



Universidad Miguel Hernández

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina Clínica

Programa de Doctorado en Medicina Clínica

Diseño y validación de un nuevo método molecular para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas

Memoria presentada por Antonio José Galiana Cabrera para optar
al grado de Doctor en Investigación Clínica

Bajo la dirección de la Dra. Gloria Royo García y el Dr. Juan
Carlos Rodríguez Díaz

San Juan (Alicante), 2016

D. JAVIER FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Director del Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo “Diseño y validación de un nuevo método molecular para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas”, presentado por D. Antonio José Galiana Cabrera bajo la dirección de la Dra. Dña Gloria Royo García y del Dr. D. Juan Carlos Rodríguez Díaz.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a diecinueve de septiembre de dos mil dieciseis.

Prof. J. Fernández
Director
Dpto. Medicina Clínica



Dña. Gloria Royo García y D. Juan Carlos Rodríguez Díaz, como directores de Tesis Doctoral

CERTIFICAN:

Que el trabajo “Diseño y validación de un nuevo método molecular para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas” realizado por D. Antonio José Galiana Cabrera ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmamos para los oportunos efectos en San Juan de Alicante a diecinueve de septiembre de dos mil dieciseis.

Fdo. Dra. Gloria Royo García

Fdo. D. Juan Carlos Rodríguez Díaz



DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante

Tel.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450

c.electrónico: med.psiqui@umh.es

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer de manera especial el esfuerzo realizado por mis padres por brindarme la oportunidad de estudiar, a mi hermana por despertar el interés científico que había dentro de mi, y a Miriam por ser la que me hace relativizar los problemas. Gracias a vosotros me dedico a lo que más me gusta.

Agradecer también a mis directores de tesis la Dra. Gloria Royo y el Dr. Juan Carlos Rodríguez por todos estos años de apoyo y confianza mostrada en mí, gracias por darme la oportunidad de crecer como científico y como persona.

Esta tesis doctoral es el resultado del trabajo y esfuerzo de mucha gente que me ha acompañado a lo largo de este proyecto, sin vosotros este trabajo no habría sido posible:

A Rosa Cremades y Rafaela Ferrari, gracias por introducirme como uno más en el laboratorio.

A Adelina Gimeno, Antonia Sánchez, Pilar Lopez, Montse Ruiz y Victoria Sánchez, gracias por todas vuestras críticas constructivas y vuestra implicación con el proyecto.

A Noemí Marco, Inma García y Laura Sánchez, tres pilares importantes para mí y compañeras de fatigas.

A María Andrés, Ivan Prats y Pedro Garcinuño, sin vuestra ayuda en el trabajo de campo habría sido imposible la realización de esta tesis.

A todo el personal técnico de laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche y del Hospital General Universitario de Alicante, gracias por vuestra comprensión con los que nos dedicamos a la investigación.

A la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana y al Gerente D. Jacobo Martínez por el apoyo institucional mostrado al proyecto y en especial a María Prada, por su implicación personal en la consecución de la patente. A Silvia Fajardo y Lorena Montoliu por los infinitos trámites burocráticos a los que me han ayudado. A Alejandro Mira, un gran amigo y un referente importante en mi trayectoria científica.

A los chicos de Master Diagnóstica, Asunción Olmo, Juana Carrero, Ester Lara Martín y Antonio Barrientos, gracias por ayudar al desarrollo tecnológico de esta idea.

Gracias a todos por vuestro esfuerzo.



FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral se ha desarrollado gracias a la ayuda de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (UGP-14-216), Generalitat Valenciana (AP-169/11) y Fundación de la Comunidad Valenciana para la investigación biomédica, la docencia y la cooperación internacional y para el desarrollo del Hospital General Universitario de Elche (FIBELX-CO11/01).



GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribunucleico

AUC: Área bajo la curva

BLEA: Beta Lactamasa de Espectro Ampliado

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CNP: Carba NP test

CP-: Razón verosimilitud negativa

CP+: Razón verosimilitud positiva

Ct: Valor de fluorescencia umbral

DHP-I: Dehidropeptidasa I

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GlcNac: N-acetilglucosamina

HGUA: Hospital General Universitario de Alicante

HGUE: Hospital General Universitario de Elche

IC95: Intervalo de Confianza al 95%

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight

MEM: Meropenem

MHT: Test de Hodge Modificado

MurNac: N-acetilmurámico

MLST: Multilocus Sequence Typing

PBP: Proteínas de Unión a la Penicilina

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RPM: Revoluciones por Minuto

SNS: Sistema Nacional de Salud

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

VPN: Valor Predictivo Positivo

VPP: Valor Predictivo Negativo



UNIVERSITAS

*“El éxito es la suma de pequeños
esfuerzos repetidos día tras día”*

Miguel
Hernández

R. Collier



ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN

1.1	CARBAPENEMS	1
1.1.1	ESTRUCTURA QUÍMICA	2
1.1.2	RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	2
1.1.3	MECANISMO DE ACCIÓN	4
1.1.4	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	7
1.1.4.1	ACTIVIDAD FRENTE A GRAM-POSITIVOS	7
1.1.4.2	ACTIVIDAD FRENTE A GRAM-NEGATIVOS	7
1.1.4.3	ACTIVIDAD FRENTE A MICROORGANISMOS ANAEROBIOS ^o	8
1.1.5	FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÁMICA	10
1.1.6	UTILIDAD CLÍNICA	11
1.2	MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS CARBAPENEMS.....	11
1.2.1	ALTERACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PBP'S.....	12
1.2.2	MODELO DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS MODELO STAPHYLOCOCCUS AUREUS	13
1.2.3	ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD CELULAR.....	15
1.2.3.1	SISTEMAS DE EXPULSIÓN ACTIVA	15
1.2.3.2	PORINAS DE MEMBRANA	16
1.2.4	CARBAPENEMASAS.....	18
1.2.4.1	CARBAPENEMASAS DE LA CLASE A.....	21
1.2.4.1.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES	21
1.2.4.1.2	MECANISMO DE ACCIÓN	21
1.2.4.1.3	FAMILIAS DE CARBAPENEMASAS DE LA CLASE A	24
1.2.4.2	CARBAPENEMASAS DE LA CLASE B	26
1.2.4.2.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES	26
1.2.4.2.2	MECANISMO DE ACCIÓN	26
1.2.4.2.3	FAMILIAS DE CARBAPENEMASAS DE LA CLASE B.....	28
1.2.4.3	CARBAPENEMASAS DE LA CLASE D.....	32
1.2.4.3.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES	32
1.2.4.3.2	MECANISMO DE ACCIÓN	32
1.2.4.3.3	FAMILIAS DE CARBAPENEMASAS DE LA CLASE D.....	34
1.3	DISEMINACIÓN GLOBAL ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.	36
1.3.1	DISTRIBUCIÓN GLOBAL DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.....	37
1.3.2	FACTORES DE RIESGO PARA LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN POR CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS Y CONTROL DE LA DISPERSIÓN	39
1.4	MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS	40
1.4.1	MÉTODOS FENOTÍPICOS	41
1.4.1.1	SCREENING DE CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS	41
1.4.1.2	CONFIRMACIÓN PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS.....	42
1.4.1.2.1	TESTS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	42
1.4.1.2.2	TEST DE HODGE MODIFICADO	43
1.4.1.2.3	ESTUDIOS DE SINERGÍA CON DOBLE DISCO.....	44
1.4.2	MÉTODOS MOLECULARES.....	45
1.4.2.1	ENSAYOS BASADOS EN LA TÉCNICA DE LA PCR A TIEMPO REAL.....	45
1.4.2.2	ENSAYOS BASADOS EN ARRAYS DE ADN	46
1.4.2.3	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	47

2	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1	JUSTIFICACIÓN	49
2.2	HIPÓTESIS	50
2.3	OBJETIVOS.....	50
3	MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1	MATERIALES EMPLEADOS	52
3.2	PCR A TIEMPO REAL	54
3.3	DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN SISTEMA DE PCR A TIEMPO REAL MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE CARBAPENEMASAS EN MICROORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS	57
3.3.1	<i>DISEÑO BIOINFORMÁTICO DE CEBADORES Y SONAS TAQMAN DE PCR A TIEMPO REAL EMPLEADOS EN EL SISTEMA Carbaplex iD.</i>	57
3.3.1.1	SELECCIÓN DE DIANAS.....	58
3.3.1.2	ESTUDIOS FILOGENÉTICOS DE LOS GENES CODIFICANTES DE CARBAPENEMASAS.....	60
3.3.1.3	SECUENCIAS CONSENSO EMPLEADAS PARA EL DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS DEL SISTEMA <i>Carbaplex iD</i>	60
3.3.1.4	DISEÑO DE CEBADORES-SONDAS TAQMAN DEL SISTEMA <i>Carbaplex iD</i> Y PCR A TIEMPO REAL.....	60
3.3.2	<i>CONDICIONES DE TRABAJO DE LA PCR A TIEMPO REAL MULTIPLEX DEL SISTEMA Carbaplex iD</i>	65
3.3.2.1	EQUIPO Y SOFTWARE EMPLEADO.....	66
3.3.2.2	PROGRAMA DE PCR A TIEMPO REAL EMPLEADO.....	66
3.3.3	<i>ANÁLISIS DE RESULTADOS</i>	67
3.3.4	<i>CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE LA EFICIENCIA DE REACCIÓN DEL SISTEMA Carbaplex iD</i>	69
3.3.4.1	REALIZACIÓN DE LA RECTA PATRÓN.....	71
3.3.5	<i>VALIDACIÓN CLÍNICA DEL SISTEMA Carbaplex iD EN DISTINTOS SETS DE MUESTRAS</i>	72
3.3.5.1	EXPERIMENTO 1. CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y RAZONES DE VEROSIMILITUD DEL SISTEMA <i>Carbaplex iD</i>	74
3.3.5.1.1	SENSIBILIDAD.....	74
3.3.5.1.2	ESPECIFICIDAD	75
3.3.5.1.3	CEPAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO	77
3.3.5.1.4	PROTOCOLO DE TRABAJO	78
3.3.5.1.5	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y RAZONES DE VEROSIMILITUD.....	79
3.3.5.2	EXPERIMENTO 2. CÁLCULO DE LOS VALORES PREDICTIVOS POSITIVO Y NEGATIVO DEL SISTEMA <i>Carbaplex iD</i>	80
3.3.5.2.1	CEPAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO	81
3.3.5.2.2	PROTOCOLO DE TRABAJO	85
3.3.5.2.3	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS VPP Y VPN DEL SISTEMA <i>Carbaplex iD</i>	89
3.3.5.2.4	IDENTIFICACIÓN POR MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) LA CLONALIDAD DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS IDENTIFICADAS.....	89
3.3.5.3	EXPERIMENTO 3. APLICACIÓN DEL SISTEMA <i>Carbaplex iD</i> EN LA DETECCIÓN DE PACIENTES COLONIZADOS POR ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.....	92
3.3.5.3.1	TEST DE McNEMAR	93
3.3.5.3.2	MUESTRAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO.....	94
3.3.5.3.3	PROTOCOLO DE TRABAJO	94

3.3.5.3.4	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, RAZONES DE VEROSIMILITUD Y TEST DE McNEMAR.....	96
3.3.6	ADAPTACIÓN DEL SISTEMA <i>Carbaplex iD</i> A LA PLATAFORMA COMERCIAL <i>SEPSIS FLOW CHIP</i>	97
3.3.6.1	SEPSIS FLOW CHIP	97
3.3.6.2	EXPERIMENTO 4: VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE MARCADORES DE RESISTENCIA A CARBAPENEMS EN LA PLATAFORMA COMERCIAL <i>Sepsis Flow Chip</i>	101
3.3.6.2.1	PROTOCOLO DE TRABAJO	102
4	RESULTADOS	
4.1	SENSIBILIDAD ANALÍTICA Y EFICIENCIA DE LA REACCIÓN	104
4.2	EXPERIMENTO 1: CÁLCULOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA	107
4.3	EXPERIMENTO 2: CÁLCULO DE LOS VALORES PREDICTIVOS POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA.....	110
4.4	EXPERIMENTO 3: DETECCIÓN DE PACIENTES INGRESADOS EN UCI COLONIZADOS POR BACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS ..	117
4.5	EXPERIMENTO 4: VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN LA PLATAFORMA COMERCIAL <i>SEPSIS FLOW CHIP</i>	122
5	DISCUSIÓN	
5.1	DISCUSIÓN	127
6	CONCLUSIONES	
6.1	CONCLUSIONES.....	135
7	BIBLIOGRAFÍA	
7.1	BIBLIOGRAFÍA	136
8	ANEXO I	
8.1	SECUENCIAS CONSENSO	143
9	ANEXO II	
9.1	ARTÍCULOS.....	154
9.2	COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	154
9.3	SOLICITUD DE PATENTE EUROPEA	156
9.4	INFORME EUROPEO DE PATENTABILIDAD.....	157



1 INTRODUCCIÓN

1.1 CARBAPENEMS

Los carbapenems juegan un importante papel en el tratamiento antibiótico ya que presentan buena actividad antibiótica frente a gram positivos y sobretodo frente a gram negativos¹. Como resultado de su amplio espectro de acción frecuentemente son utilizados como último recurso en pacientes con infecciones con microorganismos resistentes a otros antibióticos².

El primer carbapenem descubierto fue en 1976, un compuesto generado por *Streptomyces cattleya* con actividad antibacteriana y con capacidad para inhibir β -lactamasas, y fue conocido como tienamicina. La tienamicina despertó mucho interés ya que al igual que otros b-lactámicos tenía la capacidad de unirse a las Proteínas de Unión a la Pencilina (PBP's) y también mostró actividad frente a gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa*³. Desafortunadamente también se demostró su poca estabilidad en solución acuosa, su inestabilidad a pH superiores a 8 y su alta reactividad frente a nucleófilos como la hydroxylamina. Esta inestabilidad química hizo necesaria la nueva búsqueda de análogos derivados de su estructura con mayor estabilidad y el primer derivado desarrollado fue el imipenem en 1985. El imipenem fue el primer carbapenem disponible para el tratamiento de infecciones microbianas complicadas con éxito. Al ser susceptible de inactivación por el enzima dehidropeptidasa I (DHP-I) localizada en el riñón humano, se introdujeron en la molécula nuevas modificaciones para hacer derivados más estables y fue entonces cuando se sintetizaron el ertapenem, meropenem y doripenem, los carbapenems con más éxito hasta la actualidad¹.

Los carbapenems son los antibióticos β -lactámicos dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las β -lactamasas. Son imprescindibles en el tratamiento empírico, en monoterapia en infección nosocomial grave e incluso en infección de origen comunitario y sobretodo en infección producida por gram-negativos multirresistentes². Todos los carbapenems disponibles son similares en cuanto a espectro, aunque con algunas diferencias en la actividad antimicrobiana, que va a ser lo que determine sus indicaciones clínicas.

1.1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

La estructura de los carbapenems se compone de un anillo β -lactámico condensado con otro pirrolidínico de 5 miembros. En la posición 1 del anillo tenemos un átomo de carbono C-1, en lugar de uno de azufre como pasa en las penicilinas y una insaturación entre los carbonos C-2 y C-3. En el carbono C-6 a diferencia de las penicilinas, tienen un grupo hidroxietilo en configuración *trans* que protege al anillo β -lactámico de muchas serin- β -lactamasas, en la posición C-3 poseen un grupo carboxilo imprescindible para la activación del anillo β -lactámico por parte del anillo pirrolidínico.

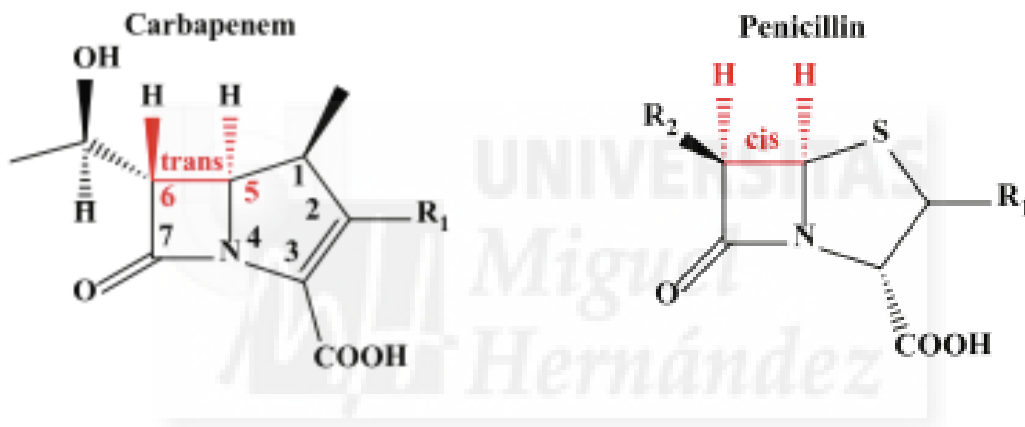


FIGURA 1. Diferencias entre la estructura básica de carbapenems y penicilina.

1.1.2 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Modificando los C-1 y C-2 de la estructura común de todos los carbapenems se han podido sintetizar distintos compuestos. En el imipenem los hidrógenos del C-1 no están sustituidos por lo que presenta sensibilidad a la degradación por el enzima DHP-I renal. El meropenem, ertapenem y doripenem poseen un grupo metilo unido al C-1 lo que les confiere estabilidad frente a la degradación por la DHP-I renal. En el C-2 encontramos una cadena lateral tioacíclica de carácter básico y es la que le da a cada tipo de carbapenem sus características como actividad antimicrobiana, potencial neurotóxico,

afinidad de unión a algunos sistemas de expulsión activa, farmacodinámica y estabilidad frente a DHP-I.

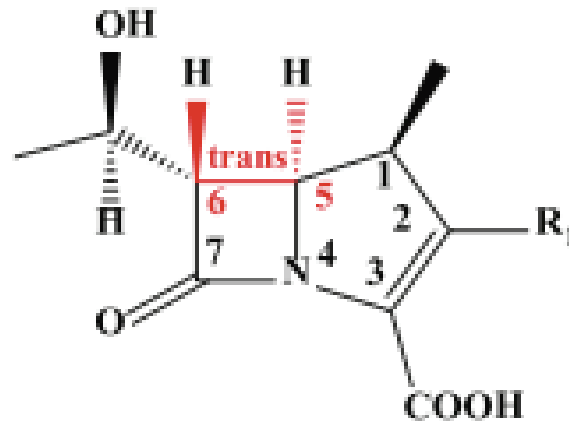


FIGURA 2. Relación estructura química y función de los carbapenems.

En el imipenem esta cadena lateral de C-2 es un imino-metil-amino-etil-tio proporcionando buena actividad frente a gram-positivos, mientras que en el meropenem cadena lateral es un dimetil-carbonil-pirrolidin-tio que incrementa su actividad frente a gram-negativos y además puede estar implicada en la reducción del efecto proconvulsiónante observado en tratamientos con imipenem. El ertapenem como cadena lateral posee un grupo carboxifenil amino-carbomoil-pirrolidin-tio, al que se le une un grupo carboxifenil, haciendo que aumente el peso molecular de la molécula y su carácter lipofílico, además a pH fisiológico el radical carboxílico se ioniza y proporciona una carga negativa extra a la molécula, responsable del aumento de la semivida del ertapenem y permitiendo una sola administración diaria, aunque debido a su peso molecular y su carácter lipofílico tiene baja actividad frente a *P. aeruginosa*. El doripenem posee una cadena lateral del tipo sulfamoil-aminometil-pirrolidin-tio que lo dota de buena actividad frente a gram-negativos y a gram-positivos además, debido a su menor alcalinidad en comparación con otros carbapenems esta molécula presenta mayor actividad frente a *P. aeruginosa*¹.

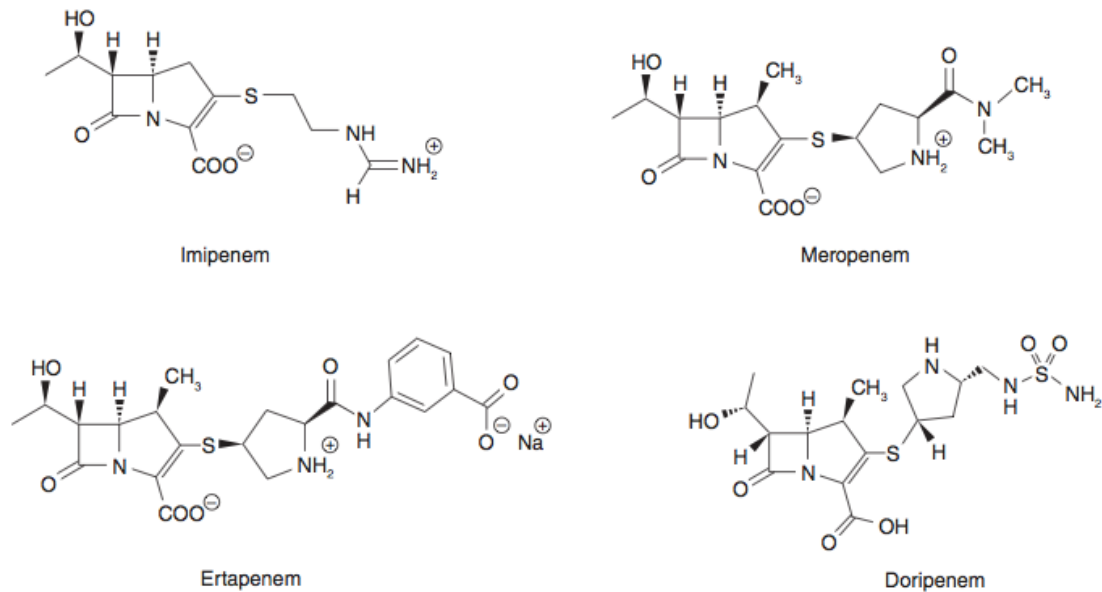


FIGURA 3. Estructura química de los carbapenems.

1.1.3 MECANISMO DE ACCIÓN

Los carbapenems actúan de manera eficaz frente a microorganismos gram-positivos y gram-negativos, su mecanismo de acción es a nivel de las PBP's inhibiendo su actividad transpeptidasa⁴. Las PBP's son tradicionalmente conocidas por su papel en la biosíntesis del peptidoglicano y dependiendo de la especie bacteriana pueden existir de 2 a 16 PBP's distintas en la misma célula. Estas proteínas están divididas en dos clases distintas atendiendo a su peso molecular:

1. Proteínas de bajo peso molecular, que poseen una masa por debajo de 40 kDa y que sólo tienen actividad carboxipeptidasa.
2. Proteínas de alto peso molecular, cuya masa oscila entre 50-100 kDa, dentro de esta categoría encontramos PBP's de distintas clases:
 - a. Calse A: Poseen actividad transglicosilasa y transpeptidasa.

b. Clase B: Sólo poseen actividad transpeptidasa.

La presencia de PBP's activas en los microorganismos es fundamental para la síntesis de peptidoglicano implicada directamente en la proliferación celular. El peptidoglicano bacteriano es una estructura macromolecular situada fuera de la membrana citoplásmica de casi todas las eubacterias. Su función principal es preservar la integridad celular haciendo que soporte su propia presión osmótica interna, además es responsable de mantener la forma celular definida y está implicado en la división celular⁵.

La estructura principal del peptidoglicano está compuesta por cadenas lineales de glicano entrelazadas por pequeños péptidos. Las cadenas de glicano están compuestas por unidades alternantes de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilmurámico (MurNAc) unidas mediante un enlace β 1 \rightarrow 4, el grupo carboxilo de cada MurNAc se sustituye por una subunidad peptídica de cinco aminoácidos cuya secuencia varía entre especies pero inevitablemente siempre termina con la secuencia D-Alanina-D-Alanina. La biosíntesis del peptidoglicano se puede dividir en dos etapas:

1. Por un lado tenemos la polimerización de las cadenas lineales de glicano donde se van formando en paralelo polímeros lineales del tipo GlcNAc – MurNAc.
2. Por otro lado tenemos en perpendicular al esqueleto de azúcares la subunidad peptídica de cinco aminoácidos uniendo entre sí cadenas de glicano vecinas, dando lugar a la formación del péptidoglicano.

Las PBP's son las enzimas encargadas de catalizar la polimerización de la cadena de glicano gracias a su actividad transglicosilasa y además al poseer también actividad traspeptidasa también catalizan la formación de los enlaces entre los péptidos de las distintas cadenas de glicano, formando el peptidoglicano.

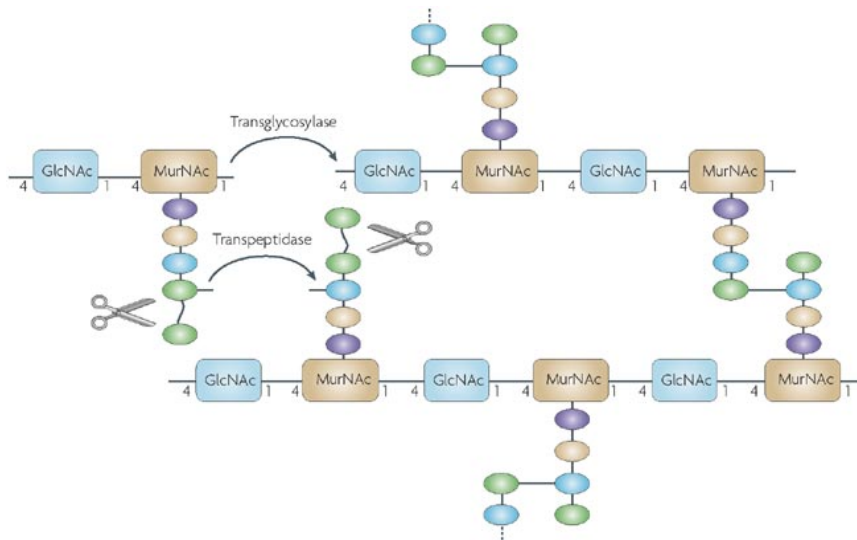


FIGURA 4. Actividad transglicosilasa y transpeptidasa de las PBP's en la síntesis de peptidoglicano.

A escala molecular, los antibióticos β -lactámicos y en concreto los carbapenems deben su acción antibiótica a la imitación del dipéptido D-Alanina-D-Alanina que se utiliza durante la biosíntesis de péptidoglicano⁶, de esta manera el carbapenem forma un enlace irreversible entre su grupo carbonilo y un residuo de Serina que se encuentra el centro activo con actividad transpeptidasa de las PBP's. En concreto un grupo hidroxilo que se encuentra en el residuo de Serina del centro activo de la PBP, ataca al grupo carbonilo de la amida del anillo β -lactámico produciendo una estructura tetraédrica intermedia que colapsa, la unión del grupo carbonilo con la amida se rompe y se forma un enlace covalente con el grupo hidroxilo de la PBP, inhibiendo su actividad transpeptidasa y por lo tanto frenando la polimerización del peptidoglicano causando con el tiempo la lisis celular al microorganismo.

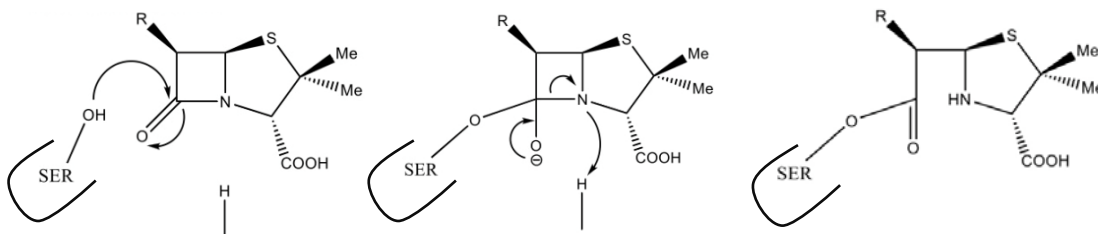


FIGURA 5. Mecanismo de inhibición de PBP's por β -lactámico. Formación de enlace covalente entre el grupo hidroxilo del anillo β -lactámico y el centro activo β -lactámico de la PBP.

Poseen un espectro de actividad muy amplio que en gram-positivos viene determinado por su afinidad a las PBP's y presencia de b-lactamasas⁷ y en gram-negativos también influye su capacidad para difundir por la pared celular, en la tabla 1 se muestra un resumen de los microorganismos afectados por la actividad de los carbapenems.

1.1.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En cuanto a su actividad antimicrobiana los carbapenems presentan un espectro coincidente aunque existen algunas diferencias en su actividad intrínseca dependiendo del microorganismo, así por ejemplo en líneas generales la actividad del imipenem es superior frente a la del meropenem en gram-positivos e inferior en gram-negativos, mientras que doripenem tiene una actividad equivalente frente a gram-positivos y gram-negativos⁸. Por otro lado el ertapenem se diferencia en actividad con el resto de carbapenems ya que su actividad frente a *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* y otros bacilos gram-negativos no fermentadores es prácticamente nula.

1.1.4.1 ACTIVIDAD FRENTE A GRAM-POSITIVOS

En *Staphylococcus spp.* sensibles a meticilina, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus spp.* del grupo viridans, imipenem y doripenem son los carbapenems con mayor actividad frente a ertapenem y meropenem. Frente a *Enterococcus faecalis* imipenem, meropenem y doripenem muestran una actividad similar mientras que frente a *Listeria monocytogenes* el carbapenem con más actividad es el imipenem seguido del meropenem⁹.

1.1.4.2 ACTIVIDAD FRENTE A GRAM-NEGATIVOS

Frente al grupo *Enterobacteriaceae* todos los carbapenems poseen buena actividad aunque doripenem presenta el máximo de actividad frente a imipenem que presenta una actividad más baja que el resto. En algunos géneros de enterobacterias como *Proteus*

sp., *Morganella sp.*, *Providencia sp.* y *Salmonella sp.* meropenem y ertapenem presentan mejor actividad que doripenem⁹.

En cuanto a bacilos gram-negativos no fermentadores, ertapenem carece de uso clínico ya que no presenta actividad ante este grupo de microorganismos y doripenem es el que presenta más actividad seguido de meropenem e imipenem. En *P. aeruginosa* el doripenem es el carbapenem con más actividad mientras que en *Acinetobacter baumannii* la actividad de imipenem es mayor. En otros bacilos gram-negativos no fermentadores como *Haemophilus influenzae*, *Neisseria spp.* y *Moraxella spp.* los carbapenems más efectivos son el meropenem y ertapenem.

1.1.4.3 ACTIVIDAD FRENTE A MICROORGANISMOS ANAEROBIOS⁹

La actividad de los carbapenems frente a anaerobios es muy buena. Así por ejemplo en gram-negativos doripenem posee una actividad superior al resto de carbapenems frente a *Clostridium difficile* y posee una actividad similar a imipenem y meropenem frente a *Bacteroides fragilis*. En otros anaerobios como *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium perfringens* y cocos gram-positivos todos los carbapenems presentan una gran actividad.

	Gram-positivos	Gram-negativos
Aerobios y facultativos	<i>S. aureus</i> sensible a meticilina	Enterobacterias
	Co-N- <i>Staphylococcus</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>P. Aeruginosa</i>
	<i>S. pyogenes</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>E. faecalis</i>	<i>Achromobacter spp.</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Roseomonas spp.</i>
	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
	<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Brucella spp.</i>
	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Neisseria spp.</i>
	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	<i>H. Influenzae</i>
	<i>Actinomadura madurae</i>	<i>Moraxella spp.</i>
Microaerófilos	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
		<i>Campylobacter jejuni</i>
		<i>Helicobacter pylori</i>
		<i>Capnocytophaga spp.</i>
Anaerobios	Cocos grampositivos	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Clostridium spp.</i>	<i>Prevotella/Porphyromonas</i>
	<i>C. difficile</i>	<i>Veillonella spp.</i>
	<i>C. perfringens</i>	
	<i>Acinomyces spp.</i>	
	<i>Lactobacillus spp.</i>	
	<i>Propionibacterium spp.</i>	
	<i>Eubacterium spp.</i>	

TABLA 1. Espectro de actividad de los carbapenems, Goulenok et al, 2011.

