/070406

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/10 (2006.01)

G01N33/84 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDILINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP y Bases de Datos TXT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P, X	RODRÍGUEZ VILLODRES, A. "Bacteriemias por <i>Escherichia coli</i> : Análisis clínico-epidemiológico, de factores de patogenicidad y mecanismos de resistencia a betalactámicos/inhibidores de betalactamasas.". Tesis Doctoral, 15/11/2019, páginas 1-209 Recuperado de <URL: https://idus.us.es/handle/11441/93377 > capítulo III	1-11, 13-16
Y	WO 2015193501 A1 (UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN ET AL.) 23/12/2015, Reivindicaciones 12 y 13	1-11, 13-16

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
23/10/2020

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
23 de octubre de 2020 (23/10/2020)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

M. García Coca

Nº de teléfono 91 3493411

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2020/070406

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver Recuadro Suplementario.

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}: **1-11 y 13-16**

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

SUPLEMENTARIO DE RECUADRO III

La solicitud internacional no presenta un concepto general único tal y como se exige en la Regla 13.1 PCT.

El concepto general que se desprende de la reivindicación 1 es un **método de identificación** de aislados bacterianos resistentes a las combinaciones de antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa, capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de una combinación de un antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa (BL/IBL), que comprende la **detección de los protones** que se desprenden del anillo β -lactámico.

Sin embargo, la reivindicación 11 reivindica un **método para determinar la capacidad de desarrollo de resistencia de espectro extendido** a los β -lactámicos (REEI) que comprende **inducir un proceso de presión antibiótica** en aquellos aislados que presenten un bajo nivel de resistencia a BL/IBL (RSS y RRS), identificados por el método según las reivindicaciones 1-11.

No existe un concepto general único, ya que entre estas reivindicaciones no existe una relación técnica relativa a uno o varios elementos técnicos particulares idénticos o correspondientes, ya que dichos elementos son, por un lado, un método de identificación basado en la detección de protones y por otro lado, un método para determinar la capacidad de desarrollo de resistencia de espectro extendido basado en un proceso de presión antibiótica.

Como tampoco se encuentran otras características que puedan considerarse como elementos particulares en el sentido de la Regla 13.2 PCT, existe falta de unidad de invención.

Así se identifican las siguientes invenciones:

Invención 1: Reivindicaciones 1-11 y 13-16 (relativas al método de identificación)

Invención 2: Reivindicaciones 11 y 12 (relativas al método para determinar la capacidad de desarrollo de resistencia de espectro extendido)

Nota: Hay 2 reivindicaciones con el número 11, la primera de ellas se incluye en la invención 1 y la segunda se incluye en la invención 2.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070406

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	<p>KUMAR M S et al.. "Molecular identification of multi drug resistant bacteria from urinary tract infected urine samples". Microbial Pathogenesis Academic Press Limited, New York, Ny, Us. Saito Atsushi, 30/11/0002, Vol. 98, páginas 37 - 44, ISSN 0882-4010, <DOI: 10.1016/j.micpath.2016.06.029> punto 2.8.2.</p>	1-11, 13-16
A	<p>US 2018105862 A1 (DEQUAIRE-ROCHELET MURIELLE ET AL.) 19/04/2018, todo el documento.</p>	1-11, 13-16
A	<p>PASTERAN F et al.. "Simplified protocol for Carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures". Journal of Clinical Microbiology 20151201 American Society for Microbiology Usa., 01/12/2015, Vol. 53, Nº 12, páginas 3908 - 3911, ISSN 0095-1137 (print) ISSN 1098-660X (electronic), <DOI: 10.1128/JCM.02032-15 pubmed:26424841> Todo el documento.</p>	1-11, 13-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2020/070406

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2018105862 A1	19.04.2018	BR112017021186 A2 JP2018514227 A JP6748701B B2 US10718006 B2 CN107660233 A EP3278095 A1 WO2016156605 A1 FR3034523 A1 FR3034523 B1	03.07.2018 07.06.2018 02.09.2020 21.07.2020 02.02.2018 07.02.2018 06.10.2016 07.10.2016 17.01.2020
----- WO2015193501 A1 -----	----- 23.12.2015 -----	----- CN107076743 A US2017138944 A1 EP3158339 A1 -----	----- 18.08.2017 18.05.2017 26.04.2017 -----