1.1.5 FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÁMICA

No se absorben por vía oral, por lo que tienen que ser aplicados de manera intramuscular o intravenosa. Tienen una buena difusión en la mayoría de tejidos, sobretodo a nivel del sistema nervioso central y sistema renal. Muestran unos parámetros farmacocinéticos lineales para un rango de dosis de 500 mg a 1 g durante 1-4 horas. La semivida de eliminación de los carbapenems varía entre 1-4 horas mientras que la eliminación urinaria no es dosis-dependiente y aproximadamente se excreta por la orina el 75% del compuesto intacto¹.

Su actividad antimicrobiana depende del “tiempo sobre la CMI” (tiempo en porcentaje en que la concentración del antibiótico se encuentra por encima de la Concentración Mínima Inhibitoria de la bacteria diana, “T > CMI”), debido a su elevado poder bactericida, el tiempo sobre la CMI en los carbapenems es inferior que para el resto de los β -lactámicos.

	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Doripenem
Dosis i.v. (g)	1	1	1	0,5
C _{max} (mg/l)	69,9	61,6	164,6	23
t 1/2 (h)	1,11	0,98	4	1
Vd (l)	14,4	12,5	9,8	16,8
AUC (mg/h/l)	92,5	90,8	577,1	36
Unión a proteínas (%)	20	2	85-95	9
Recuperación urinaria (%)	74	75	80-95	71/15
Estabilidad en solución acuosa TA (h)	4	6	6	12

TABLA 2. Farmacocinética carbapenems, Fresnadillo et al, 2014.

1.1.6 UTILIDAD CLÍNICA

Debido a su amplio espectro de actividad y características farmacocinéticas imipenem y meropenem son la terapia de elección para el tratamiento empírico de infecciones sospechosas de microorganismos productores de β -Lactamasas de Espectro Ampliado (BLEA), infección nosocomial grave, en pacientes que previamente han recibido tratamiento con antibióticos de amplio espectro y en infecciones de etiología polimicrobiana.

El ertapenem¹⁰ presenta un espectro más reducido que no incluye patógenos nosocomiales graves como *P. aeruginosa* ni *Acinetobacter spp.* lo que su empleo solo es útil en infecciones leves-moderadas de patógenos adquiridos en la comunidad.

La utilidad clínica del doripenem está centrada en el tratamiento de infecciones intraabdominales complicadas, infecciones urinarias complicadas, neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica y pielonefritis.

1.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS CARBAPENEMS

La resistencia a los β -lactámicos y en concreto a los carbapenems puede deberse a tres mecanismos que actúan de manera individual o combinada tanto en gram-positivos como en gram-negativos. En concreto las estrategias utilizadas por los microorganismos son:

1. Alteración estructural de las PBP's¹¹.
2. Alteraciones en la permeabilidad celular por sistemas de expulsión activa¹².
3. Inactivación del sustrato por β -lactamasas, en concreto las que tienen más afinidad por los carbapenems, las carbapenemasas¹³.

En gram-positivos el mecanismo más importante de resistencia es la alteración de las PBP's mientras que en gram-negativos tienen más importancia la alteración de la permeabilidad celular y la expresión de carbapenemasas, aunque se han descrito casos de gram-negativos como *Proteus mirabilis* con alteración estructural de PBP's implicadas directamente en la resistencia a carbapenems

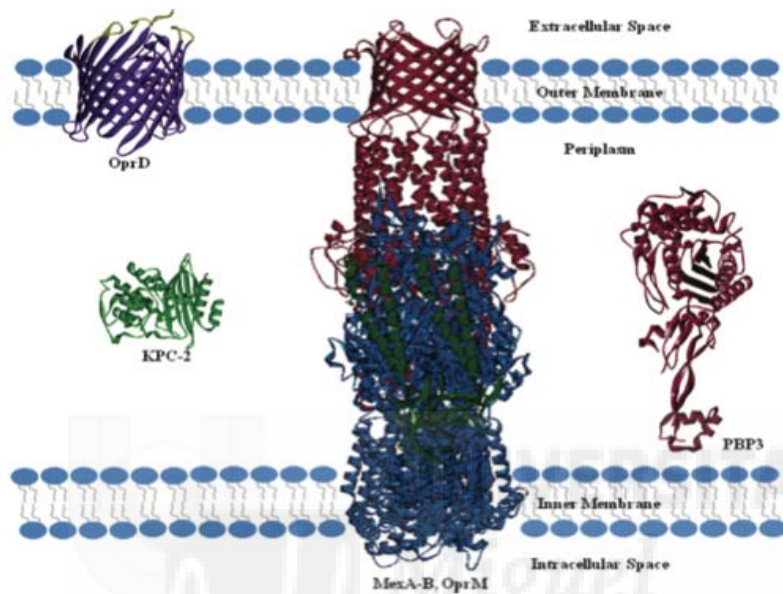
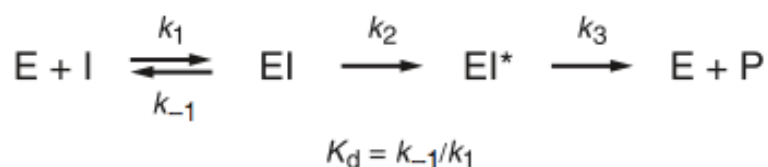


FIGURA 6. Mecanismos implicados en la resistencia a los carbapenems.

1.2.1 ALTERACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PBP'S

Como hemos mencionado en el apartado *mecanismo de acción*, el mecanismo de actuación de los carbapenems consiste en imitar la estructura del dipéptido D-Alanina-D-Alanina implicado en la biosíntesis del péptidoglicano y unirse de manera covalente al centro activo transpeptidasa de las PBP's, actuando como inhibidores siguiendo el siguiente esquema cinético:



Las PBP's (E) se unen al carbapenem (I) con una constante k_1 , a continuación se forma por enlace covalente el complejo PBP-carbapenem (EI*) a una constante k_2 para después el carbapenem ser hidrolizado por la PBP (E+P) a una constante k_3 para volver a dejar libre la PBP. Como la constante de hidrólisis k_3 es despreciable a escala de generación bacteriana ($k_3 \ll k_2$), se considera que los carbapenems son inhibidores suicidas.

Una estrategia desarrollada principalmente por microorganismos gram-positivos como mecanismo de resistencia a los carbapenems es la modificación de la estructura del las PBP's con el fin de disminuir la afinidad carbapenem por la PBP. De esta forma si disminuimos el valor de k_2 , el valor de k_3 toma significación en la ecuación.

PBP	β -lactámico	k_2/K_d ($M^{-1}s^{-1}$)	k_2 (s^{-1})	K_d (mM)	k_3 (s^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
PBP2x	Penicilina-G	200.000	180	0,9	8×10^{-6}	24
PBP2x ^R	Penicilina-G	137	0,56	4	$5,7 \times 10^{-4}$	0,33
PBP2a	Penicilina-G	17	0,22	13	$1,5 \times 10^{-5}$	13
PBP2x	Cefotaxima	118.000	150	1,27	$3,5 \times 10^{-6}$	54
pbp2x ^R	Cefotaxima	580	2,5	4,3	3×10^{-4}	0,65

TABLA 3. Valores k_2 y k_3 para distintas PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*, Chambers, 1999.

1.2.2 MODELO DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS MODELO STAPHYLOCOCCUS AUREUS

La resistencia a los β -lactámicos que experimentan algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, en concreto las cepas conocidas como SARM (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina), resulta de la expresión de una PBP conocida como PBP2¹⁴. La PBP2 es el producto de un gen conocido como *mecA*, regulado por los elementos reguladores *mecl* y *mecR1* donde *mecl* es el represor de la transcripción del gen *mecA*.

Dentro del sistema de regulación del gen *mecA* encontramos la proteína MecR1 que es una proteína de membrana transductora de señales con un dominio extracelular que se une a los β -lactámicos y actúa como sensor, en presencia de β -lactámicos su dominio citoplásmico se activa. Este dominio es una proteasa que corta a la proteína MecI que estaba reprimiendo la expresión del gen *mecA*. El gen *mecA* y su sistema regulatorio se encuentran flanqueados por elementos genéticos móviles y se insertan en el cromosoma bacteriano.

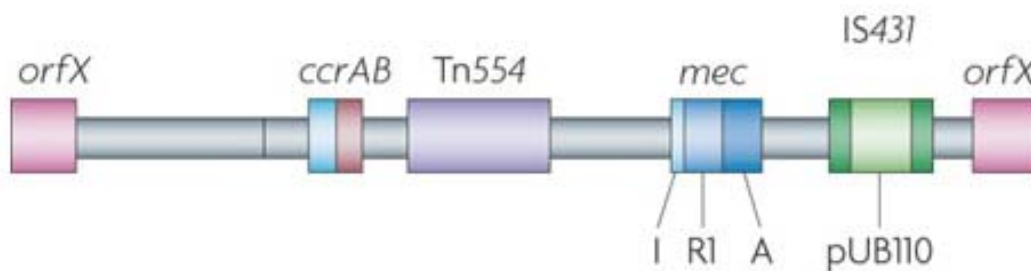


FIGURA 7. Entorno genético del caset *mecA* insertado en el cromosoma de *Staphylococcus aureus*.

La PBP2 solo tiene actividad transpeptidasa y soporta toda la carga transpeptidasa de la síntesis del peptidoglicano cuando existen β -lactámicos en el medio. Comparada con las PBP's nativas de *Staphylococcus aureus*, la PBP2 reacciona con los β -lactámicos de una manera muy lenta, por ejemplo si comparamos el ratio de las constantes k_2/K_d observamos que es tres ordenes de magnitud más lenta que cualquier PBP nativa indicando su baja afinidad para la unión a los β -lactámicos.

Según estudios estructurales de la PBP2⁵, el centro activo transpeptidasa de la PBP2 parece estar más cerrado si lo comparamos con cualquier PBP nativa, haciendo inaccesible al residuo de Serina del centro activo de la PBP2 al β -lactámico evitando la formación del complejo EI.

1.2.3 ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD CELULAR

1.2.3.1 SISTEMAS DE EXPULSIÓN ACTIVA

Los sistemas de expulsión activa se basan en la expulsión de solutos fuera de la célula. Son mecanismos innatos codificados cromosómicamente que encontramos tanto en bacterias susceptibles como en resistentes a los antibióticos¹⁵. La disminución a la sensibilidad antibiótica por sistemas de expulsión activa viene determinada por (i) el nivel de expresión del sistema de expulsión y (ii) modificaciones en las proteínas encargadas de la expulsión del soluto que las hacen más eficientes al transporte del sustrato. En cualquier caso, el fin es disminuir la concentración intracelular del antibiótico para llevarlo a concentraciones no mortales.

Los sistemas de expulsión activa pueden ser específicos de un sustrato o transportar una amplia gama distinta de compuestos, entre los sustratos susceptibles de se expulsados encontramos algunos β -lactámicos como el meropenem. Los niveles de resistencia que ofrecen estos mecanismos por sí mismos a los antibióticos muchas veces no son suficientes para considerar una cepa bacteriana resistente al tratamiento, pero sin duda influyen en el nivel de susceptibilidad de la misma.

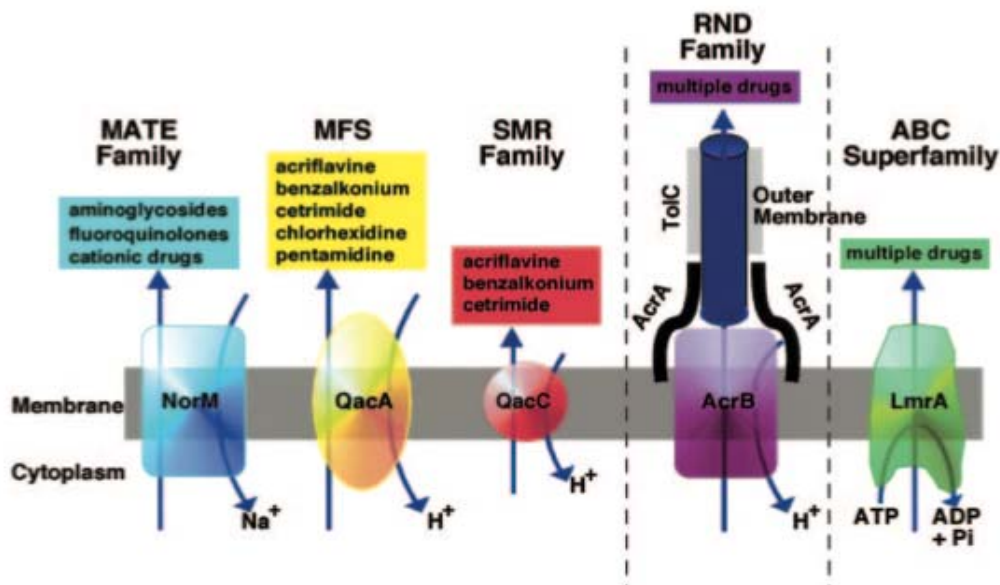


FIGURA 8. Principales familias de sistemas de expulsión activa, *Piddock, 2006*.

Unos de los sistemas de expulsión activa más conocidos son los sistemas Acr en *Enterobacteriaceae* y el sistema Mex de *P. aeruginosa*, ambos sistemas pertenecen a la familia RND (Resistance-Nodulation-Cell Division)¹⁶.

Los sistemas de expulsión activa de la familia RND son canales de membrana compuestos por tres tipos distintos de proteínas. Por ejemplo en *Escherichia coli* está formado por la proteína transportadora AcrB en la membrana interna, la proteína accesoria AcrA situada en el periplasma y el canal de membrana TolC que se encuentra situado en la membrana externa. En *P. aeruginosa* el sistema está compuesto por las proteínas MexA, MexB y OprM.

La organización de los genes que codifican para estos tipos de sistemas es similar en las especies que poseen los sistemas RND. Los genes se encuentran organizados como operones, el regulador se encuentra conectado en serie con la proteína accesoria periplásmica, la proteína transportadora y el canal de membrana.



FIGURA 9. Entorno genético del sistema de expulsión activa MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2.3.2 PORINAS DE MEMBRANA

En gram-negativos la toma de la mayoría de las sustancias solubles se hace por porinas de membrana que pueden ser inespecíficas de sustrato como OmpF en *E. coli* específicas de sustrato como OprD en *P. aeruginosa*¹². Estas porinas de membrana son utilizadas por los antibióticos para acceder al medio intracelular bacteriano, de modo que modificaciones de los patrones de expresión de estas porinas por parte de los microorganismos puedan repercutir en la sensibilidad antibiótica. En concreto, en el caso de *P. aeruginosa* los carbapenems acceden al medio intracelular por la porina OprD, de modo que en la práctica clínica es habitual encontrar cepas defectivas de la

expresión de OprD con sensibilidades a los carbapenems disminuidas pudiendo variar su CMI entre 8-32 $\mu\text{g/ml}$.

MODELO Mex-Opr de *Pseudomonas aeruginosa*

El nivel de resistencia a los antibióticos por *P. aeruginosa* viene determinado por la relación entre la baja permeabilidad de su membrana debida a porinas tipo OprD y a los sistemas de expulsión activa tipo MexAB-OprM¹⁵. La actuación en conjunto de estos sistemas son un mecanismo importante de resistencia a los β -lactámicos.

Los sistemas Mex-Opr más importantes en *P. aeruginosa* implicados en la resistencia a los antibióticos son MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM. La estructura de estos sistemas es común, el primer componente es una proteína localizada en la membrana citoplásmica (MexB, MexD, MexF y MexY, que opera como un bomba dependiente de energía que bombea una amplia gama de sustratos. El segundo componente es un canal externo de membrana (OprM, OprJ, OprN y OprM) y el tercero es una proteína que actúa de unión entre las otras dos (MexA, MexC, MexE y MexX).

A menudo el sistema MexAB-OprM sufre una sobreexpresión debido a mutaciones en la proteína represora MexR que regula la transcripción del sistema, esta alteración en el patrón de la expresión es frecuente encontrarla en aislados clínicos de *P. aeruginosa* con sensibilidad disminuida al meropenem.

Evento mutacional	Efecto en la susceptibilidad			
	carboxipenicilina	ceftazidima	imipenem	meropenem
Desrepresión de ampC β -lactamasa	r	R	-	-
Sobreexpresión de MexA-MexB-OprM	R	r/R	-	r
Pérdida de OprD	-	-	R	r
Sobreexpresión de MexE-MexF-OprN	-	-	r/R	r
Pérdida de OprD + sobreexpresión de MexA-MexB-OprM	R	R	R	R

TABLA 4. Contribución a la resistencia d antibiótica de las alteraciones de la permeabilidad en *Pseudomonas aeruginosa*, Livermore, 2001.

1.2.4 CARBAPENEMASAS

Las β -lactamasas¹⁷ son enzimas bacterianas que protegen a los microorganismos de la acción letal de los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenems). Las β -lactamasas atendiendo a su secuencia de aminoácidos (Clasificación propuesta por Ambler) pueden ser clasificadas en cuatro grupos moleculares: (i)Clase A, (ii)Clase B, (iii)Clase C y (iv)Clase D. Las β -lactamasas de la Clase A, C y D poseen en el centro activo un residuo de Serina, mientras que las de la Clase B son metalo-enzimas que se caracterizan por necesitar de iones de Zn^{2+} para su actividad catalítica y químicamente funcionan de manera distinta a las anteriores.

Los carbapenems son antibióticos resistentes a la hidrólisis de gran parte de las β -lactamasas, incluyendo las de espectro extendido (BLEA) y las β -lactamasas cromosómicas del tipo AmpC, aunque la mayoría de las β -lactamasas de la Clase B, junto con algunas de las Clases A y D tienen capacidad para degradarlos. Estas β -lactamasas con capacidad para degradar los carbapenems se conocen como

carbapenemasas¹⁸, las carbapenemasas son el mecanismo más eficaz desarrollado por los microorganismos para la resistencia frente a los carbapenems¹⁹.



Clasificación de Ambler	Nombre del enzima	Localización	Espectro de Hidrólisis						Inhibidor
			Penicilinas	Cefalosporinas de 1ª generación	Cefalosporinas de 2ª generación	Cefalosporinas de 3ª generación	Aztreonam	Carbapenems	
A	SME	Cromosómica	++	++	-	+	+	+	Ácido Clavulánico
	NMC	Cromosómica	++	++	-	+	-	++	
	IMI	Plasmídica	++	++	-	+	-	++	
	GES	Plasmídica	++	++	+	+	-	+	
	KPC	Plasmídica	++	++	-	++	+	++	
B	IMP	Plasmídica	++	++	++	++	-	++	EDTA
	VIM	Plasmídica	++	++	++	++	-	++	
	NDM	Plasmídica	++	++	++	++	-	+	
D	OXA-48	Plasmídica	++	++	+/-	+/-	-	+	NaCl
	OXA-181	Plasmídica	++	++	+/-	+/-	-	+	

TABLA 5. Perfil hidrolítico de las carbapenemasas de las Clases A, B y D, (++) Alto grado de hidrólisis, (+) medio, (+/-) parcial y (-) no hidrólisis, *Nordman et al, 2012.*

1.2.4.1 CARBAPENEMASAS DE LA CLASE A

1.2.4.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las carbapenemasas de la Clase A²⁰ (SME, NMC, IMI, KPC y GES) tienen la capacidad para degradar penicilinas, cefalosporinas y carbapenems y todas son inhibidas por ácido clavulánico. Son el grupo de enzimas dentro de las carbapenemasas más diverso genéticamente y con mayor distribución entre microorganismos, se han encontrado carbapenemasas de esta clase en los phylum *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* y las que tienen una mayor significancia clínica se han descrito en el grupo *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*.

1.2.4.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo por el cual los enzimas de la Clase A degradan β -lactámicos se conoce por el proceso de acilación-desacilación.

Las β -lactamasas de la Clase A, poseen un centro activo compuesto por tres dominios altamente conservados entre las distintas familias. El primer dominio conservado se conoce como la tétrada Ser70-X-X-Lys. El siguiente dominio conservado es el trio Ser130-Asp-Asn y el último dominio conservado lo forma un residuo de Glutamato conocido como Glu166.

El primer paso para la inactivación del β -lactámico se conoce como proceso de acilación y consta de las siguientes etapas:

1. El residuo del centro activo Glu166 desprotona una molécula de agua que se vuelve a protonar desprotonando a su vez el residuo de Ser70.
2. El residuo Ser70 que ahora se encuentra desprotonado tiene capacidad para ejercer un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del β -lactámico.
3. Como el átomo de carbono del grupo carbonilo no puede soportar más de 4 enlaces, rompe uno de los enlaces del doble enlace con el átomo de oxígeno

formándose transitoriamente un tetraedro inestable donde el grupo carbonilo cargado negativamente se une al carbono mediante un único enlace.

4. Como el átomo de oxígeno del grupo carbonilo es más estable en una conformación de doble enlace y el carbono no puede tener más de cuatro enlaces, el átomo de carbono carbonilo rompe su enlace con el átomo de Nitrógeno del anillo β -lactámico.

5. Para estabilizar el átomo de Nitrógeno del anillo β -lactámico roto, el residuo Ser130 le cede un protón.

6. El residuo Ser130 desprotona a la Lys del centro activo de la β -lactamasa y esta a su vez lo gana del residuo Glu166, dejando al residuo Glu166 con carga negativa como tenía antes de empezar el proceso 1.

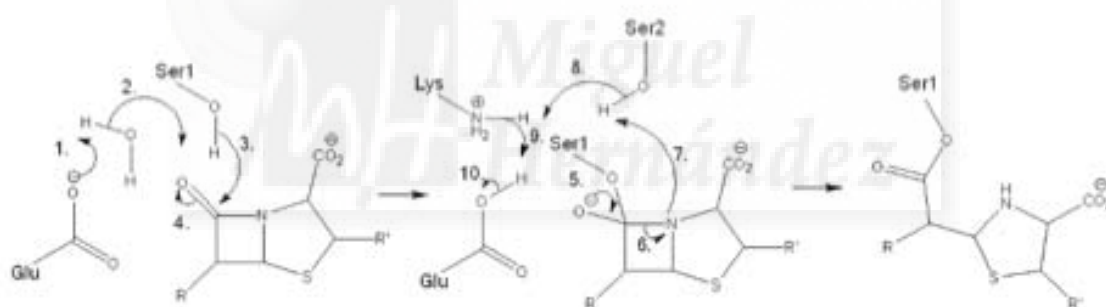


FIGURA 10. Esquema del proceso de acilación por parte de β -lactamasas de la Clase A.

Como resultado del proceso de acilación obtenemos un complejo conocido como acilenzima formado por la β -lactamasa de la Clase A unida por su residuo Ser70 al β -lactámico inactivado. La liberación del centro activo del enzima por el β -lactámico inactivado para regenerar enzima libre se conoce como proceso de desacilación y consta de las siguientes etapas:

1. El residuo Glu166 desprotona una molécula de agua, el agua desprotonada ataca al carbono del grupo carbonilo del β -lactámico inactivado

por el proceso de acilación que está unido al enzima.

2. El carbono del grupo carbonilo no puede soportar más de cuatro enlaces por lo que rompe su doble enlace con el átomo de oxígeno y forma un tetraedro inestable con el átomo de oxígeno en enlace simple.

3. Como el átomo de oxígeno es más estable en una configuración de doble enlace, el carbono del grupo carbonilo rompe el enlace con el residuo Ser70 del enzima y vuelve a formar un doble enlace con el átomo de oxígeno. De esta forma se consigue liberar el centro activo del enzima pasando de tener complejo acilenzima a la enzima libre y el sustrato inactivado.

4. El residuo Ser70 desprotona el residuo Glu166 para estabilizarse al mismo tiempo que deja al residuo Glu166 con carga negativa dejando todos los residuos en el estado original para volver a empezar el proceso.

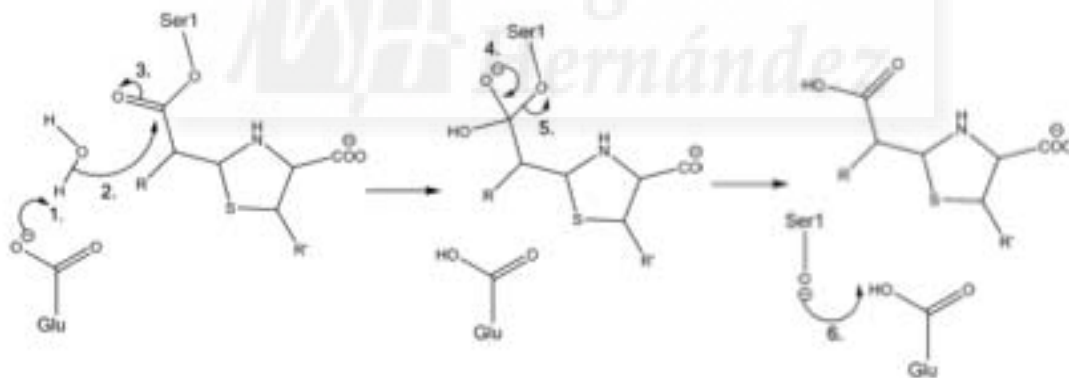


FIGURA 11. Esquema del proceso de desacilación por parte de β -lactamasas de la Clase A.

1.2.4.1.3 FAMILIAS DE CARBAPENEMASAS DE LA CLASE A

NMC/IMI/SME

Estas tres clases de enzimas están codificadas cromosómicamente y tienen capacidad para hidrolizar una amplia gama de sustratos incluyendo penicilinas, algunas cefalosporinas, aztreonam y carbapenems¹⁸.

La primera carbapenemasa de la Clase A identificada, SME fue en Inglaterra en 1982, en un aislado de *Serratia marcescens*, aunque las infecciones ocasionadas por *S. marcescens* productora de SME se han reducido a simples brotes puntuales.

Las enzimas IMI y NMC-A²⁰ se han detectado sobretodo en aislados de *Enterobacter cloacae*, comparten hasta el 97% de los aminoácidos y aproximadamente un 70% de los aminoácidos de SME y no se han encontrado elementos genéticos móviles asociados a estos genes, haciendo que su dispersión genética sea rara.

Bioquímicamente se ha demostrado que tienen capacidad para degradar imipenem con una $k_{cat} > 30 s^{-1}$ y meropenem con menores k_{cat}

Sustrato	SME			NMC-A			IMI		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m
Imipenem	104	202	0,51	1.040	92	11	89	170	0,52
Meropenem	8,9	13	0,68	12	4,4	2,7	10	26	0,38
Cefotaxime	<0,98	ND	ND	286	956	0,3	3,4	190	0,018

TABLA 6. Cinéticas de hidrólisis de SME, NMC, IMI para distintos antibióticos, Queenan & Bush, 2007.

GES

La familia GES²⁰ también conocida como Guiana Extended-Spectrum β -lactamase se descubrieron en el año 2.000, originalmente se consideraron como BLEA pero algunas variantes dentro de esta familia como GES-2, 4, 5, 6, 11 y 18 tienen actividad frente a los carbapenems y se consideran por ello carbapenemasas. Las enzimas dentro de la familia GES con actividad carbapenemasa todas tienen un residuo de Asparagina o de Serina en la posición 170.

Las carbapenemasas GES se han identificado en el grupo *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* y sus genes se encuentran codificados en plásmidos transferibles en forma de cassettes flanqueados por integrones de la clase I.

Sustrato	GES-4		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m
Imipenem	0,38	4,7	0,081
Meropenem	NA	NA	NA
Cefotaxime	17	700	0,024

TABLA 7. Cinéticas de hidrólisis de GES para distintos antibióticos, Queenan & Bush, 2007.

KPC

Todas las variantes de la familia KPC²⁰ (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) poseen actividad frente a todos los β -lactámicos incluyendo los carbapenema y se encuentran ampliamente distribuidas en el grupo *Enterobacteriaceae* aunque también se han descrito su presencia en *P. aeruginosa*.

Los genes blaKPC se encuentran en una gran cantidad de plásmidos transferibles, y se encuentran insertados en el trasposón Tn4401. Debido a la alta diseminación de este tipo de estructura genética, el grupo *Enterobacteriaceae* a sufrido un incremento brutal

en la resistencia antibiótica ya que en esta estructura también se pueden asociar otros genes que confieran resistencia a otros antibióticos no b-lactámicos.

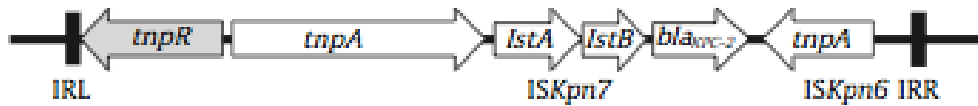


FIGURA 12. Esquema de la estructura genética Tn4401 asociada al gen blaKPC-2.

1.2.4.2 CARBAPENEMASAS DE LA CLASE B

1.2.4.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las carbapenemasas con relevancia clínica de la Clase B1²¹ (IMP, VIM, GIM, SIM, NDM y SPM) tienen capacidad para degradar penicilinas, cefalosporinas y carbapenems y debido a su mecanismo de acción dependiente de iones Zn^{2+} , se inhiben ante compuestos quelantes de iones divalentes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El principal grupo de microorganismos portadores de estas enzimas son el grupo *Enterobacteriaceae* aunque también se han descrito en *P. aeruginosa* y en *A. baumannii*.

1.2.4.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Las carbapenemasas de la Clase B1 poseen en su centro activo dos iones de Zn^{2+} combinados con dos moléculas de agua implicados en la hidrólisis del anillo b-lactámico. El primer ión de Zn^{2+} se encuentra rodeado por una estructura del tipo Histidina-Histidina-Histidina, mientras que el segundo se encuentra rodeado por una estructura Aspártico-Cisteína-Histidina.

El proceso de inactivación del anillo β -lactámico por parte de las carbapenemasas de la clase B1 consta de las siguientes etapas:

1. Ambos iones de Zn^{2+} interactúan con el oxígeno con carga negativa del grupo OH del Aspártico orientando al átomo de oxígeno para la siguiente reacción.
2. El grupo OH rompe las interacciones con los iones Zn^{2+} y ataca al carbono carbonilo del anillo β -lactámico rompiendo su doble enlace con el átomo de oxígeno y formando una estructura tetraédrica inestable.
3. Como el átomo de oxígeno del grupo carbonilo es más estable con doble enlace, el carbono rompe su enlace con el átomo de Nitrógeno del anillo β -lactámico y vuelve a formar un doble enlace con su grupo carbonilo además de añadir al carbono carbonilo el grupo OH del Aspártico.
4. Una nueva molécula de agua entra en el centro activo del enzima y se estabiliza con los iones Zn^{2+} .
5. El átomo de Nitrógeno del anillo β -lactámico al encontrarse con una carga negativa tras la ruptura de su enlace con el del carbono carbonilo, desprotona la molécula de agua para neutralizar su carga.
6. La molécula de agua al perder un protón formando el grupo OH cargado negativamente que se estabiliza entre los iones Zn^{2+} , de esta forma todos los residuos del centro activo del enzima vuelven a tener la misma conformación del principio de la reacción. El antibiótico inactivado sale del centro activo del enzima por difusión.

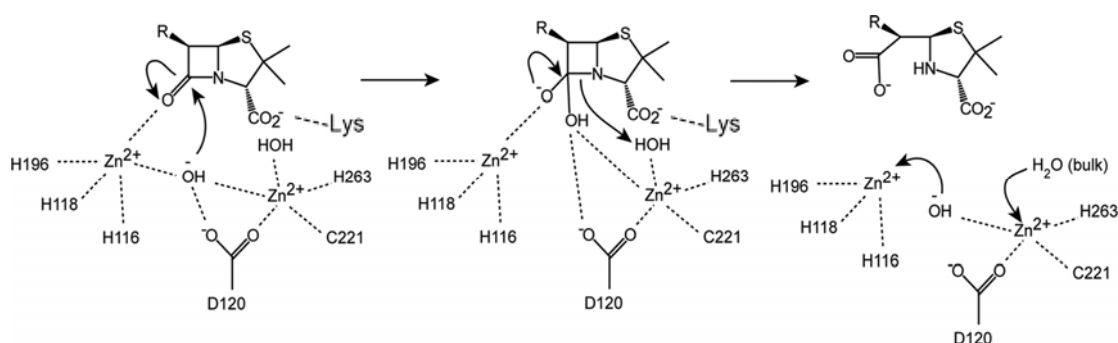


FIGURA 13. Esquema del proceso de inactivación del anillo β -lactámico por parte de carbapenemasas de la Clase B1.

1.2.4.2.3 FAMILIAS DE CARBAPENEMASAS DE LA CLASE B

IMP

El enzima IMP²¹ se descubrió por primera vez en Japón en 1.988 en un aislado de *P. aeruginosa*. El aislado tenía una CMI a imipenem de 50 $\mu\text{g/ml}$ y también era resistente a cefalosporinas de amplio espectro, el gen de resistencia IMP se encontraba situado en un plásmido conjugativo. Aunque a lo largo del tiempo la presencia de los genes IMP se han descrito también en los grupos *Enterobacteriaceae* y *A. baumannii*. Se conocen más de 47 variantes de enzimas IMP, situadas en cassettes de resistencia insertados entre integrones de la clase I y III, es un grupo con alta diversidad genética entre las distintas variantes en la que se pueden identificar tres clústeres de enzimas, sus cinéticas de degradación de carbapenems varían dependiendo de la variante genética.

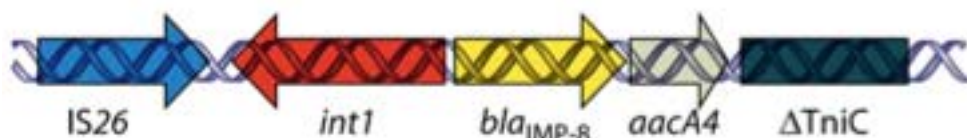


FIGURA 14. Esquema de la estructura genética de integrones de tipo I asociada al gen *blaIMP*, Diene & Rolain, 2014.

VIM

Las enzimas VIM²¹ (Verona Imipenemase) son unas de las más importantes dentro del las metalo-β-lactamasas. Se descubrieron en una cepa de *P. aeruginosa* que presentaba una CMI a imipenem >128 μg/ml, inhibición de su actividad por EDTA y restablecimiento de la misma al añadir iones Zn²⁺ al medio. Hidroliza todos los β-lactámicos excepto el aztreonam.

Se han descrito hasta la fecha 41 variantes y analizando su secuencia de aminoácidos se pueden observar dos clústeres de enzimas las que derivan de VIM-1 y las que derivan de VIM-2 aunque poseen una homología del 90%. Se han encontrado insertadas en plásmidos entre integrones de la clase I en forma de cassettes aunque también se han encontrado codificadas en el cromosoma bacteriano. La carbapenemasa VIM se encuentra ampliamente distribuida entre los grupos Enterobacteriaceae, sobretodo en *K. pneumoniae* y *E. coli* además de en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.



FIGURA 15. Esquema de la estructura genética asociada al gen blaVIM-1, Diene & Rolain, 2014.

NDM

La carbapenemasa NDM²¹ (Nueva Delhi Metallo-β-lactamase), se detectó por primera vez en 2008, en un aislado de *K. pneumoniae* de un paciente europeo que había estado hospitalizado en un hospital de Nueva Delhi. Desde su descubrimiento se ha observado una rápida diseminación a nivel mundial sobretodo en el grupo *Enterobacteriaceae* (*E. coli* y *K. pneumoniae*) aunque también se ha encontrado en *P. aeruginosa* y *A.*

baumannii. Hasta la fecha se conocen 15 variantes de este enzima (www.lahey.org) con capacidad para degradar todos los β -lactámicos excepto el aztreonam.

Se ha descrito la presencia del enzima en plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae* y el gen está flanqueado por la secuencia de inserción ISAb125 formando el trasposón Tn125, aunque también se ha descrito codificada cromosómicamente en *A. baumannii*. La presencia de NDM en un aislado clínico puede ir asociada a la presencia de otros genes de resistencia que producen resistencia a antibióticos no β -lactámicos como aminoglicosidos o macrólidos, haciendo que el tratamiento de infecciones producidos por estos microorganismos portadores de NDM sea un grave problema de salud pública.



FIGURA 16. Esquema de la estructura genética Tn125 asociada al gen *bla*_{NDM}, *Diene & Rolain, 2014.*

SPM

La carbapenemasa SPM²¹ (Sao Paulo Metallo- β -lactamasa) fue descubierta en un aislado clínico de *P. aeruginosa* en Sao Paulo. Si comparamos su secuencia de aminoácidos con el resto de familias de carbapenemasas de la Clase B, observamos que tienen una similitud del 35% de la secuencia con la familia IMP, aunque antes del centro del centro activo HFHLD posee una inserción de 24 aminoácidos. Esta inserción probablemente haga más accesible el centro activo a los β -lactámicos haciendo que aumente su tasa de hidrólisis. SPM puede degradar eficientemente todos los β -lactámicos excepto aztreonam.

El contexto genético de SPM es peculiar, ya que no se asocia ni con trasposones ni con integrones, el gen se encuentra flanqueado por regiones altamente conservadas

conocidas como CR implicadas en la regulación de su expresión y están implicadas en su proceso de movilización de la estructura genética.

SIM

La carbapenemasa SIM²¹ (Seoul Imipenemasa) se descubrió en Seoul (Korea) en un estudio de cepas resistentes a imipenem de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. En este screening la mayoría de los aislados que presentaron carbapenemasas de la clase B eran portadores de las familias VIM e IMP y un pequeño grupo de aislados fueron portadores de la familia SIM. La presencia de la carbapenemasa SIM se ha descrito en los grupos *P. aeruginosa* y *A. baumannii* y el gen se encuentra flanqueado por integrones de la clase I.

GIM

La carbapenemasa GIM²¹ (German-Imipenemase) se descubrió en Alemania en 2002 en cinco aislados clínicos de distintos pacientes en un hospital de Dusseldorf. Al analizar la secuencia de aminoácidos se observa que comparte un 43% de similitud con la familia IMP, seguida de la familia VIM con un 30%. Su perfil hidrolítico es muy similar al de IMP aunque un poco más débil. Se ha descrito los grupos *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* y el gen se encuentra insertado en plásmidos y flanqueado por integrones de clase I.

Sustrato	GIM			IMP-1			VIM-1			SPM-1		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m
Imipenem	27	287	0,09	46	39	1,2	2	1,5	1,3	33	37	1
Meropenem	2,7	25	0,11	50	10	0,12	13	48	0,27	63	281	0,22
Cefotaxime	1,1	4	0,24	1,3	4	0,35	169	247	0,68	16	9	1,9

TABLA 8. Cinéticas de hidrólisis de GIM, IMP, VIM y SPM para distintos antibióticos, Walsh et al, 2005.

1.2.4.3 CARBAPENEMASAS DE LA CLASE D

1.2.4.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las carbapenemasas de la Clase D²² son conocidas con el nombre de oxacilinasas y se encuentran englobadas en una única familia conocida como OXA. Los enzimas con relevancia clínica de la familia OXA se encuentran distribuida en el grupo *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y principalmente en *A. baumannii*²³. Hidrolizan la oxacilina de manera eficiente y además penicilinas, cefalosporinas de I, II y III generación y un cierto grupo de enzimas compuesto por 8 clusters de enzimas han demostrado cierta actividad hidrolítica a los carbapenems. Aunque la actividad hidrolítica de estos enzimas a los carbapenems es más baja que si la comparamos con los enzimas de la clase A y B, esa disminución de la sensibilidad a los carbapenems puede ser significativa a nivel clínico si se combina con otros mecanismos como alteración de la permeabilidad de la membrana.

1.2.4.3.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Su mecanismo de hidrólisis de los β -lactámicos²² es muy similar al de las carbapenemasas de la clase A basándose en un mecanismo de acilación-desacilación del β -lactámico ya que comparten el dominio Ser70-X-X-Lys en su centro activo. El proceso de inactivación del anillo β -lactámico por parte de las carbapenemasas de la clase D consta de las siguientes etapas:

El primer paso para la inactivación del β -lactámico se conoce como proceso de acilación y consta de las siguientes etapas:

1. El residuo Lys del centro activo desprotona el residuo Ser70.
2. El residuo Ser70 al ser desprotonado, se activa y hace un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo del anillo β -lactámico.

3. El carbono del anillo β -lactámico rompe su doble enlace con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo para formar un tetraedro inestable con el grupo OH de Ser70 y formar el complejo acil-enzima.
4. Como el átomo de oxígeno del grupo carbonilo es más estable en una configuración de doble enlace y el átomo de carbono no puede tener más de 4 enlaces, el átomo de carbono del grupo carbonilo del anillo β -lactámico rompe su enlace con el átomo de Nitrógeno para formar un doble enlace con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo.
5. Para estabilizarse, el átomo de Nitrógeno desprotona a la Lys del paso 1 y así esta recupera su conformación inicial.

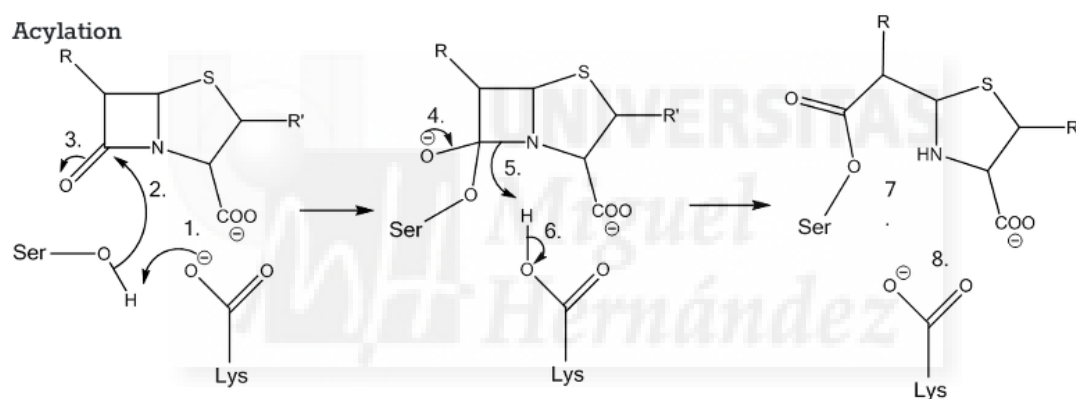


FIGURA 17. Esquema del proceso de acilación de β -lactámico por parte de carbapenemasas de la Clase D.

La liberación del centro activo del enzima por el b-lactámico inactivado para regenerar enzima libre se conoce como **proceso de desacilación** y consta de las siguientes etapas:

1. El residuo Lys del centro activo desprotona una molécula de agua en el centro activo.
2. La molécula de agua desprotonada, ataca el carbono carbonilo del b-lactámico inactivado unido al residuo Ser70 del centro activo para formar un

tetraedro inestable con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo unido al carbono por enlace simple.

3. El oxígeno del grupo carbonilo para estabilizarse vuelve a formar su doble enlace con el átomo de carbono que como un puede tener más de cuatro enlaces al mismo tiempo, rompe su unión con Ser70.

4. Ser70 se libera de su unión con el b-lactámico inactivado desprotonando el grupo hidroxilo de la molécula de agua que había atacado el carbono carbonilo y dejando así el centro activo del enzima libre.

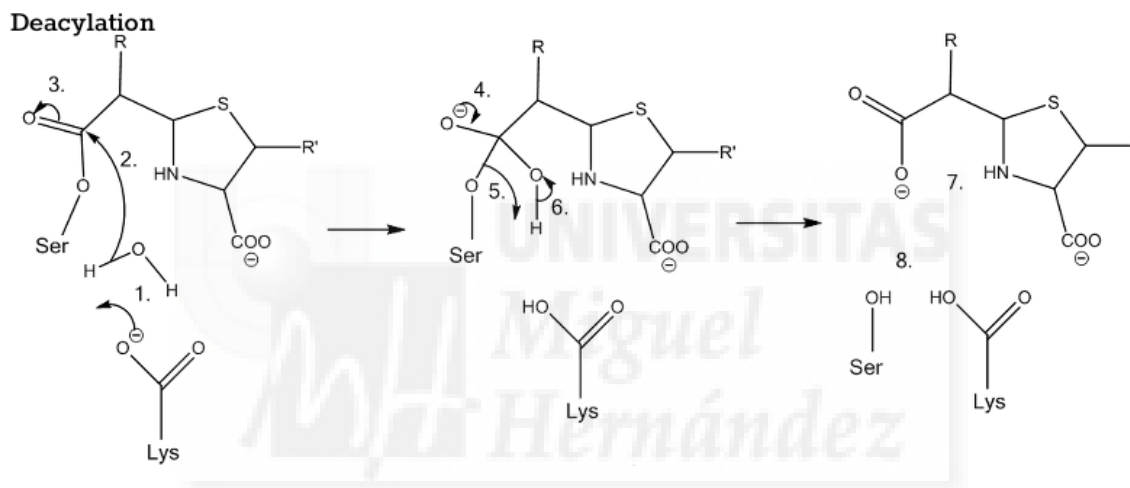


FIGURA 18. Esquema del proceso de desacilación de β-lactámico por parte de carbapenemasas de la Clase D.

1.2.4.3.3 FAMILIAS DE CARBAPENEMASAS DE LA CLASE D

OXA

Existen ocho subfamilias dentro de la familia OXA con capacidad para degradar carbapenems. La similitud entre las secuencias de aminoácidos de las variantes que componen cada subfamilia son superiores al 92% mientras que las similitudes en secuencia entre las subfamilias varían de un 40-70%.

Las subfamilias OXA-23, OXA-51, OXA-24, OXA-58²² se encuentran presentes en *P. aeruginosa* y de manera muy importante en *A. baumannii*, donde OXA-51 se puede encontrar en forma cromosómica y el resto se encuentran en forma plasmídica incluso se han detectado aislados donde se pueden encontrar al mismo tiempo²⁴.

La quinta subfamilia la forma OXA-55²², una carbapenemasa codificada cromosómicamente por un microorganismo ambiental, *Shewanella algae* por lo que en principio no tiene importancia clínica.

La sexta subfamilia la forma OXA-48²² que se encuentra ampliamente distribuida en el grupo *Enterobacteriaceae* y en menor medida en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Se cree que deriva de la OXA-54 cromosómica de *Shewanella spp.*. El primer reporte de una enterobacteria productora de OXA-48 fue en Turquía en 2003. Se encuentra localizada de forma plasmídica flanqueada por el trasposon Tn1999 y su tasa de transmisión entre enterobacterias es muy alta.

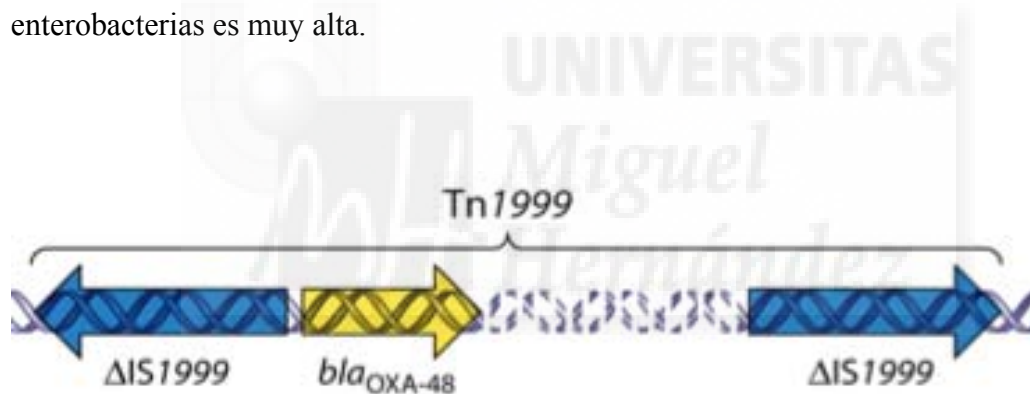


FIGURA 19. Esquema de la estructura genética Tn1999 asociada al gen blaOXA-48, Diene & Rolain, 2014.

La séptima y octava subfamilias la forman OXA-50 y OXA-60 codificadas cromosómicamente por *P. aeruginosa* y *Ralstonia pickettii*.

Sustrato	OXA-48		OXA-58	
	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Imipenem	2	145	0,1	13,5
Meropenem	0,1	0,5	<0,01	<0,15
Cefotaxime	10	58	-	-

TABLA 9. Cinéticas de hidrólisis de blaOXA para distintos antibióticos, Walther et al 2006.

1.3 DISEMINACIÓN GLOBAL ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.

El grupo *Enterobacteriaceae* son los microorganismos más frecuentes causantes de infecciones en humanos tanto adquirida en la comunidad como nosocomial y debido a que forman un parte muy importante del microbioma intestinal y su capacidad para transferir horizontalmente material genético hacen su dispersión entre humanos muy fácil²⁵.

Desde que a principios del año 2.000²⁶ se observó a nivel mundial un incremento de aislados clínicos de enterobacterias productora de BLEA capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos excepto los carbapenems, el aumento del uso de carbapenems para el tratamiento de infecciones se vio aumentado. Este incremento se ha visto seguido de un aumento de las tasas de aislamiento de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Este incremento se debe principalmente a 2 vías de dispersión²⁷:

1. Adquisición horizontal de genes codificantes de carbapenemasas.
2. Diseminación clonal de clones productores de estos enzimas exitosos.

1.3.1 DISTRIBUCIÓN GLOBAL DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS

Dentro de las carbapenemasas de la clase A, la variedad con más relevancia clínica y con un mayor éxito de diseminación ha sido el enzimas KPC. Se ha distribuido ampliamente por Estados Unidos, Sur América, países Europeos y China, siendo endémica la presencia de *K. pneumoniae* productora de KPC en Estados Unidos, Israel, Puerto Rico, Colombia, Grecia y China²⁸.

En el grupo de carbapenemasas de la clase B cabe destacar el éxito en la dispersión global de los enzimas IMP, VIM y NDM. Siendo el enzima NDM el que podría causar mayores problemas en el futuro a nivel clínico ya que se han identificado en clones de *E. coli* y *K. pneumoniae* tanto de origen nosocomial como de origen comunitario²⁸.

En cuanto al grupo D, el enzima más importante en enterobacterias es la OXA-48/181, cuya distribución también es a nivel global incluyendo países de Europa, países del sur y este del mediterráneo y África²⁸.

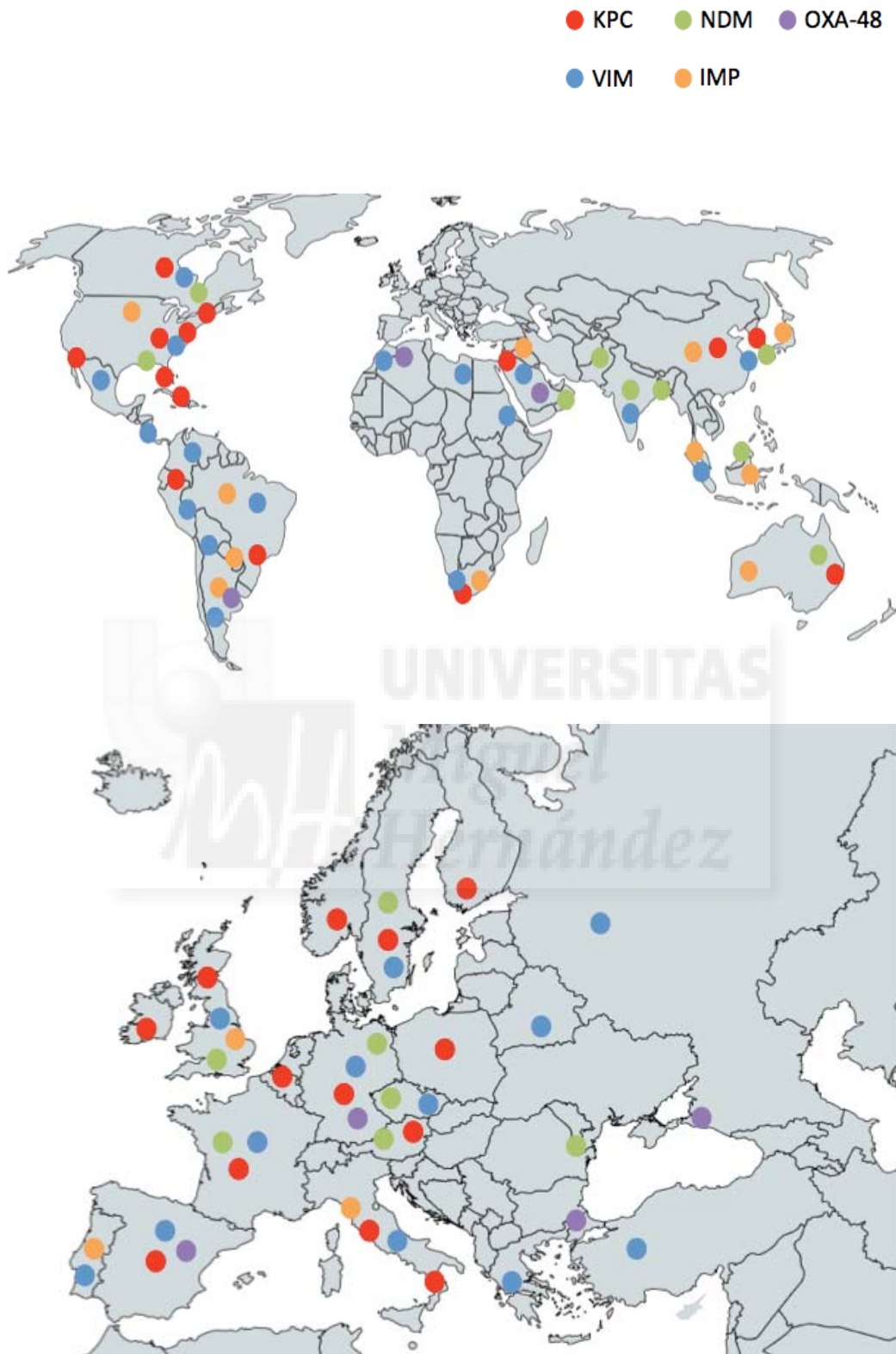


FIGURA 20. Distribución global de las carbapenemasas KPC, VIM, NDM, IMP y OXA-48.

1.3.2 FACTORES DE RIESGO PARA LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN POR CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS Y CONTROL DE LA DISPERSIÓN

Los principales factores de riesgo para la colonización e infección por estas cepas son el tiempo de estancia en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), la administración de antibioterapia de amplio espectro de forma prolongada, la cirugía, los procedimientos instrumentales invasivos y la inmunosupresión²⁵.

Las tasas de mortalidad en pacientes infectados por bacterias productoras de carbapenemasas puede llegar a estar entre el 18 y el 60% como por ejemplo en casos de infección por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas²⁹.

La capacidad de extenderse de forma rápida y eficaz por parte de estos microorganismos hace necesaria la existencia de sistemas de alerta precoz con el fin de frenar su diseminación³⁰. Para un adecuado control es necesario el cribado de la colonización intestinal en pacientes con sospecha clínica. El desarrollo de herramientas de diagnóstico microbiológico con capacidad de identificar estos microorganismos es necesario con el fin de frenar este problema³¹⁻³³.

Sustrato	Carbapenemasa		
	Clase A	Clase B	Clase D
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	+++	++
<i>Escherichia coli</i>	+/-	+/-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+/-	+/-	+
<i>Providencia spp.</i>		+/-	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+/-	+/-	
<i>Serratia marcescens</i>	+/-	+	
<i>Enterobacter spp.</i>	+/-	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+/-	+/-	
<i>Morganella morganii</i>		+/-	
<i>Salmonella enterica</i>	+/-		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+++	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+/-	
<i>Acinetobacter baumannii</i>		+	+++
<i>Acinetobacter spp.</i>		+	+

TABLA 10. Especies bacterianas y prevalencia de la producción de carbapenemasas (+++) frecuencia alta, (++) frecuencia media, (+) frecuencia baja, (+/-) ocasional, Miragou et al, 2010.

1.4 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS

La detección precoz y precisa de bacterias productoras de carbapenemasas por parte de los laboratorios de microbiología clínica es fundamental para el manejo de pacientes y para el control de la diseminación de microorganismos multirresistentes³⁰.

Existen distintas aproximaciones para el estudio e identificación de cepas productoras de carbapenemasas, entre las distintas metodologías empleadas se encuentran los métodos fenotípicos y los métodos moleculares^{30,31,34,35}.

1.4.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS

Los métodos fenotípicos³⁶⁻³⁸ son generalmente fáciles de realizar y de incorporar a la rutina de trabajo de un laboratorio de microbiología clínica, dentro de los métodos fenotípicos podemos distinguir entre métodos empleados para el screening de cepas productoras de carbapenemasas y métodos empleados para la confirmación de producción de carbapenemasas.

1.4.1.1 SCREENING DE CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS

Los dos métodos fenotípicos más utilizados en el screening de cepas productoras de carbapenemasas son el cálculo de la CMI a los carbapenems por microdilución en caldo y determinación del nivel de sensibilidad por el método de difusión con discos.

Por ejemplo, en el grupo de las enterobacterias siguiendo las indicaciones del European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST)³⁹⁻⁴² las CMI's de carbapenems para la sospecha de cepas productoras de carbapenemasas son $>0.12 \mu\text{g/ml}$ para ertapenem, $>1 \mu\text{g/ml}$ para meropenem y $>1 \mu\text{g/ml}$ para imipenem empleando la metodología de microdilución en caldo mientras que empleando la metodología de difusión en disco los diámetros alrededor del disco de carbapenem para la sospecha de cepas productoras deben ser $<25 \text{ mm}$ para ertapenem y meropenem y $<23 \text{ mm}$ para imipenem.

Esta metodología tiene la capacidad de detectar la mayoría de cepas productoras de carbapenemasas aunque dependiendo del carbapenem empleado los valores de sensibilidad y especificidad en la detección de cepas productoras de carbapenemasas pueden variar sobretodo si las cepas sometidas a estudio también son portadoras de otros sistemas como β -lactamasas de espectro extendido o ampicilinasas (ampC).

1.4.1.2 CONFIRMACIÓN PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS

Para la confirmación de la producción de carbapenemasas por parte de una cepa bacteriana, existen una serie de tests fenotípicos de confirmación que se pueden utilizar:

1. Tests espectrofotométricos.
2. Test de Hodge modificado.
3. Estudios de sinergia con doble disco.

1.4.1.2.1 TESTS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Consisten en la medición espectrofotométrica de la hidrólisis de los carbapenems, combinando este método con la presencia de inhibidores de cada grupo de carbapenemasas en extractos crudos o con enzimas parcialmente purificadas puede aportar información adicional sobre el tipo de carbapenemasa que posee una cepa en concreto. Entre otros métodos cabe destacar el método colorimétrico Carba NP³⁷ test (CNP) basado en la hidrólisis del anillo β -lactámico del imipenem, el viraje de amarillo a naranja del indicador Carba NP test indica producción de carbapenemasas por parte de la cepa problema.

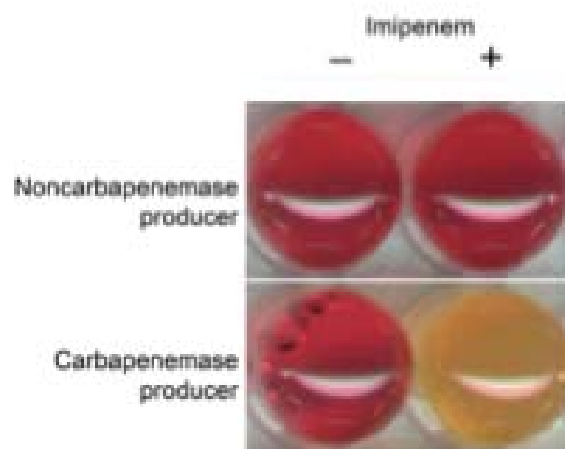


FIGURA 21. Carba NP test, el viraje de rojo a amarillo en la valoración de un extracto bacteriano confirma la presencia de un enzima con actividad carbapenemasa.

1.4.1.2.2 TEST DE HODGE MODIFICADO

El MHT³⁶ es el método fenotípico más empleado para la identificación de cepas productoras de carbapenemasas y hasta hace poco el método recomendado por el CLSI. El test se basa en la inactivación del carbapenem por una cepa, permitiendo a una cepa susceptible a los carbapenems utilizada como indicador de degradación del carbapenem crecer alrededor del inóculo de la cepa problema entrando dentro del halo producido por un disco de carbapenems si esta tuviera capacidad para degradar carbapenems.

La combinación de distintos mecanismos de resistencia por parte de la cepa a estudiar como producción de BLEA o ampC y alteraciones en la permeabilidad de la membrana pueden dar como resultado falsos positivos, así como falsos negativos si la carbapenemasa que posee la cepa a estudiar tiene una baja actividad *in vitro* frente a los carbapenems.

El MHT no es recomendado por EUCAST debido a que sus resultados son difíciles de interpretar, la especificidad es baja y en algunos casos también la sensibilidad.

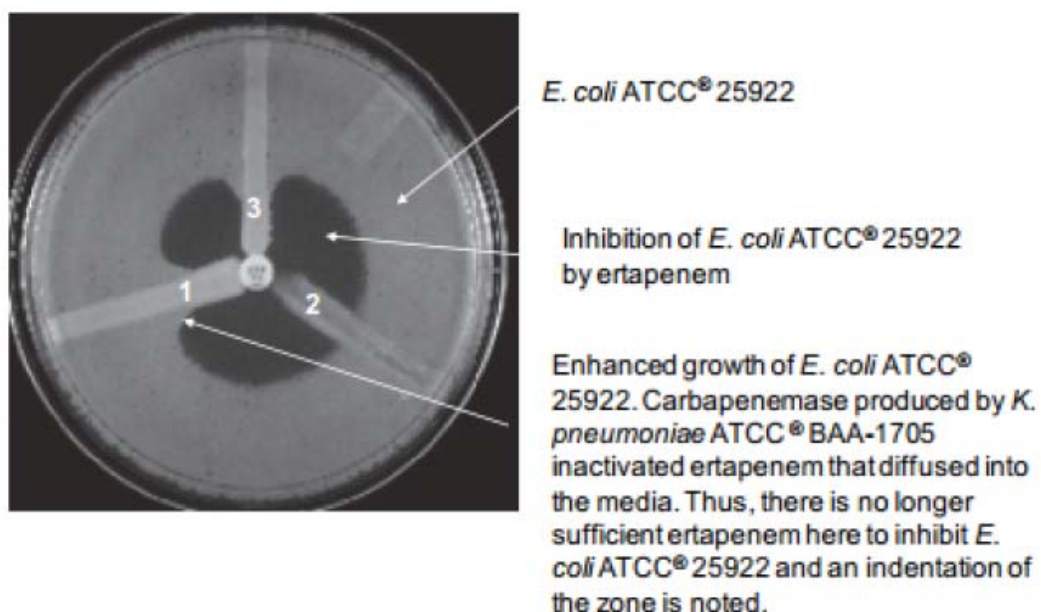


FIGURA 22. Tests de Hodge Modificado. Obsérvese las diferencias en el crecimiento de la cepa ATCC 25922 en los aislados 1 y 3 comparado con el aislado 2. Atendiendo a los resultados obtenidos por MHT se considerarían a los aislados 1 y 3 portadores de carbapenemasas.

1.4.1.2.3 ESTUDIOS DE SINERGÍA CON DOBLE DISCO

Dependiendo de la clase de carbapenemasa (A, B o D) su actividad es inhibida por inhibidores específicos, por ejemplo para las carbapenemasas de la clase A el inhibidor más importante es el ácido borónico, para las de la clase B los quelantes de iones divalentes como el EDTA y para la clase D el avibactam.

Empleando estrategias que combinen las diferencias en el grado de hidrólisis en presencia y ausencia de estos inhibidores se puede llegar a conocer si una cepa es portadora de carbapenemasa y a que clase pertenece dicha carbapenemasa. Estos estudios de sinergia se pueden hacer en distintos formatos aunque el más empleado es el conocido como sinergia de doble disco^{40,43}.

En esta metodología se utilizan parejas de discos en los cuales uno, solo contiene un tipo de carbapenem y otro contiene el mismo tipo de carbapenem más el inhibidor específico de la clase de carbapenemasa que queremos identificar. Se colocan en el centro de una placa de medio sólido Mueller Hinton y dependiendo de las diferencias en los diámetros del halo obtenido tras inocular en el medio de cultivo la cepa a evaluar se pueden conocer que clase de carbapenemasa porta.

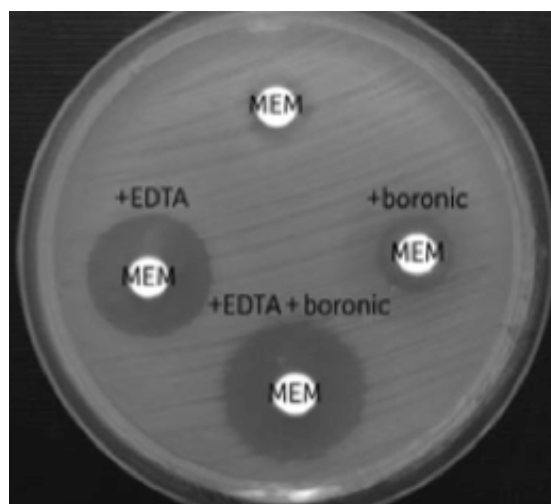


FIGURA 23. Estudio de Sinergia, obsérvese la diferencia en el diámetro del halo de inhibición generado entre el disco de meropenem (MEM) y el disco de MEM + EDTA, indicando presencia de carbapenemasa de la clase B.

1.4.2 MÉTODOS MOLECULARES

La capacidad para identificar de forma rápida y fiable cepas productoras de carbapenemasas podría tener un importante impacto en la capacidad de tomar decisiones clínicas correctas como las implicadas en el control de brotes o en el tratamiento de infecciones nosocomiales en situaciones críticas en las que aún no se dispone del antibiograma del patógeno³⁸.

Cada vez más se hace necesario el uso de nuevas herramientas en el diagnóstico capaces de una rápida identificación de la cepa implicada en el proceso así como la identificación directa o indirecta de su patrón de susceptibilidad identificando por ejemplo sus genes de resistencia. El espectro de tests de diagnóstico con capacidad para diagnosticar de manera rápida se reduce a los métodos moleculares.

Existen distintas aproximaciones en cuanto a métodos moleculares empleados en la detección de genes de resistencia y en concreto para la detección de genes asociados con resistencia antibiótica como las carbapenemasas. En concreto podemos encontrar ensayos basados en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (PCR a Tiempo Real)^{24,34,44-46} y en microarrays de ADN^{47,48}.

1.4.2.1 ENSAYOS BASADOS EN LA TÉCNICA DE LA PCR A TIEMPO REAL

La metodología más empleada en la detección de genes codificantes de carbapenemasas es la PCR a Tiempo Real empleando sondas Taqman. La PCR a Tiempo Real es una técnica que emplea la Reacción en Cadena de la Polimerasa combinando una pareja de oligonucleótidos que delimitan un amplicón y un tercer oligonucleótido que se sitúa en medio de los otros dos marcado con un fluoróforo en su extremo 5' y una molécula "quencher" en su extremo 3', conocido como sonda Taqman o sonda de hidrólisis, estos 3 oligonucleótidos tienen especificidad por la diana

específica permitiendo la identificación en este caso de genes codificantes de carbapenemasas.

Existen numerosos ensayos publicados para detectar los enzimas con más incidencia clínica aunque la mayoría no son completos ya que se centran en un número reducido de dianas debido a las características de la técnica. Entre los ensayos comerciales empleados en los laboratorios de microbiología clínica podemos destacar Xpert Carba⁴⁹ (Cepheid Solutions) que emplea el equipo GenExpert y tiene capacidad para detectar las carbapenemasas KPC, NDM, VIM, IMP-1 y OXA-48 o Check-Direct CPE^{50,51} (Hain) que detecta KPC, OXA-48, VIM y NDM.

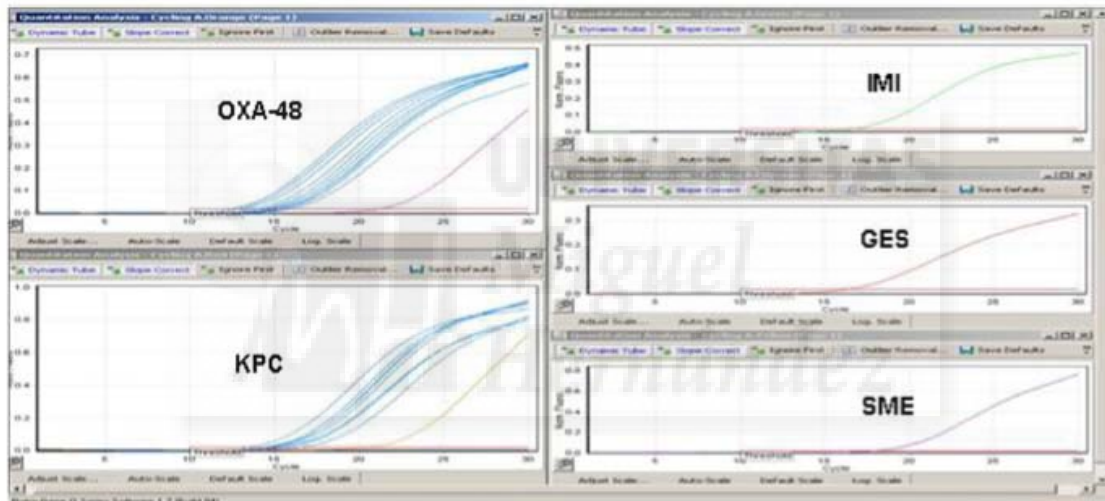


FIGURA 24. Detección por PCR a Tiempo Real de las carbapenemasas OXA-48, IMI, GES, SME y KPC.

1.4.2.2 ENSAYOS BASADOS EN ARRAYS DE ADN

Se basan en PCR e hibridación reversa en membrana. Su formato permite la detección de más dianas en una única reacción que con los sistemas de PCR a Tiempo Real, ya existen plataformas comerciales para la detección de BLEA y recientemente se han validado nuevos sistemas para la detección de cepas bacterianas portadoras de genes

codificantes para carbapenemasas como por ejemplo el sistema Check-MDR CARBA^{47,48} (Check-points).



FIGURA 25. Detección de carbapenemasas mediante el sistema basado en arrays de ADN.

1.4.2.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se basan en la hidrólisis del carbapenem como método confirmatorio de actividad carbapenemasa por parte de una cepa bacteriana. Para la detección de actividad carbapenemasa se emplea un extracto crudo de la bacteria y se incuba a 37°C durante 2-4 horas en una solución con meropenem o ertapenem. El sobrenadante se mide por MALDI-TOF^{52,53} (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time of Flight) para visualizar en el espectro los productos de degradación del carbapenem en presencia de actividad carbapenemasa. Es una metodología técnicamente más complicada que las aproximaciones anteriores y por lo tanto no puede ser incluido en el trabajo de rutina de un laboratorio de microbiología clínica.

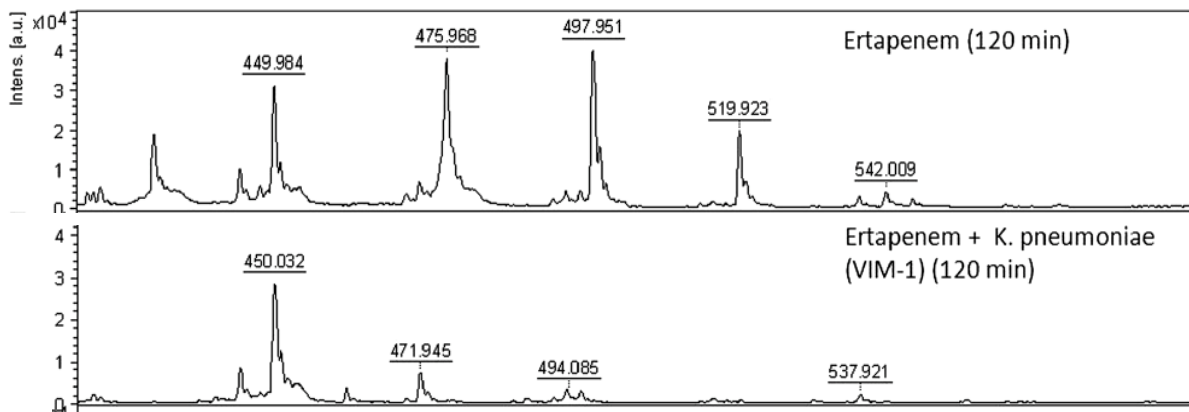


FIGURA 26. Espectro de degradación del ertapenem visualizado por MALDI-TOF por parte de *K. pneumoniae* productora de VIM-1.





2 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

Los carbapenems frecuentemente son considerados como los antibióticos de última línea frente a infecciones nosocomiales ocasionadas por microorganismos multirresistentes como las especies *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y el grupo *Enterobacteriaceae*. Desde principios del año 2000, la diseminación de enterobacterias productoras de BLEA adquiridas en la comunidad, ha sido un hecho a nivel mundial. La consecuencia de este fenómeno hizo que se incrementara el uso de carbapenems como tratamiento de estas infecciones y con ello, la resistencia a esta familia de antibióticos ha pasado a ser un problema importante en el tratamiento de infecciones graves.

Los mecanismos principales de resistencia a los carbapenems en gram-negativos pueden deberse a la modificación de la permeabilidad de la membrana externa o a la expresión de enzimas que degradan los carbapenems, las carbapenemasas. Las carbapenemasas son un grupo de β -lactamasas que también confieren resistencia frente a otros agentes β -lactámicos como penicilinas y cefalosporinas. Debido a que una gran mayoría de los genes que codifican para estas enzimas se encuentran en asociación con elementos genéticos móviles y ligados a la presión selectiva del incremento del uso de carbapenems, se puede explicar la exitosa diseminación entre microorganismos de los mismos. Debido a este fenómeno se ha observado un aumento mundial en las tasas de prevalencia de microorganismos gram-negativos resistentes a carbapenems, poniendo en peligro la utilidad de este grupo antibiótico como agente de última línea sobretodo en la infección nosocomial.

Uno de los principales problemas en el control de estos bacilos gram-negativos productores de carbapenemasas es la falta de herramientas útiles para el diagnóstico de los mismos en los laboratorios de microbiología clínica. Los estudios de susceptibilidad *in vitro* para este grupo de antibióticos nos aportan información parcial acerca de la producción de dichas enzimas por parte de la cepa bacteriana evaluada, además son lentos y difíciles de reproducir y la falta de unidad de criterio a la hora de interpretar los resultados (EUCAST-CLSI) los hacen difíciles para extrapolar resultados entre laboratorios. Todo esto hace difícil el control de estos microorganismos y hace

necesaria la inclusión en el laboratorio de microbiología clínica nuevas técnicas de diagnóstico precoz.

La aplicación de nuevas técnicas de diagnóstico clínico permitirá conocer la verdadera prevalencia de estos microorganismos que frecuentemente se asocian a infección nosocomial y logrará que aumente la efectividad de los programas de control y vigilancia del Sistema Nacional de Salud.

El siguiente trabajo diseña y evalúa un nuevo método molecular para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas basándose en la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real. Además, dada la poca información disponible sobre la prevalencia de dicho mecanismo de resistencia en España, la aplicación de este sistema al entorno hospitalario de dos hospitales representativos de la provincia de Alicante ha permitido conocer en que situación real nos encontramos en nuestra provincia.

2.2 HIPÓTESIS

El diseño de un nuevo sistema de diagnóstico molecular basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa permitirá detectar cepas bacterianas productoras de carbapenemasas.

2.3 OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es el diseño y validación de un sistema de diagnóstico molecular basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (*Carbaplex iD*) para la detección de microorganismos gram-negativos productores de carbapenemasas. Además del objetivo principal, se plantean otros objetivos secundarios como:

1. Conocer las tasas de resistencia a carbapenems en la provincia de Alicante.

2. Conocer la prevalencia de microorganismos gram-negativos portadores de carbapenemasas.
3. Identificar que carbapenemasas son las más frecuentes en la provincia de Alicante.
4. Identificar los clones circulantes productores de carbapenemasas en el entorno hospitalario.
5. Valorar el sistema *Carbaplex iD* respecto a métodos microbiológicos clásicos basados en el cultivo para la detección de pacientes colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas.
6. Adaptar el sistema *Carbaplex iD* a la plataforma comercial Sepsis Flow Chip.





3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES EMPLEADOS

1. **UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water**, Cat. No: 10977049. LifeTechnologies.
2. **Blue juice gel loading buffer 10x**, Cat. No: 10816-015. LifeTechnologies.
3. **Bolsas de esterilización en autoclave (150 mm x 320 mm)**. Advanced sterilizationproducts®. Johnson & Johnson.
4. **Bromuro de etidio (EtBr)**. Solución al 1%. AppliChem.
5. **Ultrapure™ Agarose 100g**. Cat. No: 15510-D19 LifeTechnologies.
6. **Novex TBE running buffer (5x)** Cat. No: LC6675. LifeTechnologies.
7. **1 kb plus dna ladder**, Cat. No: 10488-085. LifeTechnologies.
8. **Chelex® x-100**. Molecular Biology Grade Resin (50g). Cat. No: 142-1253. Bio-RadLaboratories.
9. **2-Deoxyadenosine 5'-Triphosphate. 100 mM Solution**, 100 µmol. Cat. No: 28406502 V 362868. Batch.
10. **2-Deoxycytidine 5'-Triphosphate. 100 mM Solution**, 100 µmol. Cat. No: 28406512 V 362869. Batch.
11. **2-Deoxyguanosine 5'-Triphosphate. 100 mM Solution**, 100 µmol. Cat. No: 28406522 V 362870. Batch.
12. **2-Deoxythymidine 5'-Triphosphate. 100 mM Solution**, 100 µmol. Cat. No: 28406532 V 362871. Batch.
13. **Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity**. Cat. No: 11304011. LifeTechnologies.
14. **RNase-free Microfuge Tubes (1.5 mL)**, Cat. No: AM12400. LifeTechnologies.
15. **EXPRESS qPCR Supermix, universal**, Cat. No: 11785200. LifeTechnologies.
16. **MicroAmp® Optical Adhesive Film**, Cat. No: 4311971. LifeTechnologies.
17. **MicroAmp® EnduraPlate™ Optical 96-Well Fast**, Cat. No: 4483485. LifeTechnologies.
18. **7.500 Real-Time PCR System**, Applied Biosystems.

19. **Glicerol 98%**. Cat. No: 24387. 292. VWR. Prolabo 1L Rectapur. International S.A.S.
20. **Lisozima**. AppliChem BioChemica. Chemica Sintesis Services.
21. **Medio Mueller Hinton broth**. Difco.
22. **Medio Mueller Hinton agar**. Difco.
23. **Medio Columbia blood agar with 5% blood ship**. Difco.
24. **Sensi-Disc™ Susceptibility Test Disc Ertapenem**, Cat. No: 232171. Becton Dickinson
25. **Sensi-Disc™ Susceptibility Test Disc Meropenem**, Cat. No: 231704. Becton Dickinson.
26. **Sensi-Disc™ Susceptibility Test Disc Imipenem**, Cat. No: 231644. Becton Dickinson.
27. **Placas de Petri estériles 10 cm**. Soria gen lab
28. **Asas de siembra estériles**. Copan Innovation.
29. **Barrier (Filter) Tips, 10 µl size** Cat. No: AM12640. LifeTechnologies.
30. **Barrier (Filter) Tips, 100 µl size** Cat. No: AM12648. LifeTechnologies.
31. **Barrier (Filter) Tips, 1000 µl size** Cat. No: AM12665. LifeTechnologies.
32. **QIAamp®DNA Mini Kit (50)** Cat. No. 51304. Qiagen.

3.2 PCR A TIEMPO REAL

La PCR a Tiempo a Real o PCR Cuantitativa (qPCR)⁵⁴⁻⁵⁷ es una herramienta molecular que permite la detección y cuantificación de moléculas de ADN y cADN. Esta técnica está basada en la PCR convencional donde teóricamente en la amplificación exponencial del ADN el número de moléculas sintetizadas se duplica a cada ciclo. En la PCR Cuantitativa la cantidad de ADN es medida después de cada ciclo a través de marcadores de fluorescencia. La cantidad de fluorescencia aumentará de forma directamente proporcional al número de nuevos amplicones generados. Estos cambios de fluorescencia son medidos por un instrumento que combina las capacidades de un termociclador y de detección de fluorescencia. Mediante la representación de la fluorescencia frente al número de ciclo en la que se ha detectado, se genera una gráfica que representa la acumulación de producto a lo largo de la reacción de amplificación.

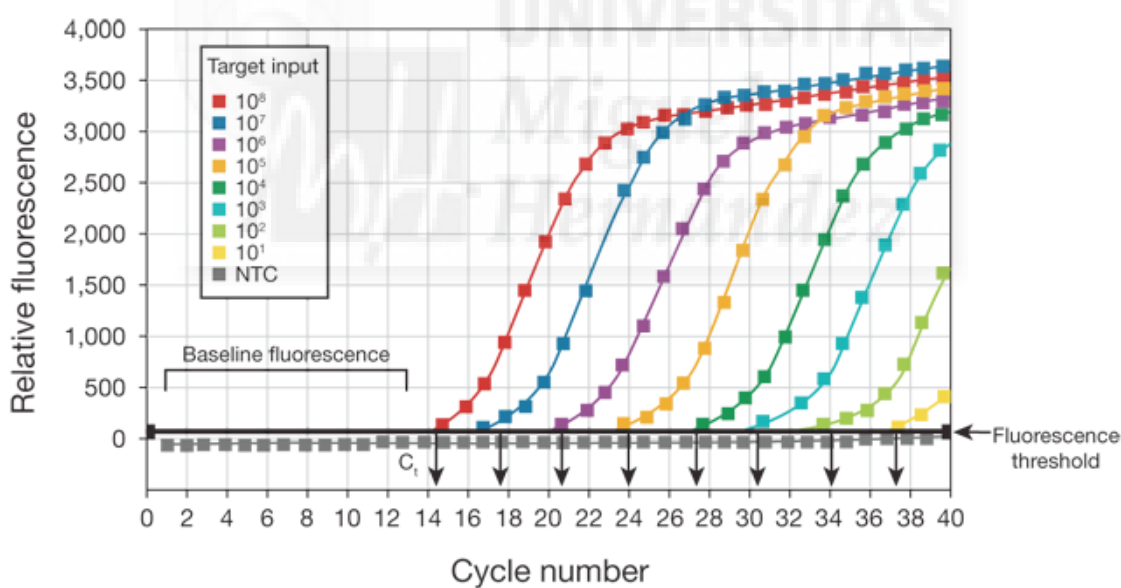


FIGURA 27. Detección de una diana por PCR a Tiempo Real, obsérvese los distintos valores de Ct dependiendo de la concentración de la diana a detectar.

Las ventajas de la qPCR son: (i) la posibilidad de monitorizar el proceso de la reacción en tiempo real, (ii) la capacidad de medir la cantidad de amplicones en cada ciclo que permite además, conocer la cantidad de material de partida, (iii) la detección de dianas específicas en formato multiplex, (iv) un amplio rango de detección y sensibilidad, (v)

la amplificación y la detección ocurren en un mismo tubo, lo cual elimina la manipulación de la muestra post-amplificación y aumenta la velocidad del proceso y (vi) un mayor rango de amplificación, de entre cinco a seis órdenes de magnitud, comparado con los dos o tres órdenes que se consiguen en la PCR convencional.

Las moléculas encargadas de emitir la fluorescencia más empleadas son las moléculas de SYBR Green o las sondas TaqMan⁵⁸. El reactivo SYBR Green detecta ADN bicatenario al intercalarse entre la doble hélice lo cual la especificidad del mismo no es muy alta ya que se une a cualquier hebra de doble cadena presente en la reacción sin tener en cuenta la secuencia nucleotídica.

Las sondas TaqMan permiten aumentar la especificidad mediante el empleo de sondas internas que se unen específicamente a la secuencia. Estas sondas se encuentran marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un grupo capaz de absorber la fluorescencia emitida por el fluoróforo, que recibe el nombre en inglés de *quencher*. En aquellos ensayos donde se emplean este tipo de sondas, la secuencia de ADN de interés y la sonda, que es complementaria, hibridan entre sí. Cuando la polimerasa comienza a copiar la hebra molde desde el extremo 3' del cebador, la sonda es degradada por su actividad 5' exonucleasa haciendo que el fluoróforo y el quencher se separen produciendo un incremento en la fluorescencia.

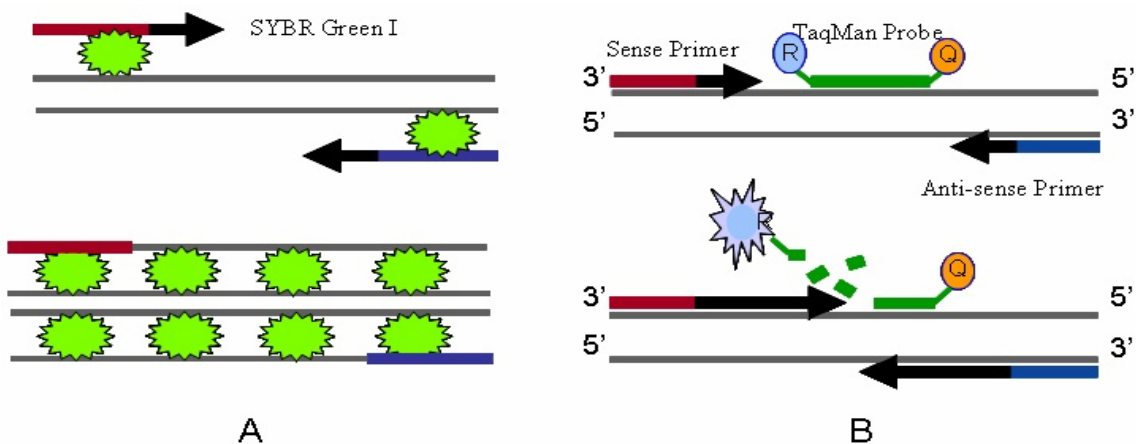


FIGURA 28. Moléculas empleadas en la qPCR como emisores de fluorescencia. A) SYBR Green se une a las dobles cadenas de ADN que van sintetizándose en cada ciclo. B) Las sondas TaqMan se unen a la cadena de ADN. El quencher (Q) absorbe la fluorescencia que emite el fluoróforo (R) hasta que se produce la extensión en esa zona; la sonda es degradada y se produce la emisión de fluorescencia.

Para el correcto análisis de los resultados obtenidos mediante qPCR es necesario tener en cuenta algunos parámetros⁵⁵:

1. Baseline: El término *baseline* hace referencia a la señal de fluorescencia detectada durante los primeros ciclos de la amplificación. Es equivalente al ruido de fondo.
2. Threshold o umbral: El umbral en la reacción de qPCR es el nivel de señal detectado que refleja de forma estadísticamente significativa un incremento en la fluorescencia. Sirve como indicador de la amplificación verdadera sobre el ruido de fondo. Normalmente, el umbral se sitúa de forma automática cuando la desviación de la fluorescencia es diez veces superior a la desviación de la fluorescencia detectada en el baseline, sin embargo este parámetro es modificable por el usuario.
3. Valor Ct: El valor Ct o ciclo Ct es el ciclo en el que la señal de fluorescencia supera el umbral. El Ct se emplea para calcular la cantidad de ADN inicial ya que es inversamente proporcional a la cantidad de ADN molde de partida. A menos concentraciones de ADN inicial, mayor es el valor de Ct y viceversa. En diluciones seriadas en base diez, la diferencia de Ct entre dos valores consecutivos es de aproximadamente 3,3 ciclos.
4. Curva estándar: Mediante una muestra de concentración conocida a partir de una serie de diluciones se realiza una curva estándar, donde para cada cantidad de ADN se observa un valor de Ct. A partir de esta curva estándar es posible conocer la concentración de la muestra problema según el Ct que presente la misma.

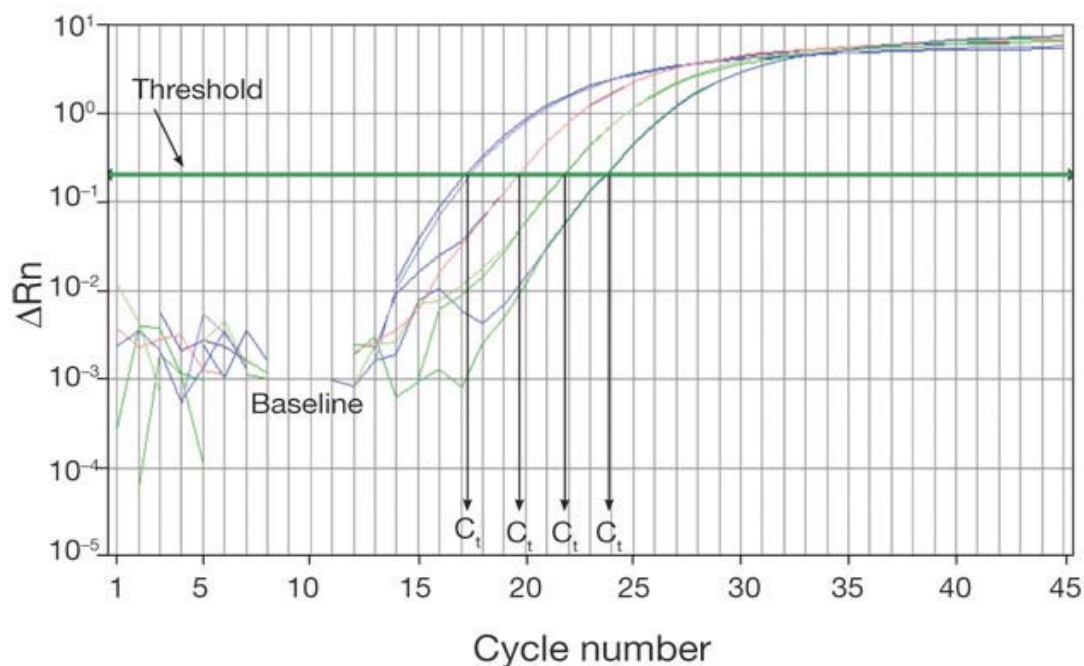


FIGURA 29. Gráfica de amplificación por qPCR donde se muestran sus parámetros analíticos típicos: baseline, threshold o umbral y valores Ct.

3.3 DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN SISTEMA DE PCR A TIEMPO REAL MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE CARBAPENEMASAS EN MICROORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS

La finalidad de este estudio es el diseño y evaluación de un sistema de PCR a Tiempo Real Multiplex (*Carbaplex iD*) para la detección de cepas productoras de carbapenemasas, con el fin de desarrollar una herramienta de diagnóstico molecular robusta, rápida y precisa con capacidad para implantarse en la rutina de un laboratorio de diagnóstico de microbiología clínica.

3.3.1 DISEÑO BIOINFORMÁTICO DE CEBADORES Y SONAS TAQMAN DE PCR A TIEMPO REAL EMPLEADOS EN EL SISTEMA *Carbaplex iD*.

3.3.1.1 SELECCIÓN DE DIANAS

Para el diseño de cebadores de PCR a tiempo real para la detección de genes codificantes de carbapenemasas se seleccionaron los genes con más relevancia clínica según la bibliografía (Class A carbapenemases, Carbapenemases: the versátiles β -lactamases, Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases and OXA-type carbapenemases).

Se emplearon los números de referencia de acceso a las secuencias registradas en la base de datos de GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) indexadas en la base de datos *Lahey Clinic β -Lactamase Classification* (<http://www.lahey.org/Studies/>), Massachusetts Medical Care. Los genes detectados por el sistema *Carbaplex iD* y empleados para el diseño de cebadores y sondas Taqman se encuentran recogidos en la tabla 11.



Clase Molecular	Gen	Alelo
A	blaGES	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.
	blaSME	1, 2, 3, 4 y 5
	blaKPC	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23
	blaNMC	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9
B	blaVIM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 y 46
	blaGIM	1 y 2
	blaSPM	SPM
	blaNDM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16
	blaSIM	SIM
	blaIMP	1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 15, 19, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 30, 40, 41, 42 y 47
D	blaOXA-23-like	23, 27, 49, 73, 133, 146, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171 y 225
	blaOXA-24-like	24, 25, 26, 40, 72, 139 y 160
	blaOXA-48-like	48, 162, 163 y 181
	blaOXA-51-like	51, 60, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 128, 130, 131, 132, 138, 144, 148, 149, 150, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 195, 196, 197, 194, 200, 201, 202, 203, 206, 208 y 223
	blaOXA-55	OXA-55
	blaOXA-58-like	58, 96, 97 y 164
	blaOXA-62	OXA-62
blaOXA-182	OXA-182	

TABLA 11. Genes y alelos detectados por el sistema *Carbaplex iD*.

3.3.1.2 ESTUDIOS FILOGENÉTICOS DE LOS GENES CODIFICANTES DE CARBAPENEMASAS

Para la identificación de genes codificantes de carbapenemasas por PCR a Tiempo Real, debido a la baja similitud genética entre las distintas familias de estos genes fue imprescindible el estudio filogenético de todos los genes y alelos incluidos en el diseño. Todos los estudios filogenéticos se hicieron con el programa CLC sequence viewer 6.0 y constaron de dos partes:

1. Alineamiento del tipo progresivo de todas las secuencias de los alelos para cada gen incluido en el diseño con el fin de identificar regiones genéticas altamente conservadas entre los distintos alelos del mismo gen para el diseño de cebadores y sondas Taqman. Se empleó el algoritmo *ClustalW* utilizando los parámetros *Gap open cost* de 10,0 y *Gap extensión cost* de 1,0.
2. Obtención de la secuencia consenso de nucleótidos para cada gen a detectar por el sistema de PCR a Tiempo Real obtenida a partir del alineamiento progresivo de todos los alelos para cada gen.

3.3.1.3 SECUENCIAS CONSENSO EMPLEADAS PARA EL DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS DEL SISTEMA *Carbaplex iD*.

Las secuencias consenso obtenidas de los alineamientos masivos de los alelos de cada gen identificados por el sistema de PCR a tiempo real se encuentran recogidas en el Anexo I.

3.3.1.4 DISEÑO DE CEBADORES-SONDAS TAQMAN DEL SISTEMA *Carbaplex iD* Y PCR A TIEMPO REAL

Una vez identificadas las regiones génicas altamente conservadas descritas en el apartado anterior, se llevó a cabo el diseño de cebadores y sondas TaqMan del sistema *Carbaplex iD*. Se llevaron a cabo mediante la agrupación de diferentes dianas reacciones singleplex o multiplex. Estas reacciones de amplificación permiten detectar

de una a tres dianas en una sola reacción de PCR a Tiempo Real. Las combinaciones de dianas llevadas a cabo se recogen en la tabla 12.

Para el diseño de los cebadores y las sondas TaqMan empleadas en cada una de las reacciones multiplex, se empleó el software *Beacon Designer 8.0*⁵⁹ (Premier Biosoft, <http://www.premierbiosoft.com>). Estos fueron diseñados empleando como secuencia diana la secuencia consenso para cada gen, que fue generada mediante el alineamiento de los alelos descritos para cada uno de ellos. Las condiciones de PCR fueron diseñadas para ser idénticas en todos los genes.

Para el diseño de los cebadores y sondas taqman se cumplieron las normas recomendadas por los creadores del software *Beacon Designer 8.0* (http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html):

1. Temperatura de alineamiento: La temperatura de alineamiento (T_m) de los cebadores debe ser de entre 58°C-60°C y ambos cebadores han de tener la misma. La T_m de la sonda Taqman debe ser 10°C inferior a la T_m de los cebadores.
2. Longitud de cebadores: La longitud de los cebadores debe ser entre 15pb y 30pb.
3. Contenido en GC: El contenido ideal de GC debe oscilar entre 30%-80%.
4. Presencia de nucleótidos G y C en los extremos 3': El número de nucleótidos G y C en el extremo 3' de los cebadores no debe ser mayor de dos. Esto es debido a que de esta forma en estas regiones se genera inestabilidad evitando así uniones inespecíficas.
5. Longitud del amplicón: La longitud máxima del amplicón no debe sobrepasar las 400pb, siendo lo ideal entre 50-150pb.
6. Repeticiones: Con el fin de preservar el adecuado porcentaje de GC, no es recomendable que las sondas tengan repeticiones de nucleótidos G o C.

Además, se recomienda una mayor prevalencia de C respecto de G y omitir en la medida de lo posible el nucleótido G en el extremo 5'.

Una vez diseñados los cebadores y sondas Taqman se comprobó la similitud de su secuencia con la de cada alelo incluido en el diseño para cada gen identificado por el sistema *Carbaplex iD* y en aquellos cebadores o sondas Taqman donde se vio que existía alguna discrepancia entre la secuencia consenso y la secuencia de los alelos a detectar se degeneró dicha base para obtener de este modo unos cebadores o sondas Taqman con capacidad mayor para la detección de las dianas de interés.

En la tabla 13 se recogen los cebadores y sondas diseñados por el software *Beacon Designer 8.0* para la identificación de genes codificantes para carbapenemasas.



Reacción Multiplex	Dianas detectadas	Fluoróforo empleado
1	OXA-23-like	CY5
	OXA-51-like	TAMRA
	OXA-58-like	JOE
2	OXA-48-like	CY5
	OXA-182-like	TAMRA
3	OXA-62-like	CY5
	OXA-55-like	TAMRA
	OXA-24-like	JOE
4	KPC	CY5
	SME	TAMRA
	NMC	JOE
5	GES	CY5
6	IMP-3-like	CY5
	IMP-15-like	TAMRA
	IMP-19-like	JOE
7	VIM	CY5
	GIM	TAMRA
	SPM	JOE
8	NDM	CY5
	SIM	TAMRA

TABLA 12. Reacción multiplex y dianas detectadas por el sistema *Carbaplex iD*.

Diana	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Sonda Taqman (5'-3')	Posición	Tamaño
KPC	TTGGCTAAAGGGAAACAC	CGACGGCATAGTCATTTG	CATACVCTCCGCAGGTTCCG	624-745	122
SME	GGGAATGTTCTCAATGCTA	CACCTACAACCCAATCAG	CGAGCATCACCAGTTGTATTACCTT	598-709	112
NMC	ACCCATCACAACATAAATAAAG	CGTTCAAGRATAATATTAGTAGCA	AGCDGCAGCAGCCATATCAC	321-425	105
GES	CTCTGTGAGTCGGCTAGA	GCGTAGTTGTATCTCTGA	AGYCGGAGATGAICGACAACAC	456-533	78
IMP-3-like	GCATCTGWATTAACAAATG	CCACTACGTTATCTKGAG	TGTGGCTTGAACCTTACCGTCT	346-490	145
IMP-15-like	GCATCTGWATTAACAAATG	CCACTACGTTATCTKGAG	AGCCAATAGCTAVCTCCGCT	346-490	145
IMP-19-like	GCATCTGWATTAACAAATG	CCACTACGTTATCTKGAG	TTAACTAGCCAATARCTAACTCCGC	346-490	145
VIM	TCCGRCTTACCAGATTG	CACGCTGTATCAATCAAA	CAACTCATCACCATCACGGACAA	131-260	130
GIM	TGGAGTATATCTTCATACCTC	CTTCGTGTCTTCTTCAGA	AGGCTTGATTATTATCCAGAACTACCA	93-222	130
SPM	CTTCGAATGTCTTAGTAGC	TCGGCTTCATAGTCTTAG	ACCGTTGTCATTGTCTCTTCGC	176-292	117
NDM	GCCCAATATTATGCACCC	GTCGCCAGTTTCCATTTG	CTGAGCACCGCATTAGCCGC	9-129	121
SIM	GGCTTAGTAGTTCTTGACA	CTTCCATTGACAGTGAAATC	ATTCATCGACACTCCAGCTTCC	157-272	116
OXA-23-like	TCGGTAATGCTGAAATTG	CTGTGTATGTGCTAATTGG	AACTCTACCTCTTGAATAGGCGTAACC	455-564	110
OXA-24-like	GTGGGAGAAAGATATGACTTTA	TCGACCTGTGTTCCAATA	TGTCAGCAGTTCCAGTATATCAAGAGC	363-512	150
OXA-48-like	GTTGGAATGCTCACTTTAC	TTCGCCCGTTTAAGATTA	AATCCTTGCTGCTTATTCTCATTCCA	89-188	100
OXA-51-like	CCTTCAAAATGCTTAATGC	TAGGGTCATGTCCTTTTC	CACCATAAGGCAACCACCACAG	242-360	119
OXA-55	AAGCGAGTACTGACTATATYATTC	CAGGTTAACGGCGAAATAG	CGTCCAACCTCCAACCAACCGA	665-789	125
OXA-58-like	TGAGCATAGTATGAGTCG	TGACCATCATATGTGACA	TTCCACAAGTGAATAACTCAATCATCG	60-188	129
OXA-62	CGATCATTCCCTGGGATG	GAGACGACCTGATAGCAG	CCGCGACGCATCAAGAAGTCTG	335-443	109
OXA-182	CCACAAGTAGGTTGGTTAA	CCCTAAATTTTCTAACGACTTA	AGAACCAGACATTCTTGCTTCATT	679-819	140

TABLA 13. Cebadores empleados por el sistema *Carbaplex iD*. Se muestran los genes diana, las secuencias para el cebador sentido y antisentido y las secuencias de las sondas TaqMan para cada una de las dianas. También se indica la posición y longitud del amplicón sintetizado.

3.3.2 CONDICIONES DE TRABAJO DE LA PCR A TIEMPO REAL MULTIPLEX DEL SISTEMA *Carbaplex iD*

Cada cepa bacteriana sometida al estudio de identificación de genes codificantes para carbapenemasas se sometió a las 8 reacciones de PCR a tiempo real con el fin de identificar si la cepa era portadora de alguna de las dianas de interés. Para ello se emplearon concentraciones específicas de cebadores y sondas de PCR a tiempo real típicas para cada reacción de PCR. En la figura 30 se muestra la distribución en una placa de PCR a tiempo real cada una de las muestras maestras necesarias para el análisis de una cepa o muestra biológica problema.

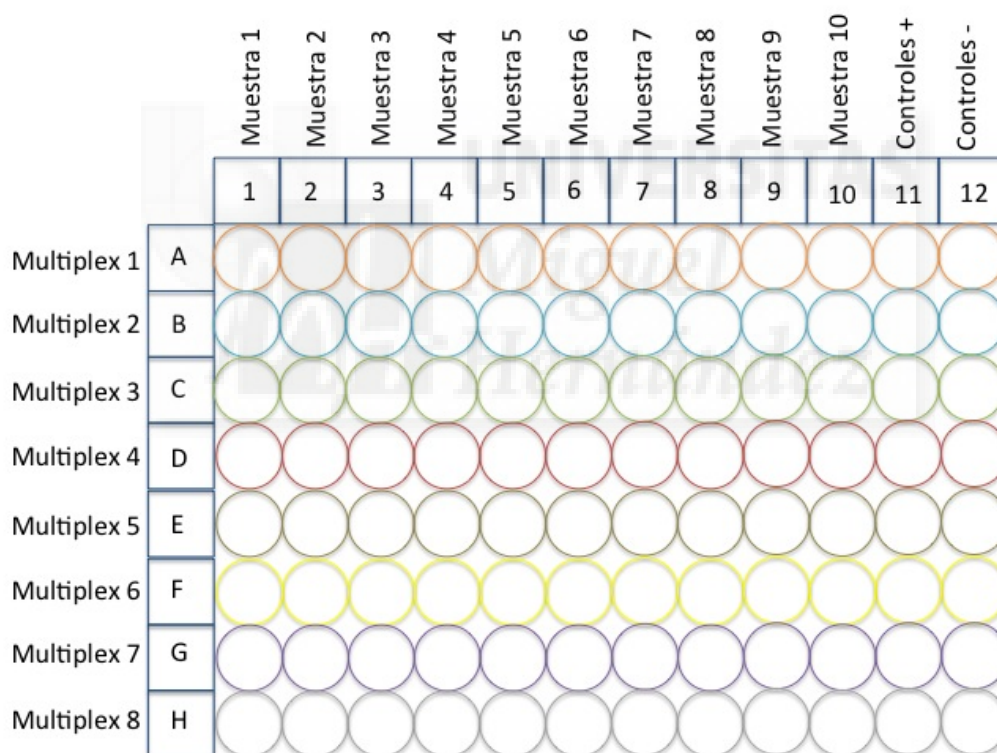


FIGURA 30. Distribución de reacciones multiplex del sistema *Carbaplex iD* en la placa de PCR a Tiempo Real. En filas se distribuye cada multiplex distinta y en columnas se aplica una cantidad determinada de muestra para su análisis.

El volumen final por reacción multiplex fue de 20 μ l de los cuales 19 μ l fueron de mezcla maestra y 1 μ l de ADN de la cepa bacteriana o muestra biológica sometida a la

determinación. Las concentraciones óptimas de cebadores y sondas para cada mezcla maestra de cada reacción se recogen en la tabla 14.

3.3.2.1 EQUIPO Y SOFTWARE EMPLEADO

El ensayo se optimizó en el equipo de PCR a tiempo real modelo *7.500 Real-Time PCR System*⁶⁰ con la versión de software v2.0.6 de la casa comercial *Applied Biosystems* y los reactivos y material fungible necesarios como las mezclas maestras compatibles con el equipo y placas de PCR para el desarrollo de la PCR a Tiempo Real fueron los recomendados por la casa comercial para el equipo de termociclador de PCR a Tiempo Real en cuestión, todo el listado de materiales necesarios se encuentra recogido en el apartado de *Materiales empleados*.

3.3.2.2 PROGRAMA DE PCR A TIEMPO REAL EMPLEADO

El programa de PCR empleado constó de un primer paso de 2 minutos a 50 °C, seguido de otro paso de 2 minutos a 95°C y seguido de 40 ciclos de 95°C 15 segundos y 60 °C 1 minuto, tomando medidas de fluorescencia durante cada ciclo en el paso de 60 °C. En la figura 31 se muestra un esquema del programa de PCR empleado.

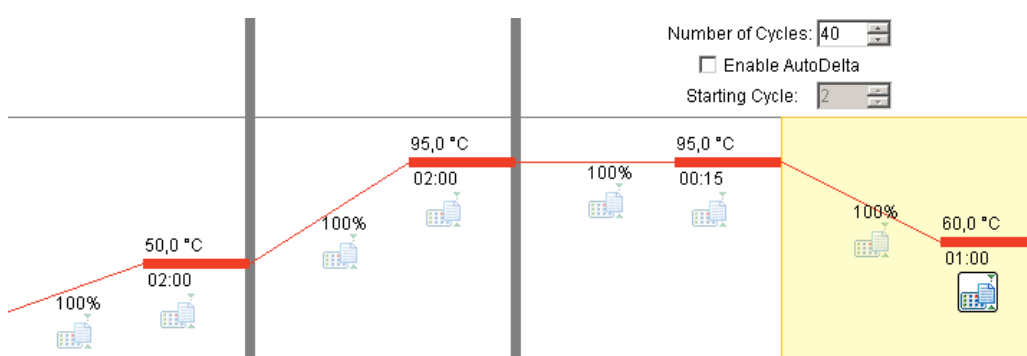


FIGURA 31. Programa de PCR a Tiempo Real empleado por el Sistema *Carbaplex iD*.

3.3.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se consideró como resultado positivo (muestra portadora de alguna diana detectada por el sistema *Carbaplex iD*) las muestras que en cualquiera de las dianas analizadas, en su curva de amplificación su señal de fluorescencia supere el valor predefinido *Threshold* de 0,2 antes del ciclo 40 de PCR. Por el contrario se considerará como resultado negativo (muestra no portadora de genes codificantes de carbapenemasas) las muestras que en ninguna de las dianas analizadas la intensidad de fluorescencia de su curva de amplificación superen el valor predefinido *Threshold* de 0,2.



Reacción Multiplex	Dianas detectadas	Express qPCR supermix (μ l)	Cebador sentido (12 pmol) (μ l)	Cebador antisentido (12 pmol) (μ l)	Sonda Taqman (4,5 pmol) (μ l)	Agua libre de nucleasas (μ l)	Volumen final (μ l)
1	OXA-23-like	10	0,6	0,6	0,6	3,6	19
	OXA-51-like		0,6	0,6	0,6		
	OXA-58-like		0,6	0,6	0,6		
2	OXA-48-like	10	0,6	0,6	0,6	5,4	19
	OXA-182-like		0,6	0,6	0,6		
3	OXA-62-like	10	0,6	0,6	0,6	3,6	19
	OXA-55-like		0,6	0,6	0,6		
	OXA-24-like		0,6	0,6	0,6		
4	KPC	10	0,6	0,6	0,6	3,6	19
	SME		0,6	0,6	0,6		
	NMC		0,6	0,6	0,6		
5	GES	10	0,6	0,6	0,6	7,2	19
6	IMP-3-like	10	0,6	0,6	0,6	6	19
	IMP-15-like				0,6		
	IMP-19-like				0,6		
7	VIM	10	0,6	0,6	0,6	3,6	19
	GIM		0,6	0,6	0,6		
	SPM		0,6	0,6	0,6		
8	NDM	10	0,6	0,6	0,6	5,4	19
	SIM		0,6	0,6	0,6		

TABLA 14. Volúmenes de reactivos y concentraciones necesarias para el funcionamiento del sistema *Carbaplex iD*.

3.3.4 CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE LA EFICIENCIA DE REACCIÓN DEL SISTEMA *Carbaplex iD*

El límite de detección y la eficiencia de la reacción⁶⁰ son parámetros que se engloban dentro de la sensibilidad analítica de una prueba diagnóstica y están relacionados con la capacidad de detección de la misma sobre la variable o variables de interés. En este caso, la sensibilidad analítica de la PCR multiplex a Tiempo Real es la mínima cantidad de cada uno de los genes de interés que es capaz de detectar. Para el cálculo de la sensibilidad analítica, y en este caso los parámetros límite de detección y eficiencia de cada una de las reacciones del sistema *Carbaplex iD* es necesario tener en cuenta algunos conceptos:

1. Límite de detección: Es la menor concentración o cantidad de la muestra a amplificar detectable con razonable certeza con un procedimiento analítico determinado. En este caso, se trata de la mínima concentración de ADN necesaria para que el instrumento proporcione una señal significativamente diferente de una muestra que no contiene la diana a detectar considerada blanco, en la figura 32 se encuentra representado el concepto de límite de detección.
2. Eficiencia de la reacción: La eficiencia de la PCR multiplex a Tiempo Real
3. es el ratio con el cual los amplicones son generados a lo largo de la reacción de amplificación y que de forma general se expresan como un valor de porcentaje. Si un amplicón determinado dobla su cantidad en cada uno de los ciclos, la eficiencia de la PCR es del 100%.

Para la calcular la eficiencia de la reacción de PCR es necesaria conocer la pendiente de la recta patrón. Una pendiente de -3.32 indica que la reacción se ha llevado a cabo con un 100% de eficiencia. Pendiente más negativas que -3.32 indican que la reacción ha ocurrido por debajo del 100% de eficiencia y pendientes mayores que -3.32 indican problemas en la calidad de las muestras o errores de pipeteo. El cálculo de la eficiencia puede variar de forma significativa si no se sigue el protocolo de medida de forma rigurosa. Además,

las medidas para calcular la pendiente de la recta de calibrado deben por lo menos contener un rango de entre cinco o seis diluciones seriadas. Por último, la eficiencia puede verse afectada por sustancias que inhiban la reacción. La fórmula empleada para el cálculo de la eficiencia es la siguiente:

$$\text{Eficiencia} = \left(10^{-\frac{1}{\text{Pendiente}}} - 1 \right) \times 100$$

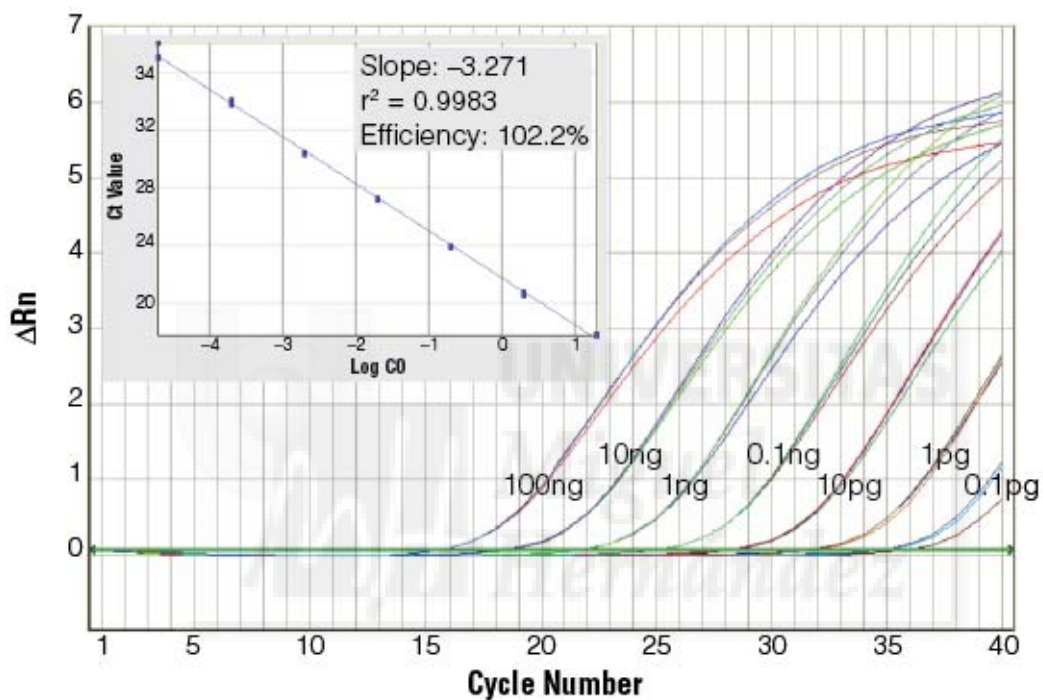


FIGURA 32. Cálculo de la eficiencia de la reacción de PCR a Tiempo Real.

Por tanto, para determinar la sensibilidad analítica de la prueba diagnóstica es necesario hacer una recta patrón o recta de calibrado donde dentro de la linealidad será posible calcular el límite de detección de ADN o número de copias de la diana mínima necesaria para la detección de la misma.

3.3.4.1 REALIZACIÓN DE LA RECTA PATRÓN

Para llevar a cabo la recta patrón para la determinación de los límites de detección y eficiencia de reacción para cada reacción del sistema *Carbaplex iD*, se emplearon diluciones seriadas de cultivos bacterianos de cepas que contenían cada una de las dianas específicas detectadas por el sistema. En la tabla 15 se muestran las cepas empleadas para la realización de la recta patrón, para ello se empleó una cepa como representante de cada gen codificante para carbapanemasas.

Para la realización de los cultivos bacterianos se reactivó cada cepa en medio Columbia blood agar incubándola 24 horas a 37 °C en una estufa. A continuación se resuspendió una colonia en 1 mililitro de suero fisiológico y mediante un turbidímetro se ajustó su absorbancia hasta un valor aproximado de 0,1 cuya equivalencia es de $1 \cdot 10^8$ UFC/ml, a continuación se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución 1/10 y se seleccionaron los tubos que teóricamente contenían $1 \cdot 10^8$ a $1 \cdot 10^1$ UFC/ml que posteriormente se utilizaron para el aislamiento de su ADN total.

Para la extracción del ADN se empleó el extractor automatizado EasyMag y el protocolo de extracción genérico, empleando un volumen de muestra de entrada de 1 ml y un volumen de muestra eluida de 100 μ l. De Esta forma se obtuvieron las rectas patrones para cada una de las cepas de interés empleadas en la determinación de límite de sensibilidad y eficiencia de la PCR para cada diana detectada por el sistema *Carbaplex iD*.

Una vez llevada a cabo la amplificación por el sistema *Carbaplex iD*, se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos a partir de la amplificación representando los valores de Ct (ciclo en el cual la señal de fluorescencia supera el umbral, descrito anteriormente) frente al logaritmo de la cantidad de dianas presente en cada punto de la recta patrón. De esta forma se generó una función semilogarítmica que fue la recta patrón o estándar, de donde se conoció la concentración mínima de la diana presente en la reacción capaz de ser detectada por el sistema (límite de detección) y de donde se dedujo la pendiente de la recta patrón empleada para el cálculo de la eficiencia para cada diana dentro de su reacción multiplex.

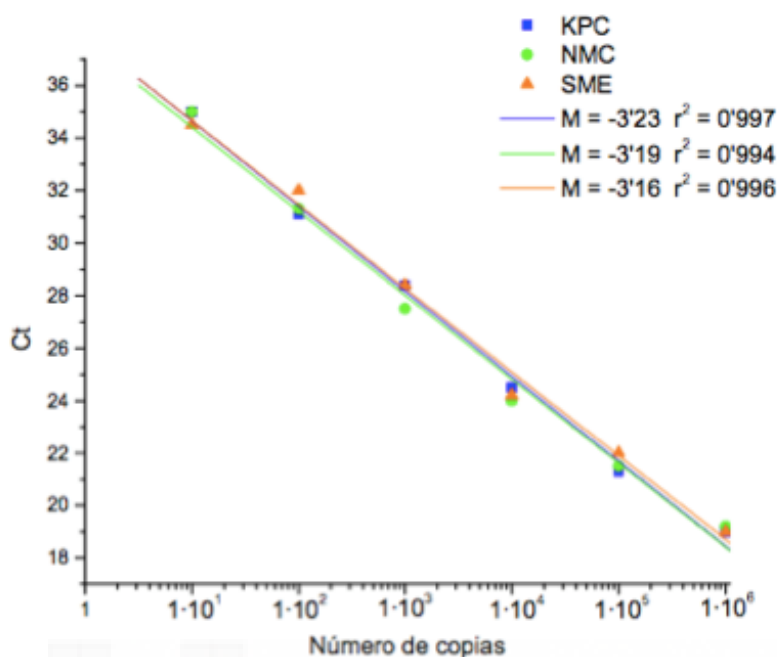


FIGURA 33. Ejemplo de recta patrón o recta de calibrado. Se observa que por debajo de una concentración de $1 \cdot 10^1$ copias/ μ l de la diana a detectar no se detecta amplificación. Además conociendo la pendiente de la recta patrón obtenida se puede calcular la eficiencia de la reacción.

3.3.5 VALIDACIÓN CLÍNICA DEL SISTEMA *Carbaplex iD* EN DISTINTOS SETS DE MUESTRAS

Para la validación del sistema se han empleado tres sets o conjuntos de muestras previamente caracterizadas en cuanto a producción o no de carbapenemasas e identificación de los genes implicados en dicha producción mediante una técnica gold estándar concreta en cada caso.

La validación del sistema se llevó a cabo siguiendo un diseño experimental del tipo “Evaluación de una prueba diagnóstica”. La validez de una prueba diagnóstica⁶¹⁻⁶³ es la capacidad de dicha prueba para detectar correctamente la presencia o ausencia del carácter de interés. Esta validez viene determinada por una serie de parámetros matemáticos que son obtenidos mediante la comparación de los resultados obtenidos

por la prueba diagnóstica y una prueba de referencia o Gold Standard. En el presente trabajo los parámetros determinados son la Sensibilidad, la Especificidad y Razones de Verosimilitud Positiva y Negativa⁶⁴ (CP+ y CP-), los Valores Predictivos Positivo (VPP) y Negativo (VPN). Para este fin, se han empleado dos conjuntos de muestras diferentes:

1. Una colección de cepas bien caracterizadas que recoge cepas productoras de carbapenemasas; controles positivos, y cepas no productoras de carbapenemasas; controles negativos. Además, estas cepas presentan una gran variedad en cuanto a los genes productores de carbapenemasas y una gran variedad de especies bacterianas con el fin de tener la máxima representación posible en cuanto a cepas y genes para la realización del estudio. Mediante esta colección de cepas se pretenden calcular los parámetros de Sensibilidad y Especificidad además de CP+ y CP- de la prueba diagnóstica *Carbaplex iD*.
2. Una colección de cepas aisladas del trabajo de rutina de los servicios de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche y Hospital General Universitario de Alicante entre el periodo de junio-noviembre de 2013. Sobre esta colección se llevó a cabo la identificación de presencia o ausencia de carbapenemasas. Al tratarse de cepas obtenidas en la rutina de diagnóstico durante un determinado periodo de tiempo, la prevalencia de cepas productoras de carbapenemasas fue el reflejo real de la situación de cada hospital pudiendo así calcular los VPP y VPN para el sistema *Carbaplex iD*.

Además, también se ha empleado un tercer set de muestras en las que se ha analizado la capacidad del sistema para su aplicación en muestras como exudado rectal y comparación de los resultados obtenidos contra un Gold Standard establecido como son la utilización de medios de cultivo selectivos empleados en el screening de portadores rectales de cepas productoras de carbapenemasas.

3. Colección de exudados rectales obtenidos del servicio de UCI del Hospital General Universitario de Alicante de pacientes con ventilación mecánica entre el periodo de octubre de 2013 y octubre de 2014. Los resultados obtenidos permiten conocer la validez del sistema *Carbaplex iD* comparado con la técnicas de microbiología clásica de elección en estos casos como son el cultivo de microorganismos en placas selectivas cromogénicas para la identificación pacientes colonizados por organismos productores de carbapenemasas.

Todo el proceso realizado de validación de la prueba diagnóstica con cada uno de los conjuntos de muestras ha sido desarrollado mediante el planteamiento de tres experimentos independientes que se detallan a continuación:

3.3.5.1 EXPERIMENTO 1. CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y RAZONES DE VEROSIMILITUD DEL SISTEMA *Carbaplex iD*

Para llevar a cabo una evaluación de la prueba diagnóstica se empleó una colección de cepas genéticamente caracterizadas respecto a la producción de carbapenemasas y genes asociados a las mismas. A partir de los resultados obtenidos sobre la capacidad de discriminación de la prueba diagnóstica entre cepas productoras y no productoras de carbapenemasas se calcularon los parámetros de Sensibilidad, Especificidad y Razones de Verosimilitud. Estos parámetros de validación son independientes de la muestra a tratar, es decir, no dependen de la probabilidad de presentación del carácter de interés sino que dependen de las características de la prueba diagnóstica definiendo así la calidad de la misma^{61,62}.

3.3.5.1.1 SENSIBILIDAD

La sensibilidad de una prueba diagnóstica es la capacidad de la misma de identificar correctamente un determinado carácter en aquellas muestras donde se encuentra presente. Hace referencia al porcentaje de muestras positivas correctamente diagnosticadas entre el total de muestras y la capacidad de la prueba para detectar un

positivo cuando este está presente. La sensibilidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{VP}{PT} \times 100$$

VP: Valores Positivos dados por la prueba diagnóstica

PT: Positivos Totales (PT= Positivos+ Falsos negativos)

El intervalo de confianza al 95% de la sensibilidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$IC_{95\%} = Se \pm 1.96 \sqrt{\frac{Se(1-Se)}{n}}$$

Los valores que puede tomar la sensibilidad se encuentran en el rango 0-100. Cuando más alto es el valor de sensibilidad, mejor capacidad de detección presenta la prueba diagnóstica y menor es el número de falsos negativos.

3.3.5.1.2 ESPECIFICIDAD

La especificidad hace referencia a la habilidad de una prueba diagnóstica para no detectar la presencia del carácter de interés en las muestras que no lo poseen, es decir, la probabilidad de detectar resultados negativos de aquellas muestras son negativas. La especificidad viene determinada por la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{NT} \times 100$$

VN: Valores Negativos dados por la prueba diagnóstica

NT: Valores Negativos totales (NT=Negativos + Falsos positivos)

Para calcular el intervalo de confianza de la especificidad se emplea la siguiente fórmula:

$$IC_{95\%} = Es \pm 1.96 \sqrt{\frac{Es(1-Es)}{n}}$$

Al igual que la sensibilidad, los valores de especificidad pueden encontrarse entre 0% y 100% siendo a mayor valor de especificidad, menor la frecuencia de falsos positivos. A mayor especificidad y sensibilidad, mayor es la utilidad de una prueba diagnóstica.

La razón de verosimilitud es el cociente entre la probabilidad de obtener un determinado resultado en las muestras positivas para un determinado carácter de interés y la probabilidad de obtener ese mismo resultado en muestras que no lo presentan. Existen dos tipos de razón de verosimilitud: la razón de verosimilitud positiva (CP+) y la razón de verosimilitud negativa (CP-)

La razón de verosimilitud para un test positivo (CP+) indica el índice de eficiencia pronóstica de un resultado positivo. Se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$CP+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}}$$

Los valores de CP+ entre 2-10 indican que el test de diagnóstico presenta una eficiencia moderada, valores entre 10-50; una buena eficiencia y mayores de 50; excelente.

La razón de verosimilitud negativa CP- indica una mejor capacidad para diagnosticar la ausencia del carácter de interés y se calcula de la siguiente forma:

$$CP- = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

Valores de CP- entre 0.5-0.1 indican que la prueba diagnóstica posee una eficiencia moderada, muy buena para valores entre 0.1-0.02 y excelente para valores menores de 0.002.

La razón de verosimilitud es un parámetro independiente de la prevalencia del carácter de interés en la población o el grupo de estudio, depende de la sensibilidad y la especificidad de la prueba diagnóstica en sí, por ello puede emplearse para comparar diferentes test diagnósticos. Por otra parte, al depender de la Especificidad y la

Sensibilidad es un buen resumen en un único valor numérico de la calidad de nuestra prueba diagnóstica.

3.3.5.1.3 CEPAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

Las cepas control empleadas para la validación del diseño de cebadores para la detección de cepas productoras de carbapenemasas se adquirieron de la colección del Centro Nacional de Referencia Asociado para la Resistencia Antibiótica en Francia (CNRRA), dirigido por Patrice Nordmann y de la colección de cepas particular cedida por el Servicio de Microbiología del Hospital Sant Pau de Barcelona. Además también se incluyeron cepas que no tenían ningún mecanismo de resistencia a carbapenems. Se procesaron en condiciones ciegas un total de 185 cepas, en la tabla 15 se encuentra recogida información más detallada de las cepas empleadas.



Carbapenemasa	Número de cepas	Especies bacterianas
KPC	2	2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>
SME	2	2 <i>Serratia marcescens</i>
NMC	1	1 <i>Enterobacter cloacae</i>
GES	2	1 <i>Acinetobacter baumannii</i> , 1 <i>Escherichia coli</i>
IMP	4	3 <i>Klebsiella sp.</i> , 1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
VIM	72	9 <i>Enterobacter cloacae</i> , 15 <i>Klebsiella sp.</i> , 47 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 1 <i>Escherichia coli</i>
GIM	0	-
SPM	2	2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NDM	1	1 <i>Escherichia coli</i>
SIM	1	1 <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-51-like	1	1 <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-23-like y OXA-51-like	1	1 <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-24-like y OXA-51-like	1	1 <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-58-like y OXA-51-like	1	1 <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-48-like	21	20 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 1 <i>Escherichia coli</i>
OXA-55	0	-
OXA-62	0	-
OXA-182	0	-
Sin mecanismos de resistencia	70	43 <i>Escherichia coli</i> , 27 <i>Klebsiella sp.</i>

TABLA 15. Cepas empleadas para el cálculo de Sensibilidad, Especificidad y Razones de Verosimilitud. Se indica la especie bacteriana en concreto, su gen codificante de carbapenemasa y el número de cepas testados.

3.3.5.1.4 PROTOCOLO DE TRABAJO

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todas las cepas empleadas en el estudio se reactivaron en el medio Columbia blood agar y se incubaron al menos durante 24 horas a 37°C. Una vez se observó crecimiento de la cepa bacteriana sometida a estudio se procedió a la extracción ácidos nucleicos totales empleando Chelex x-100.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la extracción de los ácidos nucleicos se resuspendió una colonia de la cepa de interés en 300 μl de una suspensión de Chelex x-100⁶⁵ al 10% y se sometió a ciclos de congelación-descongelación (congelar la muestra 15 minutos a -80°C y calentar 15 minutos a 90°C repitiendo el proceso 3 veces) con el fin de lisar la célula, una vez terminado el proceso de lisis se centrifugó el tubo a una velocidad de 5.000 rpm durante 5 minutos y se conservó el sobrenadante donde se encontraban los ácidos nucleicos bacterianos.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se cuantificaron los ácidos nucleicos obtenidos en el proceso de extracción mediante lectura en NanoDrop. Para ello se midió la absorbancia del sobrenadante obtenido en el paso anterior y se consideró que la muestra era válida para su posterior análisis si como mínimo se obtenía una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ y un ratio de absorbancia 260/280 superior a 1,8.

DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS POR EL SISTEMA *Carbaplex iD*

La determinación de producción de carbapenemasas se hizo según se indica en el punto “CONDICIONES DE TRABAJO DE LA PCR A TIEMPO REAL MULTIPLEX DEL SISTEMA *Carbaplex iD*”.

3.3.5.1.5 CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y RAZONES DE VEROSIMILITUD

El cálculo de los parámetros de sensibilidad y especificidad así como sus intervalos de confianza al 95% y razones de verosimilitud, se hicieron empleando tablas de contingencia del tipo 2x2 y analizadas por el paquete de software estadístico *VassarStats* (www.vassarstats.net) desarrollado por el profesor Richard Lowry (Vassar College, Poughkeepsie. New York, USA.).

3.3.5.2 EXPERIMENTO 2. CÁLCULO DE LOS VALORES PREDICTIVOS POSITIVO Y NEGATIVO DEL SISTEMA *Carbaplex iD*

Mediante la realización de este experimento se pretende obtener los resultados para el cálculo de los VPP y VPN del sistema *Carbaplex iD*. Para ello se ha empleado una colección de bacilos gram-negativos aislados en el periodo de junio-noviembre de 2013 en el Hospital General Universitario de Elche y Hospital General Universitario de Alicante a partir de muestras clínicas de origen nosocomial.

Todas las cepas fueron identificadas empleando el sistema MicroScan Walkaway y como Gold Standard para determinar la producción de carbapenemasas se empleó una combinación de determinación de disminución de sensibilidad a carbapenems mediante antibiograma empleando la técnica Kirby-Bauer combinado con PCR convencional específica de las cepas con sensibilidad disminuida a los carbapenems para los genes implicados en la producción de carbapenemasas más relevantes en nuestro entorno descrita previamente en la bibliografía.

Para la detección de carbapenemasas de las clases A y B se utilizó la metodología descrita por Doyle *et al* 2012, *Laboratory Detection of Enterobacteriaceae that Produce Carbapenemases* y para la detección de carbapenemasas de la clase D la metodología descrita por Woodford *et al* 2006, *Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA Carbapenemases in Acinetobacter spp.* . Los resultados obtenidos por *Carbaplex iD* se emplearon para el cálculo del VPP y VPN.

Los parámetros de VPP y VPN son junto con la sensibilidad y la especificidad parámetros para evaluar la validez de una prueba diagnóstica. Sin embargo, a diferencia de los parámetros explicados anteriormente, el VPP y VPN sí dependen de la prevalencia del carácter de interés a diagnosticar en la población.

El Valor Predictivo Positivo es la frecuencia de que una muestra con un resultado positivo para un determinado carácter entre todas las demás, tenga presente dicho carácter. Es decir, que un resultado positivo en la prueba se corresponda con un positivo real. Este índice se calcula de la siguiente forma:

$$VPP = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

Por otra parte, el Valor Predictivo Negativo es la frecuencia de que las muestras donde la prueba haya dado un resultado negativo sean realmente negativos. La fórmula para calcular el VPP se muestra a continuación:

$$VPN = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

El intervalo de confianza de los valores predictivos al 95% se calculan:

$$I.C. (95\%) = VPP \pm \alpha \sqrt{\frac{VPP(1-VPP)}{\text{Verdadero Positivo} + \text{Falso Positivo}}}$$

$$I.C. (95\%) = VPN \pm \alpha \sqrt{\frac{VPN(1-VPN)}{\text{Verdadero Negativo} + \text{Falso Negativo}}}$$

Donde $\alpha = 1.96$

3.3.5.2.1 CEPAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

Las cepas empleadas para el siguiente estudio fueron recogidas en los servicios de Microbiología del Hospital General Universitario de Alicante y el Hospital General Universitario de Elche durante la rutina de diagnóstico y se recogen en las tablas 16, 17 y 18. Las cepas recogidas fueron diferentes especies del grupo *Enterobacteriaceae* y de las especies *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Especie bacteriana	N.º de cepas recogidas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	127
Enterobacterias	461
<i>Citrobacter freundii</i>	7
<i>Citrobacter koseri</i>	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10
<i>Enterobacter asburiae</i>	5
<i>Enterobacter cloacae</i>	29
<i>Enterobacter kobeii</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	218
<i>Klebsiella ascorbata</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	88
<i>Morganella morganii</i>	32
<i>Proteus mirabilis</i>	37
<i>Providencia stuarti</i>	5
<i>Salmonella enteritidis</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	14
<i>Serratia odorifera</i>	1
<i>Serratia rubidea</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0

TABLA 16. Cepas bacterianas aisladas en el Hospital General Universitario de Alicante durante el periodo junio-noviembre de 2013.

Especie bacteriana	N.º de cepas recogidas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	122
Enterobacterias	372
<i>Citrobacter freundii</i>	2
<i>Citrobacter koseri</i>	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	7
<i>Enterobacter asburiae</i>	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	43
<i>Enterobacter kobeii</i>	0
<i>Escherichia coli</i>	194
<i>Klebsiella ascorbata</i>	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	83
<i>Morganella morganii</i>	4
<i>Proteus mirabilis</i>	18
<i>Providencia stuarti</i>	3
<i>Salmonella enteritidis</i>	0
<i>Serratia marcescens</i>	7
<i>Serratia odorifera</i>	0
<i>Serratia rubidea</i>	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3

TABLA 17. Cepas bacterianas aisladas en el Hospital General Universitario de Elche durante el periodo junio-noviembre de 2013.

Especie bacteriana	N.º de cepas recogidas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	249
Enterobacterias	833
<i>Citrobacter freundii</i>	9
<i>Citrobacter koseri</i>	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	17
<i>Enterobacter asburiae</i>	5
<i>Enterobacter cloacae</i>	72
<i>Enterobacter kobeii</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	412
<i>Klebsiella ascorbata</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	171
<i>Morganella morganii</i>	36
<i>Proteus mirabilis</i>	55
<i>Providencia stuarti</i>	8
<i>Salmonella enteritidis</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	21
<i>Serratia odorifera</i>	1
<i>Serratia rubidea</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3

TABLA 18. Cepas totales aisladas entre los dos hospitales incluidos en el estudio.

3.3.5.2.2 PROTOCOLO DE TRABAJO

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todas las cepas empleadas en este experimento se aislaron a partir de infecciones de origen nosocomial y se conservaron a -80°C en medio de congelación Mueller-Hinton suplementado con un 15% de glicerol hasta su posterior análisis. Para la determinación de producción de carbapenemasas se reactivaron en agar *Columbia blood agar* y se incubaron al menos durante 24 horas a 37°C . Una vez se observó crecimiento de la cepa bacteriana una parte fue destinada a la realización de un antibiograma en placa por el método Kirby-Bauer y otra parte fue destinada para su extracción de ácidos nucleicos para su posterior determinación de presencia de genes codificantes para carbapenemasas por el sistema *Carbaplex iD*.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la extracción de los ácidos nucleicos se resuspendió una colonia de la cepa de interés en 300 μl de una suspensión de Chelex-100 al 10% y se sometió a ciclos de congelación-descongelación (congelar la muestra 15 minutos a -80°C y calentar 15 minutos a 90°C repitiendo el proceso 3 veces) con el fin de lisar la célula bacteriana, una vez terminado el proceso de lisis se centrifugó el tubo a una velocidad de 5.000 rpm durante 5 minutos y se conservó el sobrenadante donde se encontraban los ácidos nucleicos bacterianos.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se cuantificaron los ácidos nucleicos obtenidos en el proceso de extracción mediante lectura en NanoDrop. Para ello se midió la absorbancia del sobrenadante obtenido en el paso anterior siguiendo las instrucciones del fabricante y se consideró que la muestra era válida para su posterior análisis si como mínimo se obtenía una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ y un ratio de absorbancia 260/280 superior a 1,8.

DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS POR EL SISTEMA *Carbaplex iD*

La determinación de la producción de carbapenemasas se hizo según se indica en el punto “CONDICIONES DE TRABAJO DE LA PCR A TIEMPO REAL MULTIPLEX DEL SISTEMA *Carbaplex iD*”.

DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS POR EL MÉTODO GOLD STANDARD

La determinación de producción de carbapenemasas por el método Gold Standard se hizo combinando la determinación de disminución de sensibilidad a carbapenems por el método Kirby-Bauer combinado con una PCR convencional para la identificación de genes codificantes de carbapenemasas de las cepas con sensibilidad disminuida a los carbapenems.

Para la determinación de nivel de sensibilidad a los carbapenems se empleó un antibiograma mediante el método Kirby-bauer^{66,67} para los carbapenems imipenem, meropenem y ertapenem. Para ello se sembró en forma de recuento un inóculo de 10 µl de una suspensión de la cepa a evaluar a una concentración de 0,5 McFarland en una placa de medio sólido Mueller Hinton y a continuación se dispuso un disco de 10 µg para antibiograma de imipenem, meropenem y ertapenem incubando a 37°C durante 24 horas.

La lectura de los resultados se hizo al día siguiente y se siguió un criterio combinado entre CLSI y EUCAST para la determinación de la sensibilidad a los carbapenems que consistió en la determinación en milímetros de la longitud del halo de inhibición de crecimiento bacteriano generado alrededor del disco de antibiótico, en la tabla 19 se recogen los criterios empleados para la clasificación de las cepas entre sensibles o con sensibilidad disminuida.

Antibiótico	<i>Enterobacteriaceae</i> (mm)	<i>P. aeruginosa</i> (mm)	<i>A. baumannii</i> (mm)
Imipenem	<24	<20	-
Meropenem	<23	<23	<25
Ertapenem	<21	<22	-

TABLA 19. Criterios empleados en la determinación del nivel de sensibilidad a los carbapenems por las cepas incluidas en el estudio.

Una vez clasificadas entre las categorías “sensibles” o “sensibilidad disminuida” a los carbapenems, al grupo “sensibilidad disminuida” se le realizó a cada cepa de manera individual PCR convencionales para la detección de carbapenemasas de las clases A y B empleando la metodología descrita por Doyle *et al* 2012, *Laboratory Detection of Enterobacteriaceae that Produce Carbapenemases* y para la detección de carbapenemasas de la clase D la metodología descrita por Woodford *et al* 2006, *Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA Carbapenemases in Acinetobacter spp.* .

Se consideró como cepa no productora de carbapenemasas las cepas clasificadas en la categoría “sensibles” y cepas productoras de carbapenemasas a aquellas cepas clasificadas en la categoría “sensibilidad disminuida” con PCR convencional positiva para una o más de una carbapenemasa de la clase A, B o D. A continuación se muestra el algoritmo de diagnóstico empleado por el Gold Standard.

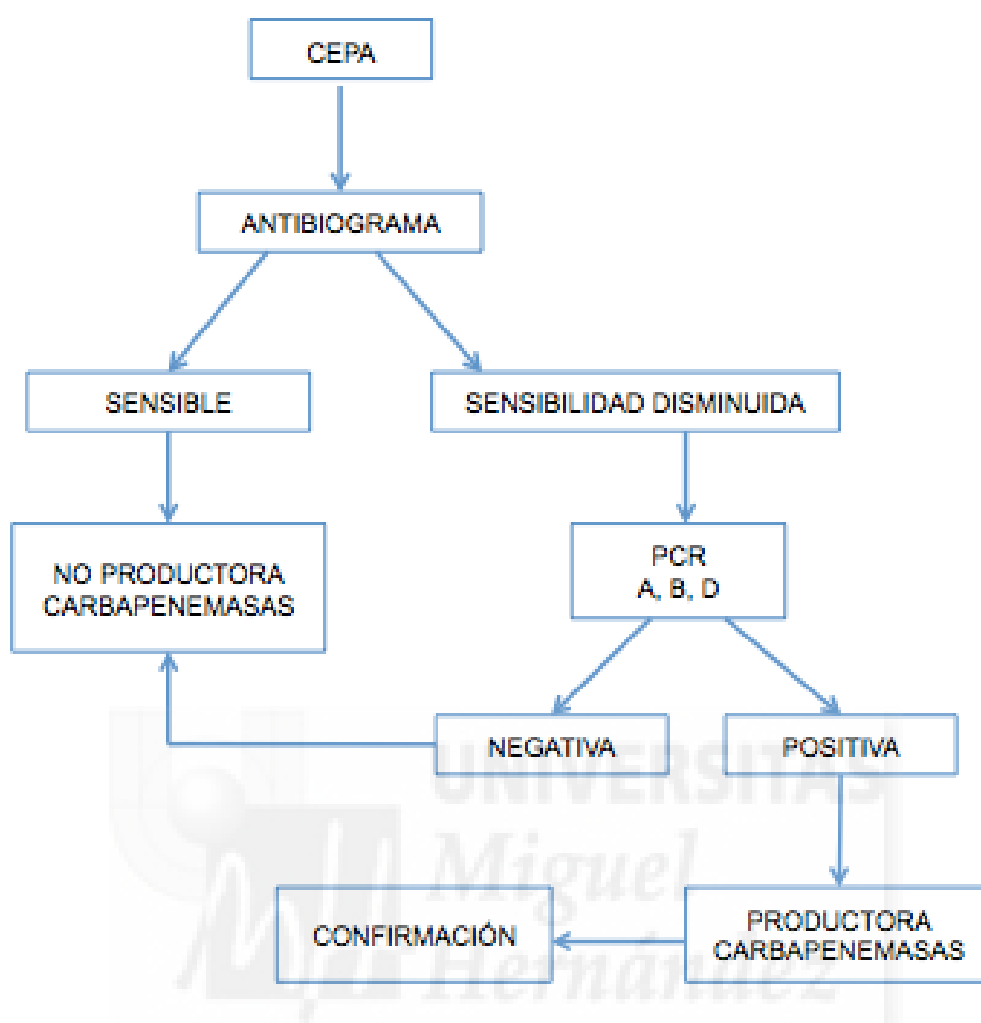


FIGURA 34. Algoritmo de trabajo empleado por la técnica Gold Standard para la identificación de cepas bacterianas productoras de carbapenemasas

CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS DE LA TÉCNICA GOLD STANDARD

Se procedió a la secuenciación del amplicón obtenido por PCR convencional en el grupo de cepas “sensibilidad disminuida” de aquellas cepas con PCR convencional positiva para una o más carbapenemasas de la clase A, B o D. Para ello se envió una muestra del amplicón obtenido a una concentración de ADN de 50 ng/μl junto con el cebador sentido a una concentración final de 5 pmol a la empresa Secugen S.L. (<https://www.secugen.es>).

El análisis de las secuencias obtenidas se hizo con el software bioinformático 4peaks v 1.7.2 (<https://www.mekentosj.com>) donde se procedió a eliminar los fragmentos de secuencia de baja calidad, posteriormente se procedió a realizar una comparación de secuencia empleando la herramienta bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool*^{68,69} (BLAST) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) empleando la base de datos *Nucleotide collection* con el fin de identificar el gen y alelo concreto del gen codificante para carbapenemasas detectado.

3.3.5.2.3 CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS VPP Y VPN DEL SISTEMA *Carbaplex iD*

El cálculo del VPP y VPN así como sus intervalos de confianza al 95%, se hicieron empleando tablas de contingencia del tipo 2x2 y analizadas por el paquete de software estadístico *VassarStats* (www.vassarstats.net) desarrollado por el profesor Richard Lowry (Vassar College, Poughkeepsie, New York, USA.).

3.3.5.2.4 IDENTIFICACIÓN POR MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) LA CLONALIDAD DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS IDENTIFICADAS

La técnica MLST⁷⁰ (Multi-Locus Sequence Typing) permite la caracterización de aislados bacterianos e identificación de clones mediante la amplificación y posterior secuenciación de fragmentos génicos de alta variabilidad interespecífica e intraespecífica presente generalmente en genes esenciales o house-keeping. Estas variaciones pueden ser desde variantes de un simple nucleótido hasta variaciones de varios nucleótidos en varias posiciones para cada uno de los genes. Estas diferencias generan una serie de perfiles alélicos característicos de cada clon y permite acabar con ambigüedades en la identificación bacteriana a nivel genético.

Las bases de datos MLST contienen información acerca de las secuencias de los alelos de referencia para cada cepa así como información sobre el procesado y tratamiento de la muestra. A pesar de que existen numerosas bases de datos, las dos más importantes son la base de datos albergada en el departamento de zoología de la Universidad de

Oxford (Reino Unido), (<http://pubmlst.org>) y la base de datos gestionada por el Instituto Pasteur (Francia), (<http://bigsdw.web.pasteur.fr>).

Para la identificación de los clones por MLST de las especies *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se empleó la base de datos de la Universidad de Oxford mientras que para la identificación clonal de *K. pneumoniae* se empleó la base de datos disponible en el Instituto Pasteur. En las tres especies se emplearon los cebadores y programas de PCR descritos en la metodología específica para cada especie descrita en cada base de datos.

Una vez amplificados cada uno de los genes necesarios para la correcta identificación clonal de cada especie se procedió a su secuenciación, para ello se envió una muestra del amplicón obtenido a una concentración de ADN de 50 ng/μl junto con el cebador sentido a una concentración final de 5 pmol a la empresa Secugen S.L.

El análisis de las secuencias obtenidas se hizo con el software bioinformático 4peaks v 1.7.2 donde se procedió a eliminar los fragmentos de secuencia de baja calidad, posteriormente se procedió a identificar el alelo correspondiente al gen secuenciado empleando la base de datos específica para cada especie con el fin de determinar el perfil alélico para cada cepa incluida en el estudio de MLST para identificar el clon concreto de la especie en cuestión. A continuación se muestra la tabla 20 con los genes y las secuencias de los cebadores empleados en cada MLST:

Cepa	Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')
<i>P. aeruginosa</i>	<i>acsA</i>	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT
	<i>aroE</i>	TGGGGCTATGACTGGAAACC	TAACCCGTTTTTGTGATTCCTACA
	<i>guaA</i>	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA
	<i>mutL</i>	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC
	<i>nouD</i>	ACCGCCACCCGTA CTG	TCTCGCCCATCTTGACCA
	<i>ppsA</i>	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG
	<i>trpE</i>	GCGGCCCAGGGTCGTGAG	CCCGGCGCTTGTGATGGTT
<i>A. baumannii</i>	<i>gltA</i>	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG
	<i>gyrB</i>	TGAAGGCGGCTTATCTGAGT	GCTGGGTCTTTTTCTGACA
	<i>gdhB</i>	GCTACTTTTATGCAACAGAGCC	GTTGAGTTGGCGTATGTTGTGC
	<i>recA</i>	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC
	<i>cpn60</i>	GGTGCTCAACTTGTTCTGTA	CACCGAAACCAGGAGCTTTA
	<i>gpi</i>	GAAATTTCCGGAGCTCACAA	TCAGGAGCAATACCCCACTC
	<i>rpoD</i>	ACCCGTGAAGGTGAAATCAG	TTCAGCTGGAGCTTTAGCAAT
<i>K. pneumoniae</i>	<i>rpoB</i>	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC
	<i>gapA</i>	TGAAATATGACTCCACTCACGG	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT
	<i>mdh</i>	CCCAACTCGCTTCAGGTT CAG	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG
	<i>pgi</i>	GAGAAAAACCTGCCTGTA CTGCTGGC	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT
	<i>phoE</i>	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT
	<i>infB</i>	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	CGCTTTCAGCTCAAGA ACTTC
	<i>tonB</i>	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG

TABLA 20. Cebadores y genes empleados para el análisis MLST de las especies *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *K. pneumoniae*.

3.3.5.3 EXPERIMENTO 3. APLICACIÓN DEL SISTEMA *Carbaplex iD* EN LA DETECCIÓN DE PACIENTES COLONIZADOS POR ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS

Mediante la realización de este experimento se pretende evaluar de la capacidad del sistema *Carbaplex iD* para la identificación de pacientes colonizados por enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital General Universitario de Alicante.

Con este experimento se pretende evaluar la capacidad del sistema para identificar de forma rápida y eficaz a estos pacientes con el fin de poder utilizar en el futuro el sistema *Carbaplex iD* como herramienta de diagnóstico dentro de los programas de control y vigilancia del Sistema Nacional de Salud para prevenir la dispersión de microorganismos multirresistentes.

Para mostrar las ventajas que podría aportar el sistema *Carbaplex iD* frente a los métodos fenotípicos empleados en el diagnóstico de pacientes colonizados por dichos microorganismos se han procesado en paralelo una colección de exudados rectales de pacientes ingresados en la UCI del Hospital General Universitario de Alicante, empleando el sistema *Carbaplex iD*, un método de diagnóstico fenotípico como el cultivo en placa cromogénica *CarbaSmart* de la casa comercial Biomerieux S.A. (<http://www.biomerieux.es>) y una técnica Gold Standard basada en PCR convencional para determinar la presencia o no de cepas productoras de carbapenemasas en la muestra de exudado rectal.

Para poder comparar los resultados obtenidos entre ambas técnicas (Sistema *Carbaplex iD* y método fenotípico cultivo en medio *CarbaSmart*), al igual que en el experimento uno, se ha recalculado los parámetros de Sensibilidad, Especificidad y las Razones de Verosimilitud del sistema *Carbaplex iD* y se han calculado para el método fenotípico *CarbaSmart* sobre muestras de exudado rectal.

Para la comparación entre ambos métodos se ha empleado la prueba estadística de McNemar⁶².

3.3.5.3.1 TEST DE McNEMAR

Este test estadístico⁷¹ empleado en la validación de tests de diagnóstico se utiliza para comparar entre sí los resultados obtenidos por dos tests distintos sobre la misma población muestral. Es una prueba no paramétrica para variables dicotómicas relacionadas que contrasta los cambios en el resultado de los tests utilizando la distribución Chi-cuadrado.

Los resultados obtenidos se representan en una tabla de contingencia 2x2 del siguiente tipo:

		Test 1	
		Positivo	Negativo
Test 2	Positivo	A	B
	Negativo	C	D

TABLA 21. Ejemplo de tabla de contingencia para el cálculo del test estadístico de McNemar.

Al tratarse de una medida estadística de datos discordantes, los valores A y D pueden ser ignorados ya que para el cálculo sólo se requieren B y C.

$$\chi^2 = \frac{(B-C)^2}{B+C}$$

Al igual que el test Chi-cuadrado, el punto de corte para un nivel de significancia del 95% es 3.85 (1.96²). Por tanto, si el resultado es mayor de 3.85, es posible afirmar que con un nivel de confianza del 95% existen diferencias significativas.

Cuando comparamos dos tests diagnósticos nos interesa compararlos a nivel de Especificidad y Sensibilidad, de modo que si lo que queremos es ver si existen

diferencias estadísticamente significativas a nivel de Especificidad el test de McNemar lo haremos sobre las discrepancias obtenidas entre los dos tests sobre la población sana. Por otro lado si queremos ver si existen diferencias estadísticamente significativas a nivel de la Sensibilidad haremos la prueba sobre las discrepancias entre los dos tests sobre la población enferma.

A la hora de realizar una prueba estadística de McNemar es necesario disponer de los resultados obtenidos por una prueba de referencia Gold Standard para conocer con exactitud la población sana y enferma de las muestras procesadas por los dos tests de diagnóstico a comparar.

3.3.5.3.2 MUESTRAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

Se recogieron 67 exudados rectales de pacientes con ventilación mecánica ingresados en la UCI del Hospital General Universitario de Alicante durante el periodo octubre 2013-octubre 2014. Los exudados rectales se recogieron utilizando un hisopo seco, el hisopo se introdujo por el ano aproximadamente de 5 a 7 cm y se rotó suavemente con el fin de obtener una muestra del microbioma rectal del paciente. Todas las muestras procesadas en este estudio contaron con la autorización firmada de consentimiento informado por parte de los familiares del paciente ingresado.

3.3.5.3.3 PROTOCOLO DE TRABAJO

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS: CULTIVO Y EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Una vez recibida la muestra de exudado rectal cada paciente, se sembró el hisopo mediante la técnica de agotamiento en medio selectivo *CarbaSmart*, a continuación las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en la estufa hasta la lectura de los resultados.

El exceso de muestra en el hisopo se resuspendió en 1 ml de suero fisiológico y se sometió a extracción de ácidos nucleicos empleando el sistema de extracción

automatizado EasyMag (Biomérieux), empleando 1 ml de volumen de entrada y un volumen de elución de 40 µl. La extracción se hizo siguiendo el protocolo de extracción genérico indicado por el fabricante. Una vez extraídas las muestras se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se cuantificaron los ácidos nucleicos obtenidos en el proceso de extracción mediante lectura en NanoDrop. Para ello se midió la absorbancia del sobrenadante obtenido en el paso anterior y se consideró que la muestra era válida para su posterior análisis si como mínimo se obtenía una concentración de 50 ng/µl y un ratio de absorbancia 260/280 superior a 1,8.

DETERMINACIÓN DE PACIENTES COLONIZADOS POR EPC EMPLEANDO LA TÉCNICA GOLD STANDARD

A partir de los ácidos nucleicos extraídos en el paso anterior se realizó una PCR convencional para la detección de carbapenemasas de las clases A y B empleando la metodología descrita por Doyle *et al* 2012, *Laboratory Detection of Enterobacteriaceae that Produce Carbapenemases* y para la detección de carbapenemasas de la clase D la metodología descrita por Woodford *et al* 2006, *Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA Carbapenemases in Acinetobacter spp.* . Tras la visualización en gel de agarosa al 2% del resultado de la PCR se identificaron las muestras positivas para la presencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas.

DETERMINACIÓN DE PACIENTES COLONIZADOS POR EPC EMPLEANDO EL MÉTODO FENOTÍPICO CULTIVO EN MEDIO *CarbaSmart*

Después de la siembra de la muestra de exudado rectal en medio *CarbaSmart*, tras 24 horas de la incubación de la placa cromogénica se dio como muestra positiva para la presencia de EPC aquella muestra donde se observó crecimiento claro de algún microorganismo. Posteriormente se procedió a la identificación de la especie de la cepa presente en el medio de cultivo mediante MALDI-TOFF directo de colonia empleando el protocolo descrito por Adnan *et al* 2011, *Comparison of Direct Colony Method*

versus Extraction Method for Identification of Gram Positive Cocci by Use of Bruker Biotype Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.

DETERMINACIÓN DE PACIENTES COLONIZADOS POR EPC EMPLEANDO EL SISTEMA *Carbaplex iD*

A partir de los ácidos nucleicos obtenidos en el apartado de preparación de la muestra se realizó la determinación de producción de carbapenemasas siguiendo el protocolo descrito en el apartado “CONDICIONES DE TRABAJO DE LA PCR A TIEMPO REAL MULTIPLEX DEL SISTEMA *Carbaplex iD*”. Considerando la muestra positiva para la presencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas si en el resultado de la prueba se cumplen los criterios dados en el punto “Análisis de Resultados” del apartado “CONDICIONES DE TRABAJO DE LA PCR A TIEMPO REAL MULTIPLEX DEL SISTEMA *Carbaplex iD*”.

3.3.5.3.4 CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, RAZONES DE VEROSIMILITUD Y TEST DE McNEMAR

El cálculo de los parámetros de Sensibilidad y Especificidad así como sus intervalos de confianza al 95%, Razones de Verosimilitud y Test de McNemar para el método “*Carbaplex iD*” y para el método fenotípico “*cultivo en placa cromogénica CarbaSmart*” se hicieron empleando tablas de contingencia del tipo 2x2 y analizadas por el paquete de software estadístico *VassarStats* (www.vassarstats.net) desarrollado por el profesor Richard Lowry (Vassar College, Poughkeepsie, New York, USA.). Se considerará que existían diferencias estadísticamente significativas para p-valores menores de 0,05.

3.3.6 ADAPTACIÓN DEL SISTEMA *Carbaplex iD* A LA PLATAFORMA COMERCIAL SEPSIS FLOW CHIP

Debido al gran interés por el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico molecular para el control de la dispersión y diagnóstico de mecanismos de resistencia en organismos multirresistentes el 31/12/2012 se procedió a iniciar los trámites de patente del sistema *Carbaplex iD* y al que con fecha 09/07/2015 la Oficina Europea de Patentes concedía el informe favorable de patentabilidad al sistema al reconocer que cumplía los tres requisitos necesarios para ser patentable:

1. Novedad
2. Actividad inventiva
3. Aplicabilidad industrial

Debido a que el sistema se encuentra en proceso de protección industrial y a que numerosas empresas dedicadas al desarrollo de tests moleculares para el diagnóstico *in vitro* se encuentran desarrollando tests de diagnóstico para el diagnóstico de microorganismos multirresistentes. Se procedió el 07/05/2013 a la presentación del sistema *Carbaplex iD* en el Foro “Primeras Jornadas de Transferencia Tecnológica en Medicina Intensiva” organizadas por la Federación Española de Empresas de Tecnología Sanitaria en el Instituto de Salud Carlos III.

Debido al interés mostrado por la casa comercial Vitro S.A. en dicho foro por el sistema, se comenzó a la adaptación del sistema *Carbaplex iD* a la plataforma de diagnóstico *Sepsis Flow Chip*, que Vitro S.A. se encontraba desarrollando en ese momento.

3.3.6.1 SEPSIS FLOW CHIP

Sepsis Flow Chip es un kit de diagnóstico *in vitro* de infecciones en humanos basado en PCR multiplex e hibridación reversa para la detección simultánea de bacterias, hongos y

los principales genes de resistencia a antibióticos en un único ensayo., además como muestra de partida puede utilizar directamente muestras de hemocultivo positivas sin necesidad de extracciones de ADN.

El sistema permite la detección simultánea de alrededor de 36 especies bacterianas (*Staphylococcus* Coagulasa-Negativa, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Neisseria meningitidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, especies de *Enterobacteriaceae* y *Proteus spp.*), varias especies de hongos (*Candida albicans* y *Candida spp.*) y 20 marcadores de resistencia a antibióticos.

En cuanto los marcadores de resistencia antibiótica, el kit detecta un gen asociado a resistencia a meticilina (*mecA*), dos genes que confieren resistencia a vancomicina (*vanA* y *vanB*), dos genes asociados a resistencia frente a antibióticos β -lactámicos (*blaSHV* y *blaCTX-M*) y al incluir parte del sistema de detección de genes codificantes de carbapenemasas *Carbaplex iD* puede detectar quince genes de betalactamasas que confieren resistencia a carbapenems *blaKPC*, *blaSME*, *blaNMC*, *blaGES*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSPM*, *blaNDM*, *blaSIM*, *blaIMP*, *blaOXA-23-like*, *blaOXA-24-like*, *blaOXA-48-like*, *blaOXA-51-like* y *blaOXA-58-like* (tabla 22).

El método se basa en la amplificación de dianas de ADN con dos reacciones de PCR multiplex (una para la identificación bacteriana y otra para la identificación de mecanismos de resistencia) y la posterior hibridación reversa en el soporte *HybriSpot HS12* sobre una membrana que contiene sondas específicas para detectar los amplicones sintetizados en el paso de amplificación.

Antibiótico	Gen de resistencia identificado
Meticilina	mecA
Vancomicina	vanA, vanB
Betalactámicos	blaSHV, blaCTX-M
Carbapenems	blaKPC, , blaNMC, blaGES, blaVIM, blaGIM, blaSPM, blaNDM, blaSIM, blaIMP, blaOXA-23-like, blaOXA-24-like, blaOXA-48-like, blaOXA-51-like, blaOXA-58-like

TABLA 22. Marcadores de resistencia identificados por el kit comercial *Sepsis Flow Chip*.

Debido a que los cebadores presentes en la reacción de amplificación se encuentran biotinilados y a que la tecnología DNA-flow permite una unión muy rápida entre el amplicón de PCR y su sonda específica en un ambiente tridimensional poroso, una vez producida la unión es visualizada mediante una reacción inmunoenzimática colorimétrica con estreptavidina-fosfatasa y un cromógeno (NBT-BCIP) que genera precipitados insolubles de color oscuro en la membrana en aquellas posiciones en las que ha habido hibridación.

Una vez llevada a cabo la reacción de hibridación en el sistema *HybriSpot HS12* aparece en la membrana un patrón de puntos que es analizados automáticamente con el software *HybriSoft™*. Dependiendo del patrón de puntos obtenido el software genera un resultado identificando al microorganismo causante de la infección y sus marcadores de resistencia. En la figura 36 se muestra las posiciones correspondientes que ocupa cada sonda específica en la membrana de hibridación.



FIGURA 35. HybriSpot HS12, soporte para la hibridación, revelado y análisis de resultados de *Sepsis Flow Chip*.

B	SHIG	LIS	kpc	spm	ECOLI	vanB	B		
B	ABAU	ENTEROC	sme	ndm	ENTEROB	vanA	ges	oxa23	
CI	SMAR/KIF B	PAER	nmc/imi	sim		mecA	vim	oxa24	
BG	SAGAL	KLED		imp3	SMALTO	CALB	gim	oxa48	
	STAPHYL	STREP	blaSHV	imp15	CAND	SHIG	PROT/MO R	kpc	oxa51
SPNEU	SA	NEIS	blaCTX	imp19	B	ABAU	LIS	spm	oxa58
	ECOLI	PROT/MO R	ges	oxa23	CI	SMAR/KLE B	ENTEROC	sme	ndm
SMALTO	ENTEROB		vim	oxa24	BG	SAGAL	PAER	nmc/imi	sim
CAND		mecA	gim	oxa48		STAPHYL	KLED		imp3
	CALB	vanA		oxa51	SPNEU	SA	STREP	blaSHV	imp15
	B	vanB		oxa58			NEIS	blaCTX	imp19

FIGURA 36. Distribución de las posiciones en el chip de los microorganismos y marcadores de resistencia identificados por *Sepsis Flow Chip*.

Debido a que el sistema *Carbaplex iD* se diseñó para reacciones de PCR a Tiempo Real multiplex que detectaba de una a tres dianas simultáneamente en ocho pocillos de reacción distintos, para su adaptación al sistema *Sepsis Flow Chip* se tuvieron que recalcular todas las estequiometrias de la reacción de PCR para que todos los cebadores pudieran funcionar al mismo tiempo sin generar problemas de inespecificidad y para que trabajaran todos en una misma reacción de PCR multiplex.

Debido a diversas clausulas de confidencialidad firmadas y a la exclusividad de explotación del sistema *Carbaplex iD* por parte de la empresa Vitro S.A. no se facilitará en este trabajo las condiciones estequiométricas específicas en las que el sistema *Carbaplex iD* puede trabajar.

3.3.6.2 EXPERIMENTO 4: VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE MARCADORES DE RESISTENCIA A CARBAPENEMS EN LA PLATAFORMA COMERCIAL *Sepsis Flow Chip*

Para comprobar si la adaptación del sistema *Carbaplex iD* a la plataforma comercial *Sepsis Flow Chip* permite identificar a microorganismos portadores de genes codificantes para carbapenemasas, se procedió a comprobar el sistema con una representación de las cepas control empleadas en el experimento 1 de las que previamente ya se conocía la presencia de genes portadores de carbapenemasas. Las cepas empleadas en este experimento se muestran en la tabla 23.

Carbapenemasa	Número de cepas	Especies bacterianas
KPC	2	(1) <i>Klebsiella pneumoniae</i>
SME	1	(1) <i>Serratia marcescens</i>
NMC	1	(1) <i>Enterobacter cloacae</i>
GES	1	(1) <i>Escherichia coli</i>
IMP	1	(1) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
VIM	1	(1) <i>Escherichia coli</i>
SPM	1	(1) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NDM	1	(1) <i>Escherichia coli</i>
SIM	1	(1) <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-23-like y OXA-51-like	1	(1) <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-24-like y OXA-51-like	1	(1) <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-58-like y OXA-51-like	1	(1) <i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-48-like	1	(1) <i>Escherichia coli</i>

TABLA 23. Cepas portadoras de genes codificantes para carbapenemasas analizadas por *Sepsis Flow Chip*.

3.3.6.2.1 PROTOCOLO DE TRABAJO

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todas las cepas empleadas en el estudio se reactivaron en agar *Columbia blood agar* y se incubaron al menos durante 24 horas a 37°C. Una vez se observó crecimiento de la cepa bacteriana sometida a estudio se procedió a la extracción ácidos nucleicos totales.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la extracción de los ácidos nucleicos se resuspendió una colonia de la cepa de interés en 300 ul de una suspensión de Chelex x-100 al 10% y se sometió a ciclos de congelación-descongelación (congelar la muestra 15 minutos a -80°C y calentar 15 minutos a 90°C repitiendo el proceso 3 veces) con el fin de lisar la célula, una vez terminado el proceso de lisis se centrifugó el tubo a una velocidad de 5.000 rpm durante

5 minutos y se conservó el sobrenadante donde se encontraban los ácidos nucleicos bacterianos.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se cuantificaron los ácidos nucleicos obtenidos en el proceso de extracción mediante lectura en NanoDrop. Para ello se midió la absorbancia del sobrenadante obtenido en el paso anterior y se consideró que la muestra era válida para su posterior análisis si como mínimo se obtenía una concentración de 50 ng/ul y un ratio de absorbancia 260/280 superior a 1,8.

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PORTADORAS DE MARCADORES DE RESISTENCIA A CARBAPENEMS

A partir de los ácidos nucleicos obtenidos en el apartado de preparación de la muestra se realizó la detección de marcadores de resistencia a carbapenems e identificación bacteriana siguiendo el protocolo de amplificación e hibridación descrito en la ficha técnica del producto (MAD-003936M-HS12). El patrón de puntos obtenido en la membrana se analizó con el software HybriSof v.1.9 .



4 RESULTADOS

4.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA Y EFICIENCIA DE LA REACCIÓN

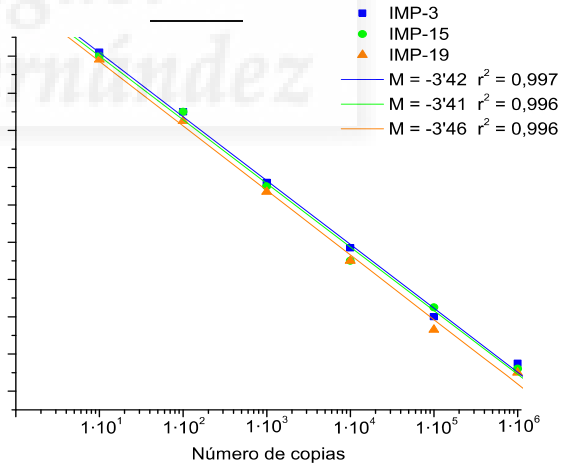
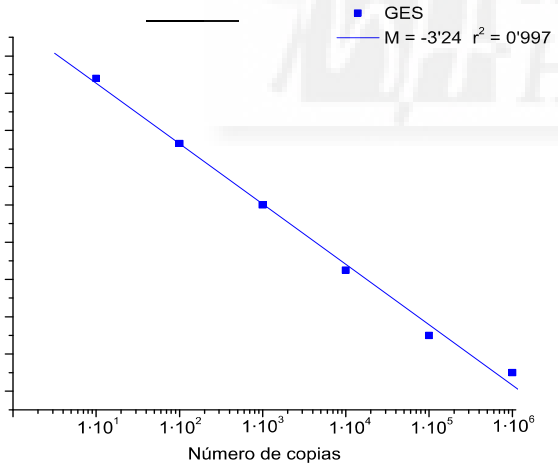
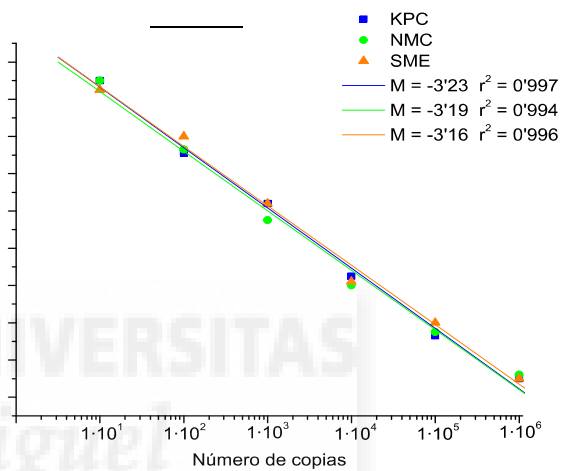
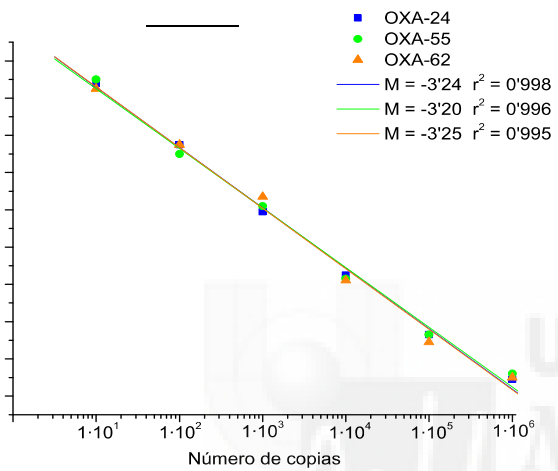
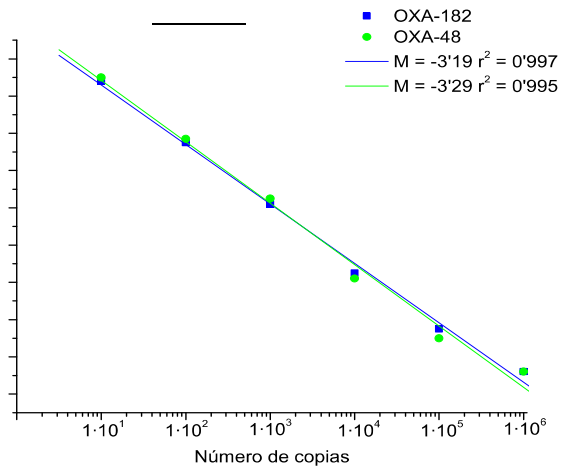
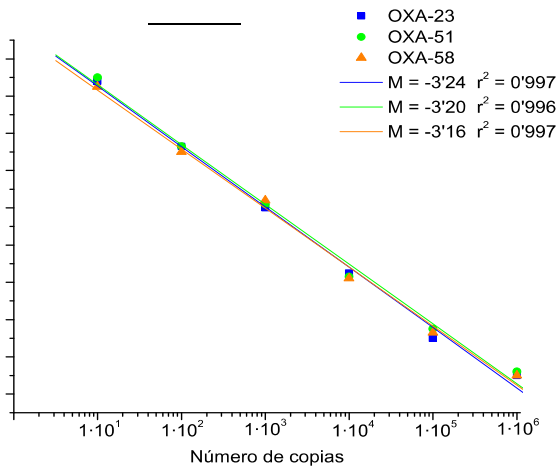
Todas las reacciones del sistema de detección de genes codificantes para carbapenemasas *Carbaplex iD* mostraron un límite de detección dentro del rango de linealidad que se situaba entre los valores $1 \cdot 10^7$ copias de su diana específica para su límite superior y de 10 copias para su límite de detección inferior.

Las eficiencias de cada una de las reacciones mostraron unos valores que se situaban entre 2 y 1,93 siendo la reacción multiplex 6 la que mostró un valor más bajo de eficiencia de reacción. La eficiencia media del sistema teniendo en cuenta las eficiencias de todas las reacciones fue de 1,99. Las eficiencias de cada reacción multiplex del sistema *Carbaplex iD* así como su coeficiente de regresión lineal y límite de detección para cada recta patrón se encuentran recogidas en la tabla 24.



Multiplex	Dianas	Eficiencia ($E=10^{-1/M}$)	Límite detección (copias/ μ l)	r^2
1	OXA-23-like	2	10	0,997
	OXA-51-like	2	10	0,996
	OXA-58-like	2	10	0,997
2	OXA-182-like	2	10	0,997
	OXA-48-like	2	10	0,995
3	OXA-24-like	2	10	0,998
	OXA-55-like	2	10	0,996
	OXA-62-like	2	10	0,995
4	KPC	2	10	0,997
	NMC	2	10	0,994
	SME	2	10	0,996
5	GES	2	10	0,997
6	IMP-3-like	1,96	10	0,997
	IMP-15-like	1,96	10	0,996
	IMP-19-like	1,93	10	0,996
7	GIM	2	10	0,995
	SPM	2	10	0,996
	VIM	1,99	10	0,994
8	NDM	2	10	0,997
	SIM	2	10	0,996

TABLA 24. Eficiencia, límite de detección y coeficiente de regresión lineal de cada reacción de PCR a Tiempo Real del sistema *Carbaplex iD*.



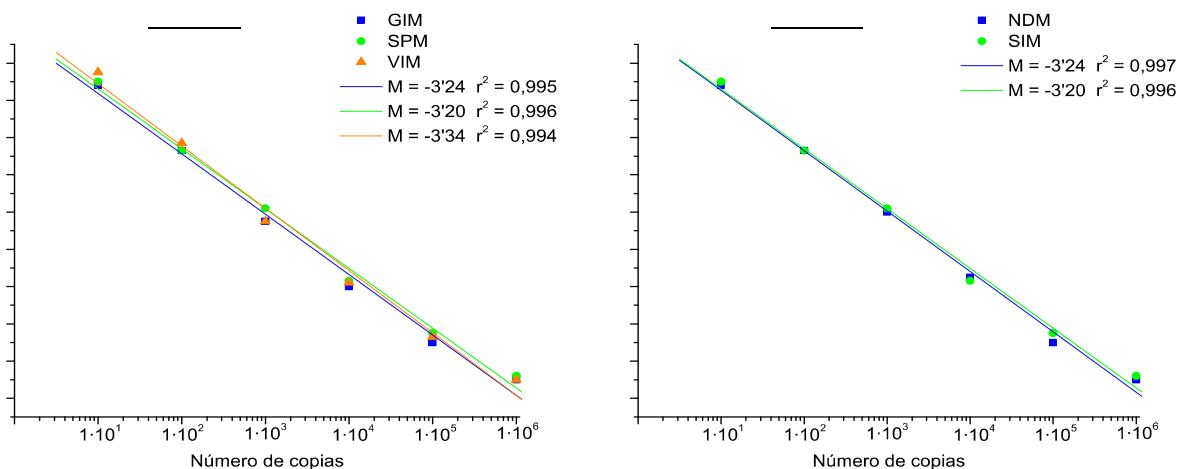


FIGURA 37. Rectas patrones de cada reacción de PCR a Tiempo Real del sistema *Carbaplex iD* de las que se derivan el límite de detección de cada reacción y su pendiente (M).

4.2 EXPERIMENTO 1: CÁLCULOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA

De las 182 muestras de cepario sometidas al análisis por *Carbaplex iD* 111 fueron identificados como positivas para la presencia de genes codificantes para carbapenemasas y 71 fueron identificados como negativas. En la tabla 25 se muestra un resumen de los resultados obtenidos agrupados por tipo de carbapenemasa analizada e identificaciones correctas.

Carbapenemasa	No. de muestras	Correctamente identificadas	Diana detectada	Fallo detección
KPC	2	2	KPC	-
SME	2	2	SME	-
NMC	1	1	NMC	-
GES	2	2	GES	-
IMP	4	3	IMP	IMP-4
VIM	72	72	VIM	-
SPM	2	2	SPM	-
NDM	1	1	NDM	-
SIM	1	1	SIM	-
OXA-51-like	1	1	OXA-51-like	-
OXA-23-like + OXA-51-like	1	1	OXA-23-like y OXA-51-like	-
OXA-24-like + OXA-51-like	1	1	OXA-24-like y OXA-51-like	-
OXA-58-like + OXA-51-like	1	1	OXA-58-like y OXA-51-like	-
OXA-48-like	21	21	OXA-48-like	-
Sin mecanismos de resistencia	70	70	Negativo	-

TABLA 25. Resultados obtenidos por el sistema Carbaplex iD en la evaluación del mismo empleando una colección de 182 cepas bacterianas portadoras y no portadoras de genes codificantes para carbapenemasas.

Únicamente no se logró detectar una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de una carbapenemasa IMP alelo 4. Analizando la secuencia de los cebadores y sonda Taqman IMP-3-like del sistema *Carbaplex iD* para la detección del grupo IMP y el fragemento de secuencia del gen IMP-4 con el que debería hibridar cada uno, observamos la existencia de discrepancias en la composición de la secuencia de ácidos nucleicos haciendo imposible la reacción de detección por parte del sistema *Carbaplex iD*.

Además de haberse demostrado experimentalmente la imposibilidad de detectar el alelo 4 del grupo IMP, teóricamente el sistema *Carbaplex iD* tampoco podría detectar los alelos 26 y 38 del mismo grupo por la misma razón.

En cuanto a los cálculos de Sensibilidad y Especificidad del sistema *Carbaplex iD*, en la tabla 26 se encuentran agrupados los datos codificados como positivos o negativos según el sistema ha sido capaz o no de detectar la presencia de genes codificantes para carbapenemasas.

		Gold Standard		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Carbaplex iD</i>	Positivo	111	0	111
	Negativo	1	70	71
	Total	112	70	182

TABLA 26. Tabla de contingencia para el cálculo de Sensibilidad y Especificidad del sistema *Carbaplex iD* derivada de los resultados obtenidos en el Experimento 1.

De los resultados mostrados en la tabla 26 se puede deducir que los valores de Sensibilidad y Especificidad para el sistema *Carbaplex iD* son de 0,991 y 1 respectivamente y las razones de verosimilitud CP+ y CP- se sitúan entre los valores >10 y 0,0089 respectivamente .

Los datos de sensibilidad, especificidad, CP+ y CP- se encuentran recogidos en la tabla 27 junto a su intervalo de confianza al 95% para cada valor.

<i>Carbaplex iD</i>	Valor estimado	Intervalo de confianza al 95%
Sensibilidad	0,991	0,945-0,999
Especificidad	1	0,936-1
CP+	>10	-
CP-	0,0089	0,001-0,061

TABLA 27. Resumen de Sensibilidad, Especificidad y Razones de Verosimilitud (CP+ y CP-) e IC al 95% para el sistema *Carbaplex iD*.

4.3 EXPERIMENTO 2: CÁLCULO DE LOS VALORES PREDICTIVOS POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA.

Entre el periodo de meses Junio – Noviembre de 2013 se obtuvieron un total de 1.107 bacilos gram negativos aislados a partir de muestras de pacientes con sospecha de infección nosocomial, entre los dos hospitales participantes en el estudio (Hospital General Universitario de Alicante (HGUA) y el Hospital General Universitario de Elche (HGUE)).

Tras el cribado fenotípico mediante la técnica Kirby-Bauer para los antibióticos imipenem, meropenem y ertapenem y utilizando los criterios de punto de corte entre fenotipo sensible y fenotipo resistente para estos, indicados en el punto “DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS POR EL MÉTODO GOLD STANDARD” del capítulo *Material y Métodos* de este trabajo, se determinó que la prevalencia de bacilos gram negativos resistentes a carbapenems fue de 21,6% (239/1.107 aislados) frente a una prevalencia de gram negativos sensibles del 78,4% (868/1.107 aislados). De los aislados resistentes a carbapenems se determinó que el 8,7% (21/239 aislados) fue portador de genes codificantes para carbapenemasas, siendo el 1,8% del total de aislados incluidos en el estudio. La identificación de genes codificantes para carbapenemasas solo ocurrieron en las especies bacterianas *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. En la tabla 28 y las figuras 38 y 39 se encuentran recogidos los resultados obtenidos desglosados por origen y tipo de aislado.



FIGURA 38. Aislados totales obtenidos por el método Gold Standard de los dos centros incluidos en el estudio distribuidos entre las categorías Sensibles, Resistentes y Resistentes productores de carbapenemasas.

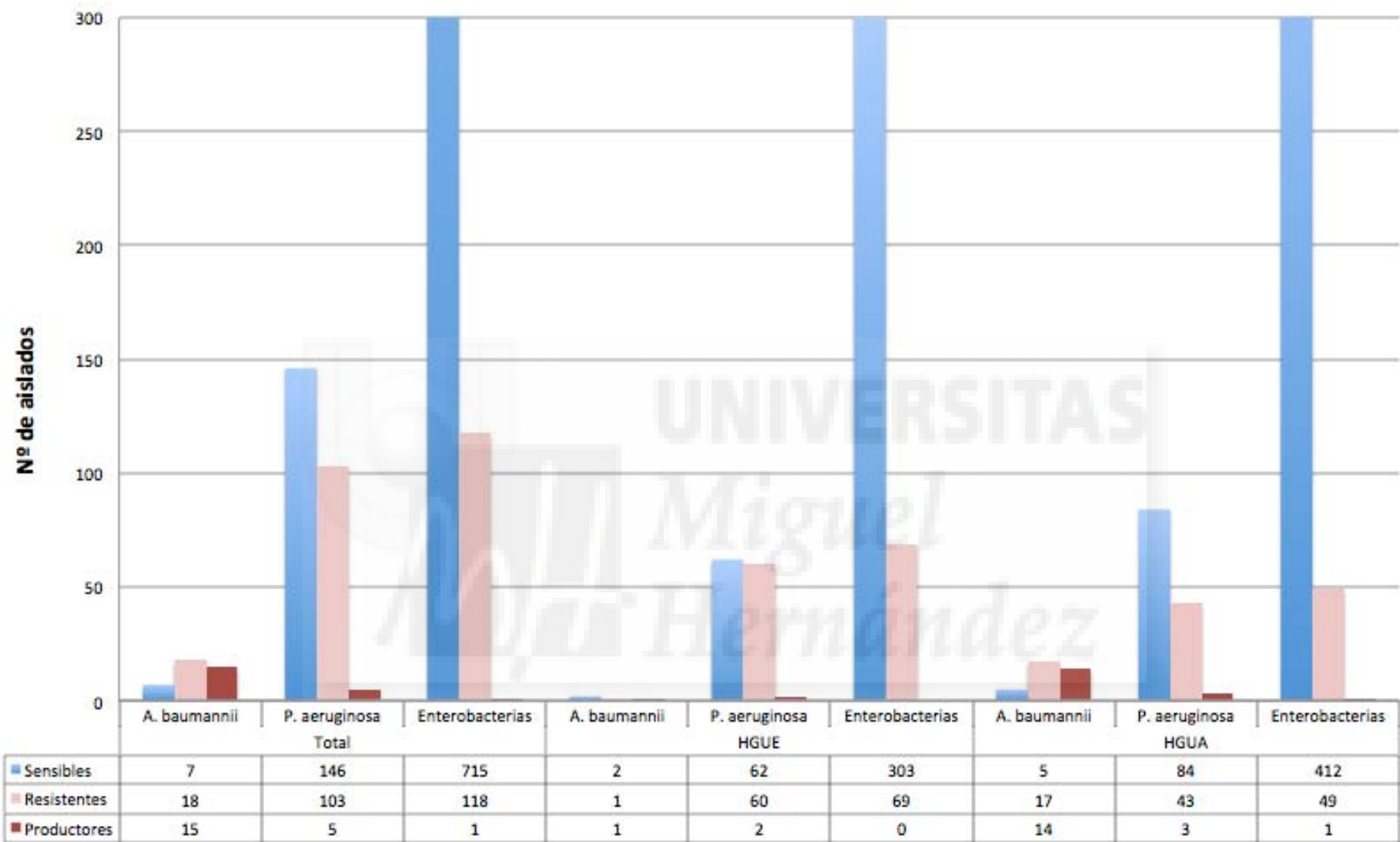


FIGURA 39. Porcentajes y aislados bacterianos portadores de genes codificantes de carbapenemasas, A) aislados totales obtenidos entre los dos centros estudiados, B) aislados obtenidos en el Hospital General Universitario de Alicante y C) aislados obtenidos en el Hospital General Universitario de Elche.

Origen Aislamiento	Especie Bacteriana	No. Aislados	Tipo Carbapenemasa
HGUA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14	(9) OXA-51, (5) OXA-51 + OXA-23
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	(3) VIM
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	(1) VIM
HGUE	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	(1) OXA-51 + OXA-23
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	(2) VIM

TABLA 28. Identificación del tipo de gen codificante para carbapenemasas determinado por el método Gold Standard.

Tras procesar todas las 1.107 cepas incluidas en el estudio por el sistema *Carbaplex iD* se detectaron 21 muestras productoras de carbapenemasas, de las cuales 18 muestras fueron aisladas en el Hospital General Universitario de Alicante y 3 en el Hospital General Universitario de Elche. La distribución por tipo de microorganismo y carbapenemasa detectada para cada centro incluido en el estudio se recogen en la tabla 29.

Origen Aislamiento	Especie Bacteriana	No. Aislados	Tipo Carbapenemasa
HGUA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14	(9) OXA-51, (5) OXA-51 + OXA-23
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	(3) VIM
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	(1) VIM
HGUE	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	(1) OXA-51 + OXA-23
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	(2) VIM

TABLA 29. Resultados obtenidos por el sistema *Carbaplex iD* en los dos centros incluidos en el estudio HGUA y HGUE (Hospital General Universitario de Alicante y Hospital General Universitario de Elche).

Comparando los resultados obtenidos por Gold Standard y los obtenidos por el sistema *Carbaplex iD*, se observa una concordancia en los resultados del 100%. Los resultados tras el análisis por el sistema *Carbaplex iD* comparado con los resultados obtenidos por el Gold Standard se encuentran recopilados en la tabla 30.

		Gold Standard		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Carbaplex iD</i>	Positivo	21	0	21
	Negativo	0	1.086	1.086
	Total	21	1.086	1.107

TABLA 30. Resultados obtenidos tras el análisis por el método Gold Standard y el sistema *Carbaplex iD* de la identificación de microorganismos portadores de carbapenemasas de los microorganismos aislados a partir de muestras de pacientes con sospecha de infección nosocomial de los dos centros incluidos en el estudio.

De los resultados mostrados en la tabla 30 se puede deducir que la prevalencia de cepas productoras de carbapenemasas en el conjunto de muestras testadas es de 0,018 y que los valores predictivos tanto positivo como negativo (VPP y VPN) tienen un valor de 1, indicando que el sistema *Carbaplex iD* tiene una capacidad de discriminación muy buena tanto para cepas bacterianas que no portan genes codificantes para carbapenemasas como para cepas bacterianas que si que son portadoras.

Los datos de prevalencia, VPP y VPN se encuentran recogidos en la tabla 31 junto a su intervalo de confianza al 95% para cada valor.

<i>Carbaplex iD</i>	Valor estimado	Intervalo de confianza al 95%
VPP	1	0,807-1
VPN	1	0,995-1
Prevalencia	0,018	0,014-0,029

TABLA 31. Valores de VPP y VPN, prevelancia total de cepas portadoras de genes codificantes de carbapenemasas e IC al 95%.

Al analizar por MLST la clonalidad de cada uno de los microorganismos identificados como productores de carbapenemasas, en la especie *A. baumannii* se identificaron 7 nuevos secuenciotipos (ST 921, 922, 923, 924, 925, 926 y 927) que no se encontraban identificados en la base de datos de Oxford.

En cuanto al análisis por MLST de los aislados de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas, se aislaron 5 ST nuevos aunque están pendientes de asignación por parte de la base de datos de Oxford por lo que no se puede facilitar un ST en concreto.

El único aislado de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasas se identificó como ST 147.

Los resultados obtenidos del análisis de clonalidad se encuentran resumidos en las tablas 32-36 separados por tipo de microorganismo y centro donde se aisló.

Espece	ST	No. Aislados	Tipo Carbapenemasa
<i>Acinetobacter baumannii</i>	121	1	OXA-51
	921	1	OXA-51
	922	1	OXA-51
	923	1	OXA-51 + OXA-23
	924	5	OXA-51
	924	1	OXA-51 + OXA-23
	925	1	OXA-51 + OXA-23
	926	1	OXA-51
	927	2	OXA-51 + OXA-23

TABLA 32. Secuenciotipos identificados en *A. baumannii* y tipo de carbapenemasa de la que era portador en aislados procedentes del Hospital General Universitario de Alicante.

Especie	ST	No. Aislados	Tipo Carbapenemasa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No asignado	1	VIM
	No asignado	1	VIM
	No asignado	1	VIM

TABLA 33. Secuenciotipos identificados en *P. aeruginosa* y tipo de carbapenemasa de la que era portador en aislados procedentes del Hospital General Universitario de Alicante.

Especie	ST	No. Aislados	Tipo Carbapenemasa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	147	1	VIM

TABLA 34. Secuenciotipo identificado en *K. pneumoniae* y tipo de carbapenemasa de la que era portador en aislados procedentes del Hospital General Universitario de Alicante.

Especie	ST	No. Aislados	Tipo Carbapenemasa
<i>Acinetobacter baumannii</i>	927	1	OXA-51 + OXA-23

TABLA 35. Secuenciotipos identificados en *A. baumannii* y tipo de carbapenemasa de la que era portador en aislados procedentes del Hospital General Universitario de Elche.

Especie	ST	No. Aislados	Tipo Carbapenemasa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No asignado	1	VIM
	No asignado	1	VIM

TABLA 36. Secuenciotipos identificados en *P. aeruginosa* y tipo de carbapenemasa de la que era portador en aislados procedentes del Hospital General Universitario de Elche.

4.4 EXPERIMENTO 3: DETECCIÓN DE PACIENTES INGRESADOS EN UCI COLONIZADOS POR BACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS

Se procesaron 67 exudados rectales procedentes de pacientes con ventilación mecánica ingresados en la UCI del Hospital General Universitario de Alicante, de los cuales mediante el método Gold Standard se identificó 13 muestras como positivas en las que se detectó la presencia de microorganismos productores de carbapenemasas. En la tabla 37 se muestran los resultados obtenidos por el método Gold Standard.

No. de muestras	Positivas producción Carbapenemasas	Carbapenemasa identificada
67	13	(10) OXA-51, (2) VIM y (1) OXA-51 + VIM

TABLA 37. Muestras de exudado rectal identificadas como positivas para la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas mediante el método Gold Standard.

Por otro lado, al procesar en paralelo las muestras de exudado rectal empleando el medio cromogénico *CarbaSmart* e identificación del microorganismo por MALDI-TOFF se identificaron 20 muestras positivas para la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas, se consideró muestra positiva para microorganismo productor de

carbapenemasas aquella muestra en la que se observó crecimiento de cualquier microorganismo en la placa cromogénica después de 24 horas de incubación en estufa a 37°C. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 38.

No. de muestras	Positivas producción Carbapenemasas	Microorganismo identificado por muestra positiva
67	20	(10) <i>A. baumannii</i> , (5) <i>P. aeruginosa</i> , (2) <i>K. pneumoniae</i> , (1) <i>M. morgani</i> , (1) <i>S. maltophilia</i> (1) <i>A. baumannii</i> + <i>K. pneumoniae</i>

TABLA 38. Muestras de exudado rectal identificadas como positivas para la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas empleando el medio cromogénico *CarbaSmart*.

Cuando se analizaron las muestras de exudados rectales empleando el sistema *Carbaplex iD* se obtuvieron unos resultados similares a los obtenidos por el método Gold Standard. Los resultados se encuentran recogidos en la tabla 39.

No. de muestras	Positivas producción Carbapenemasas	Carbapenemasa identificada
67	13	(10) OXA-51, (2) VIM y (1) OXA-51 + VIM

TABLA 39. Muestras de exudado rectal identificadas como positivas para la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas mediante el sistema *Carbaplex iD*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por el método Gold Standard y los resultados obtenidos tanto por el medio *CarbaSmart* como por el sistema *Carbaplex iD* se procedió a calcular los parámetros de Sensibilidad, Especificidad y Razones de Verosimilitud positiva y negativa (CP+ y CP-) para las dos metodologías a evaluar en la

detección de pacientes colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas, los resultados obtenidos se encuentran resumidos en las tablas 40-43.

		Gold Standard		
		Positivo	Negativo	Total
<i>CarbaSmart</i>	Positivo	13	7	20
	Negativo	0	47	47
	Total	13	54	67

TABLA 40. Resultados obtenidos tras el análisis por el método Gold Standard y el medio *CarbaSmart* para la identificación de pacientes colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas a partir de muestras de exudado rectal.

<i>CarbaSmart</i>	Valor estimado	Intervalo de confianza al 95%
Sensibilidad	1	0,716-1
Especificidad	0,87	0,744-0,941
CP+	7,714	3,864-15,397
CP-	0	-

TABLA 41. Resumen de Sensibilidad, Especificidad y Razones de Verosimilitud (CP+ y CP-) e IC al 95% para medio *CarbaSmart* en muestras de exudado rectal.

		Gold Standard		
		Positivo	Negativo	Total
<i>Carbaplex iD</i>	Positivo	13	0	13
	Negativo	0	54	54
	Total	13	54	67

TABLA 42. Resultados obtenidos tras el análisis por el método Gold Standard y el sistema *Carbaplex iD* para la identificación de pacientes colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas a partir de muestras de exudado rectal.

<i>Carbaplex iD</i>	Valor estimado	Intervalo de confianza al 95%
Sensibilidad	1	0,716-1
Especificidad	1	0,917-1
CP+	-	-
CP-	0	-

TABLA 43. Resumen de Sensibilidad, Especificidad y Razones de Verosimilitud (CP+ y CP-) e IC al 95% para sistema Carbaplex iD en muestras de exudado rectal.

Con los resultados obtenidos sobre la misma población muestral por el medio cromogénico *CarbaSmart* y por el sistema *Carbaplex iD* se procedió a la comparación entre ambos con el fin de determinar estadísticamente cual de los dos tests sería mejor utilizar para identificar a pacientes colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas a partir de exudado rectal, para ello se empleó el test estadístico de McNemar.

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas a nivel de Sensibilidad y a nivel de la Especificidad se calculó el *p-valor* a un nivel de significación de 0,05 con los resultados obtenidos sobre la población enferma (pacientes colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas) y sobre la población sana (pacientes no colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas) previamente determinado por el método Gold Standard.

En las tablas 44-45 se encuentran resumidos los resultados obtenidos.

		CarbaSmart		Total	<i>p</i> -valor
		Positivo	Negativo		
Carbaplex <i>iD</i>	Positivo	13	0	13	1
	Negativo	0	0	0	
	Total	13	0	13	

TABLA 44. Test estadístico de McNemar sobre la población enferma. Comparación de resultados obtenidos entre el medio *CarbaSmart* y el sistema *Carbaplex iD*. A nivel de Sensibilidad no se observan diferencias estadísticamente significativas entre emplear cualquiera de las dos metodologías.

		CarbaSmart		Total	<i>p</i> -valor
		Positivo	Negativo		
Carbaplex <i>iD</i>	Positivo	0	0	0	0.0156
	Negativo	7	47	54	
	Total	7	47	54	

TABLA 45. Test estadístico de McNemar sobre la población sana. Comparación de resultados obtenidos entre el medio *CarbaSmart* y el sistema *Carbaplex iD*. A nivel de Especificidad se observan diferencias estadísticamente significativas (*p*-valor = 0,0156).

Los resultados obtenidos por el test de McNemar indican que no existen diferencias estadísticamente significativas a nivel de Sensibilidad entre *CarbaSmart* y *Carbaplex iD* aunque a nivel de Especificidad sí que se han observado diferencias estadísticamente significativas (*p*-valor = 0,0156) entre ambas metodologías.

4.5 EXPERIMENTO 4: VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN LA PLATAFORMA COMERCIAL *Sepsis Flow Chip*

Se procesaron 14 cepas bacterianas con distintos genes codificantes para carbapenemasas como representación de todos los mecanismos de resistencia identificados por *Sepsis Flow Chip*.

El sistema de identificación y detección de mecanismos de resistencia *Sepsis Flow Chip* logró identificar correctamente todos los mecanismos de resistencia de las cepas de colección empleadas en su evaluación. A continuación se muestran en imágenes los resultados obtenidos por *Sepsis Flow Chip*.



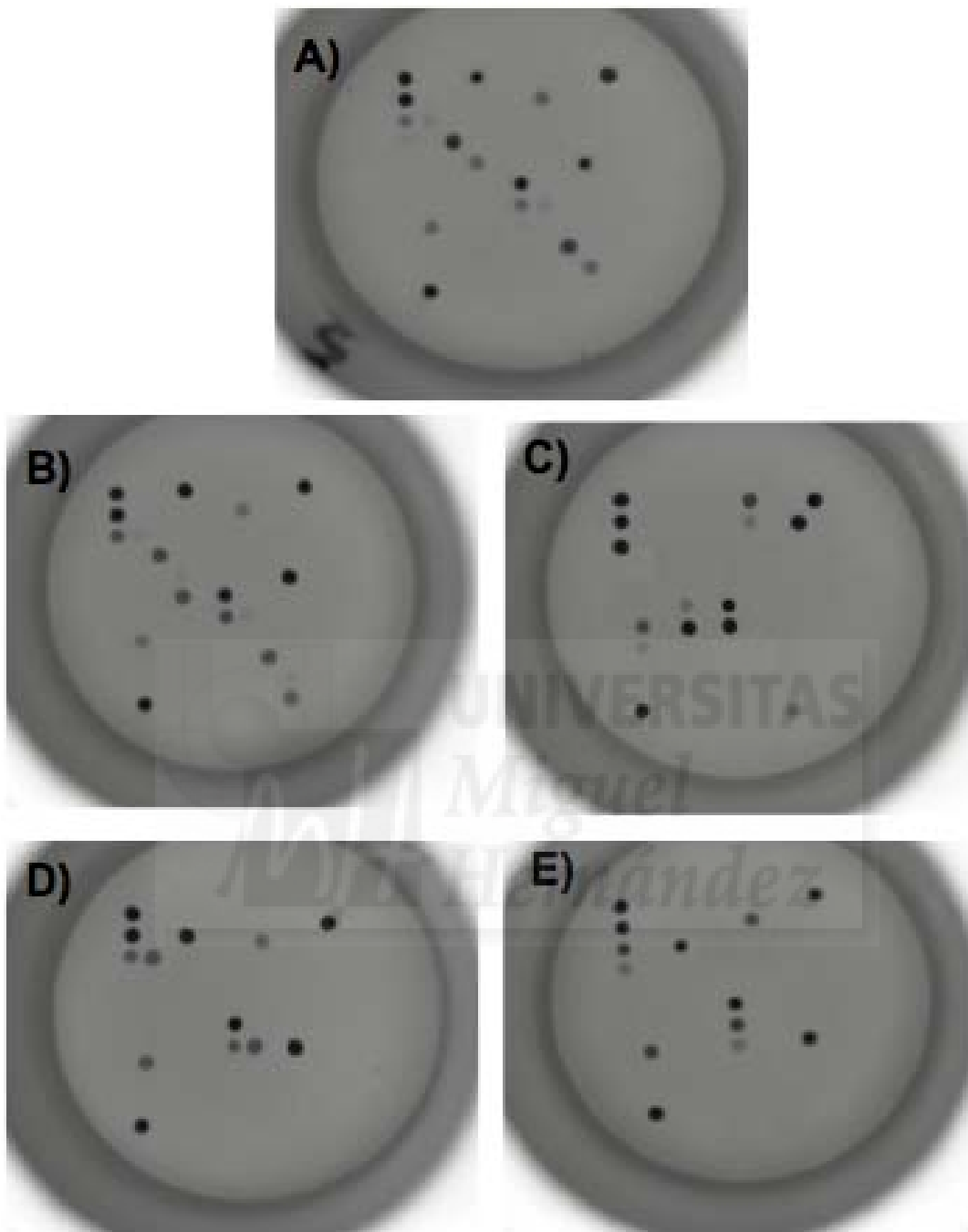


FIGURA 40. Resultados obtenidos por *Sepsis Flow Chip*. De izquierda a derecha, *K. pneumoniae* blaSHV/blaKPC, *K. pneumoniae* blaSHV/blaCTXM/blaKPC, *E. coli* blaCTXM/blaGES, *S. marcescens* blaSME, *Enterobacteriaceae* blaNMC.

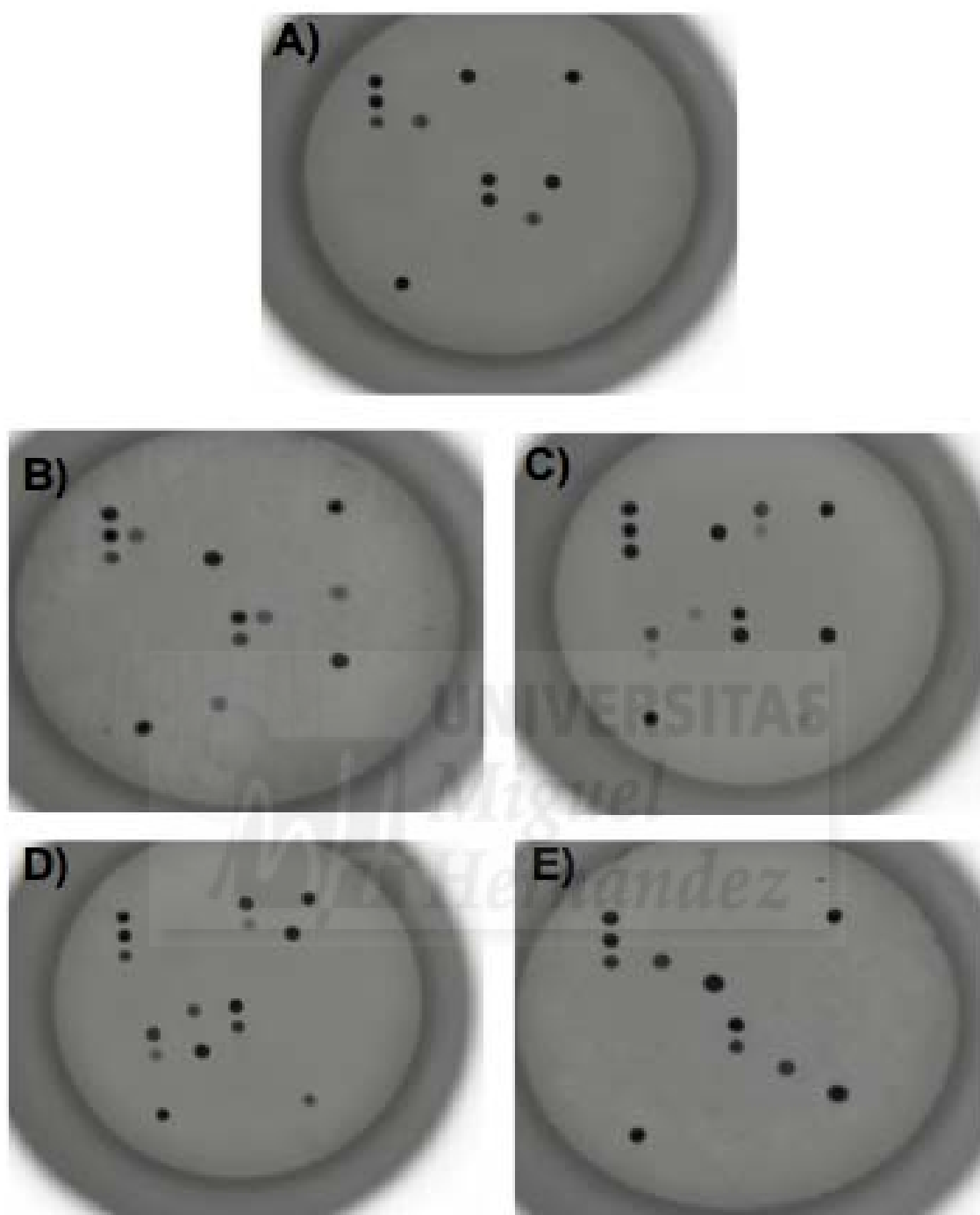


FIGURA 41. Resultados obtenidos por *Sepsis Flow Chip*. De izquierda a derecha, *P. aeruginosa* blaSPM, *A. baumannii* blaSIM/blaOXA-51, *E. coli* blaNDM/blaCTXM, *E. coli* blaVIM/blaCTXM, *P. aeruginosa* blaIMP-3.

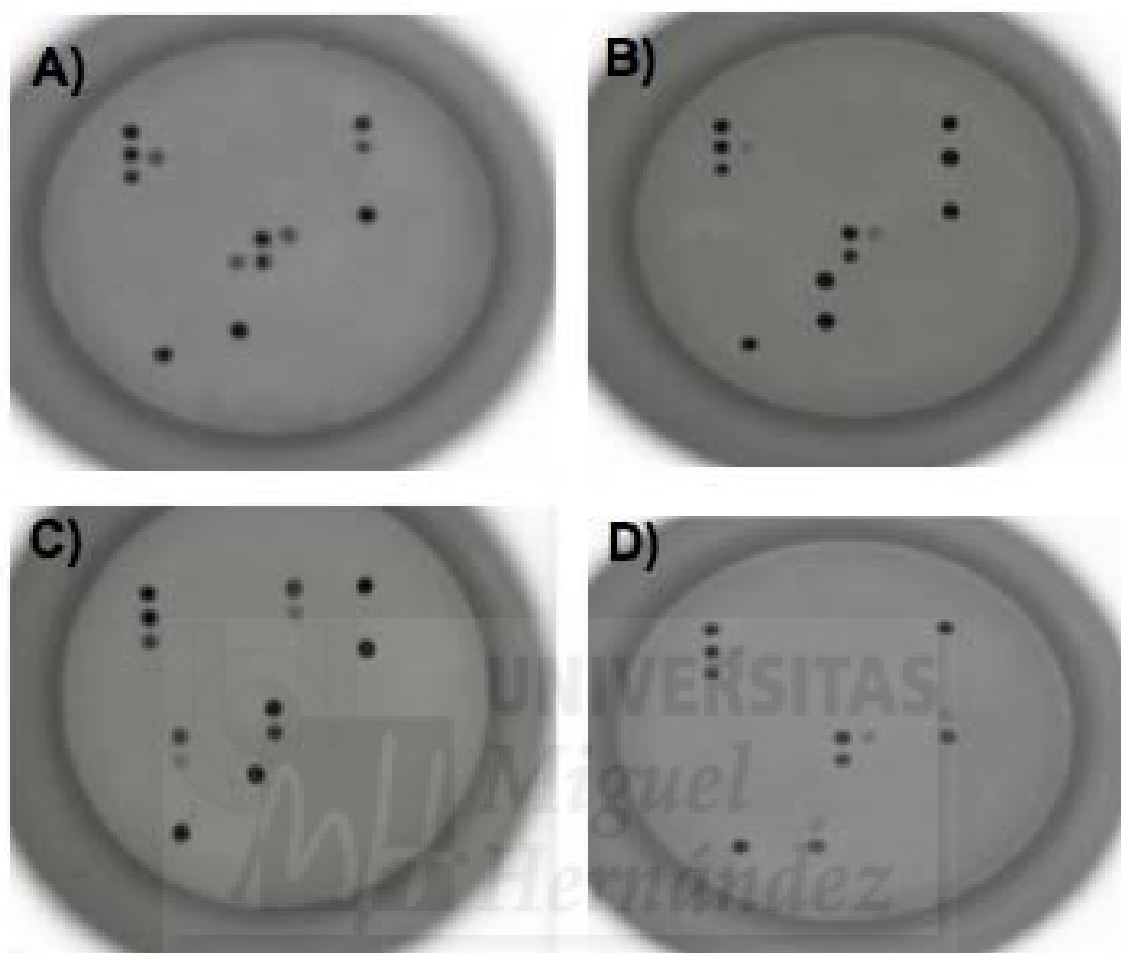


FIGURA 42. Resultados obtenidos por *Sepsis Flow Chip*. De izquierda a derecha, *A. baumannii* blaOXA-23/blaOXA-51, *A. baumannii* blaOXA-24/blaOXA-51, *E. coli* blaOXA-48 y *A. baumannii* blaOXA-58/blaOXA-51.

Sepsis Flow Chip identificó correctamente todos los marcadores de resistencia a carbapenems presentes en las cepas bacterianas empleadas en su validación. A continuación se muestra en la tabla 46 un resumen de los resultados obtenidos.

Carbapenemasa	Clase Molecular	No. de muestras	Detectadas Correctamente
KPC	A	2	2
SME	A	1	1
NMC	A	1	1
GES	A	1	1
IMP	B	1	1
VIM	B	1	1
SPM	B	1	1
NDM	B	1	1
SIM	B	1	1
OXA-23-like y OXA-51-like	D	1	1
OXA-24-like y OXA-51-like	D	1	1
OXA-58-like y OXA-51-like	D	1	1
OXA-48-like	D	1	1

TABLA 46. Resultados obtenidos por *Sepsis Flow Chip* en la validación del sistema sobre una colección conocida de cepas bacterianas productoras de carbapenemasas.



5 DISCUSIÓN

5.1 DISCUSIÓN

La resistencia antibiótica es uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel global. Debido a muchos factores, las infecciones graves por bacterias multirresistentes son cada vez más frecuentes y provocan un incremento de la morbilidad y mortalidad de los pacientes, así como un importante gasto sanitario.

Este fenómeno es muy complejo y entre los múltiples factores que influyen, podemos destacar el uso incorrecto de los antibióticos, la transmisión de cepas resistentes dentro del sistema sanitario y la utilización inadecuada de los antibióticos en animales como los tres principales pilares más implicados.

Dentro de este problema, destaca el reciente incremento de bacilos Gram negativos resistentes a betalactámicos por la importante repercusión que este fenómeno tiene en la terapia de las infecciones graves asociadas a estos microorganismos. Desde hace muchos años, estos microorganismos han desarrollado diferentes betalactamasas que han ido inactivando diferentes antibióticos de esta familia, pero en los últimos años hemos visto el gran incremento de infecciones graves asociadas a enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido, que limita la utilización de cefalosporinas de tercera generación como tratamiento empírico de estos procesos. En caso de sospecha clínica de que el proceso infeccioso podría estar provocado por uno de estos gérmenes se ha generalizado la utilización de un carbapenem con alternativa más segura; de hecho, en todos los estudios EPINE, se detecta un gran consumo de meropenem en todos los hospitales de nuestro entorno.

Recientemente, este paradigma se está rompiendo porque cada vez más frecuentemente, están apareciendo en nuestros hospitales, cepas de enterobacterias portadoras de carbapenemasas, familia de betalactamasas que inactivan a los carbapenems. La difusión de estas cepas, constituye un problema de primera magnitud en nuestros hospitales y obliga a realizar el diagnóstico microbiológico lo más rápidamente posible con objeto de modificar el tratamiento en el caso de que el paciente esté infectado por una de esas cepas.

Con respecto al diseño del sistema *Carbaplex iD*

La resistencia a β -lactámicos se puede producir por varios mecanismos como mecanismos de expulsión activa, modificación de la permeabilidad de la membrana bacteriana, modificación de las PBP's o por el mecanismo más eficaz; la producción de β -lactamasas^{15,23,72-74}. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse localizados a nivel del cromosoma bacteriano o pueden estar asociados a elementos móviles conocidos como secuencias de inserción localizados a nivel plasmídico de fácil transmisión horizontal entre especies bacterianas.

Actualmente se conocen más de 800 tipos distintos de β -lactamasas¹⁷ siendo las que tienen más importancia a nivel clínico las β -lactamasas de espectro extendido y las que hidrolizan eficientemente los carbapenems conocidas como carbapenemasas.

Metodológicamente en los laboratorios de microbiología clínica se han utilizado distintas aproximaciones para la identificación de cepas bacterianas portadoras de dichos mecanismos de resistencias a β -lactámicos. Estas metodologías principalmente basadas en determinaciones fenotípicas en las que la detección de estas enzimas se hace de una manera indirecta se centran en el estudio de susceptibilidad antibiótica a β -lactámicos, por lo que la confirmación del mecanismo de resistencia se debe hacer recurriendo a técnicas moleculares como la PCR³⁸. Además estas aproximaciones clásicas al estudio e identificación de microorganismos multirresistentes cuentan con el paso limitante necesario del aislamiento y cultivo del microorganismos haciendo que se dilate en el tiempo el diagnóstico final haciendo que normalmente se requiera el empleo de antibioterapias empíricas previas al conocimiento del resultado microbiológico y su posterior reajuste en patologías tan graves como las bacteriemias⁷⁵.

La bacteriemia es una de las enfermedades infecciosas más graves, con unas tasas de mortalidad que rondan el 30-50% de los pacientes⁷⁶⁻⁷⁹; además, debido al envejecimiento de la población, a las enfermedades crónicas y a la inmunodepresión y sobretodo la incremento de la resistencia a los antibióticos, es un proceso cada vez más difícil de tratar. Las nuevas técnicas moleculares^{30,80-83} están suponiendo una revolución en el campo de la Microbiología Clínica ya que son unas herramientas metodológicas extraordinariamente potentes que permiten aportar datos novedosos que mejoran el conocimiento de la patogenia, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades

infecciosas, especialmente en los casos en los que los métodos clásicos presentan más limitaciones.

Aunque la aplicación de las nuevas técnicas moleculares para la detección de organismos multirresistentes va en aumento, sobre todo las técnicas basadas en la tecnología de la PCR⁸³⁻⁸⁸. Aún no existen sistemas moleculares capaces de suplir por completo el cultivo microbiológico por lo que estas técnicas actualmente son un complemento muy importante al diagnóstico microbiológico. En nuestro trabajo hemos diseñado y validado un sistema molecular basado en la PCR a Tiempo Real Multiplex (*Carbaplex iD*) capaz de detectar los marcadores de resistencia a carbapenems más importantes a nivel clínico en un periodo de tiempo de 80 minutos a partir de ADN total con el fin de complementar el diagnóstico microbiológico para un correcto manejo de los pacientes afectados por microorganismos portadores de genes codificantes para carbapenemasas.

El sistema *Carbaplex iD* ha sido diseñado para la detección simultánea de los marcadores de resistencia a carbapenems *blaKPC*, *blaSME*, *blaNMC/IMI*, *blaGES*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSPM*, *blaNDM*, *blaSIM*, *blaIMP*, *blaOXA23*, *blaOXA24*, *blaOXA48*, *blaOXA51* y *blaOXA58* bajo unas mismas condiciones de PCR. Debido a la heterogeneidad de la secuencia de ácidos nucleicos de cada marcador, el diseño se hizo sobre las regiones genéticamente conservadas de cada gen haciendo posible detectar la mayoría de los distintos alelos descritos en la bibliografía para cada marcador. Esta característica hace que el sistema pueda detectar más de 250 marcadores de resistencia haciendo que el sistema *Carbaplex iD* sea uno de los más amplios en la detección de marcadores de resistencia a carbapenems en comparación con los que se dispone actualmente como FilmArray BCID (Biomérieux), Verigene GN-BC (Nanosphere), Xpert Carba R (Cepheid), Eazyplex SuperBug (Amplex). Ya que estos sistemas detectan un grupo reducido de carbapenemasas con interés clínico.

Con respecto a la validación clínica del sistema *Carbaplex iD*

Sensibilidad analítica del sistema *Carbaplex iD*

Según los resultados obtenidos en nuestros experimentos la sensibilidad analítica del

sistema hace que sea capaz de detectar cada diana hasta un límite inferior de 10 copias/ μ l de cada diana y con eficiencias en la reacción que se sitúan en el rango 1,93-2. La reacción de PCR a Tiempo Real con peor eficiencia fue la multiplex 6 diseñada para detectar el grupo *blaIMP*, aunque es lo suficientemente sensible para que tenga utilidad clínica. Debido a su sensibilidad analítica hace que el sistema *Carbaplex iD* se pueda emplear de manera satisfactoria en muestras biológicas proveniente de pacientes con sospecha clínica de infección o colonización por microorganismos multirresistentes, con marcadores de resistencia a carbapenems.

Sensibilidad, Especificidad y Razones de Verosimilitud del sistema *Carbaplex iD*

En una evaluación controlada del sistema sobre una colección de cepas bacterianas en las que se incluyeron controles negativos y una amplia variedad de marcadores de resistencia a carbapenems se logró identificar correctamente todos los marcadores de resistencia a carbapenems tanto cuando se encontraban en combinación de más de un marcador como solos, exceptuando una cepa portadora del marcador *blaIMP* alelo 4.

En el análisis de la secuencia de la sonda Taqman IMP-3-like del sistema *Carbaplex iD* para la detección del grupo IMP y el fragmento de secuencia del gen IMP-4 con el que debería hibridar, observamos la existencia de discrepancias en la composición de la secuencia de ácidos nucleicos haciendo imposible la reacción de detección por parte del sistema *Carbaplex iD*. Al ser demostrado experimentalmente la imposibilidad de detectar el alelo 4 del grupo IMP, teóricamente el sistema *Carbaplex iD* tampoco podría detectar los alelos 26 y 38 del mismo grupo por la misma razón.

El sistema mostró una Sensibilidad de 0,991 (IC95% 0,945-0,999) y una Especificidad de 1 (IC95% 0,936-1). Mostrando la capacidad del sistema de detectar la mayoría de los marcadores de resistencia a carbapenems con importancia clínica. Las Razones de Verosimilitud positiva y negativa se situaron entre los valores >10 y 0,0089, indicando una capacidad discriminatoria de la prueba para identificar cepas bacterianas portadoras de genes codificantes para carbapenemasas muy buena.

Prevalencia de cepas resistentes a carbapenems en infección nosocomial en dos hospitales de la provincia de Alicante y cálculo de Valores Predictivos para el sistema *Carbaplex iD*.

En un experimento más cercano a un escenario real de diagnóstico, cuando se evaluó el sistema con 1.107 cepas bacterianas consecutivas aisladas a partir de muestras biológicas de infección nosocomial de dos centros participantes (Hospital General Universitario de Alicante y Hospital General Universitario de Elche), se identificaron un total de 21 cepas productoras de carbapenemasas coincidiendo completamente con el método Gold Standard empleado. De estos resultados se deduce que los Valores predictivos tanto positivos como negativos del sistema *Carbaplex iD* toman un valor de 1, indicando que el sistema tiene una capacidad de discriminación muy buena tanto para cepas bacterianas que no portan genes codificantes para carbapenemasas como para cepas bacterianas que sí que son portadoras.

Los resultados obtenidos en dicho experimento mostraron que las tasas de resistencia a carbapenems fueron del 21,6% (239/1.107 aislados) siendo portadores de genes codificantes para carbapenemasas el 8,7% (21/239 aislados), representando el 1,8% sobre el total de cepas incluidas en el estudio (21/ 1.107 aislados). Las especies bacterianas identificadas como productoras de carbapenemasas fueron *A. baumannii* (15), *P. aeruginosa* (5) y *K. pneumoniae* (1). Atendiendo al tipo de carbapenemasa identificado, se observó que en la especie *A. baumannii* las carbapenemasas más frecuentes identificadas fueron las del grupo D, 9 aislados portadores de *blaOXA-51* y 6 aislados portadores de *blaOXA-51* y *blaOXA-23* al mismo tiempo. En *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* se identificaron únicamente la carbapenemasa de la clase B *blaVIM* en 5 y 1 cepa bacterianas respectivamente.

Los análisis de clonalidad revelaron la presencia de nuevos secuenciotipos no descritos e identificados gracias a este trabajo para *A. baumannii*, identificándose los nuevos secuenciotipos ST 921, 922, 923, 924, 925, 926 y 927. Además también se identificaron nuevos secuenciotipos para *P. aeruginosa* aunque no se pudieron asignar debido a la falta de actualización de la base de datos albergada en el departamento de zoología de la Universidad de Oxford (Reino Unido), (<http://pubmlst.org>).

Estos resultados demuestran la capacidad del sistema *Carbaplex iD* para ser incluido en la rutina de trabajo de un laboratorio de microbiología clínica ya que los resultados obtenidos serían fiel reflejo de la situación real de diagnóstico siendo de igual utilidad que los métodos de referencia empleados en la actualidad pero con la ventaja de la

reducción del tiempo de diagnóstico.

Con respecto a la aplicación del sistema *Carbaplex iD* como herramienta de cribado para la identificación de pacientes colonizados por microorganismos productores de carbapenemasas.

Debido al incremento que desde 2010²⁶ de la aparición de epidemias localizadas en distintos países europeos de cepas productoras de carbapenemasas y en España en concreto de cepas productoras de carbapenemasas de la clase A (*blaKPC*), clase B (*blaVIM*) y clase D (*blaOXA-48*). Se hace necesario la implantación a nivel mundial de planes específicos para la identificación de pacientes colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas con el fin de frenar la dispersión de dichos microorganismos.

Estos planes de intervención para frenar la dispersión de estos organismos multirresistentes dentro de un centro sanitario, suponen un reto importante y un gran esfuerzo para los SNS tanto a nivel de recursos humanos como económicos. Debido a que las medidas fundamentales para el control de su dispersión se basan en la identificación precoz de los casos, se hace necesario de sistemas de diagnóstico capaces de identificar de manera rápida y efectiva dichos casos.

Existen distintos niveles de actuación para el control en la dispersión de estos microorganismos dentro de un centro hospitalario como son los programas activos de vigilancia, la protección de los pacientes hospitalizados con medidas de contención y una mejora en la preparación del personal sanitario para afrontar las infecciones ocasionadas por estos microorganismos.

Tras analizar los resultados estadísticos obtenidos en el experimento 3 de este trabajo “APLICACIÓN DEL SISTEMA *Carbaplex iD* EN LA DETECCIÓN DE PACIENTES COLONIZADOS POR ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS “ por el test de McNemar donde se compara el sistema *Carbaplex iD* con la metodología de elección empleada como es el cultivo microbiológico en medio selectivo. Se deduce que para la identificación de pacientes colonizados por bacterias productoras de carbapenemasas empleando como muestra

exudado rectal, es mejor el empleo del sistema *Carbaplx iD* ya que no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas a nivel de sensibilidad con el medio *CarbaSmart* (p -valor = 1) pero si que ha mostrado mejores valores de especificidad y además estas diferencias son estadísticamente significativas (p -valor = 0,0156). Las diferencias a nivel de especificidad entre las dos metodologías recaen en el alto número de falsos positivos generados por el medio *CarbaSmart* haciendo que este sistema sea peor que *Carbaplex iD* en la detección de pacientes portadores a nivel rectal de microorganismos multirresistentes y que llevados a la práctica clínica, si se empleara como método de elección en los programas de vigilancia activa para el control de la dispersión de microorganismos productores de carbapenemasas, podría suponer un aumento en los costes económicos derivados de las medidas de contención aplicadas sobre aquellos pacientes sospechosos de estar colonizados por microorganismos productores de carbapenemasas.

Con respecto a incorporación del sistema *Carbaplex iD* a la plataforma comercial Sepsis Flow Chip

Debido a los resultados prometedores obtenidos por parte del sistema *Carbaplex iD* para la identificación de microorganismos portadores de marcadores de resistencia a carbapenems lo hace ideal para complementar nuevos sistemas moleculares para el diagnóstico microbiológico basados en la PCR, así se ha incluido de manera satisfactoria como indican los resultados obtenidos en el experimento 4 de este trabajo “VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE MARCADORES DE RESISTENCIA A CARBAPENEMS EN LA PLATAFORMA COMERCIAL *Sepsis Flow Chip*” en la plataforma comercial *Sepsis Flow Chip*. Dicha plataforma se ha diseñado por la empresa española Master Diagnóstica y se basa en la tecnología PCR multiplex e hibridación reversa en un *array* de ADN con capacidad para detectar los microorganismos principales causantes de infecciones en humanos que complementada con el sistema *Carbaplex iD* hace posible la identificación del microorganismo causante de la infección y de los principales marcadores de resistencia a β -lactámicos haciendo posible el escenario ideal de diagnosticar en cuestión de horas las principales patógenos causantes de infecciones en humanos además de su potencial uso en la búsqueda activa de pacientes colonizados por microorganismos productores de BLEE y Carbapenemasas.

En resumen, la rapidez diagnóstica es un factor clave en el manejo de los pacientes con infecciones por microorganismos multirresistentes ya que mejora el pronóstico del paciente, pero además, disminuye los costes hospitalarios y ayuda a controlar la resistencia antibiótica^{75-77,89}.

Con objeto de avanzar en este reto, la microbiología clínica está introduciendo nuevos métodos diagnósticos, basados en el estudio del genoma de los microorganismos que permiten tener resultados en tiempos cortos y que pretenden complementar y acelerar los resultados obtenidos mediante los sistemas clásicos basados en métodos fenotípicos que ofrecen resultados microbiológicos completos muchas horas después de la recepción de la muestra (entre 18-48 horas).

Este avance en el diagnóstico microbiológico podría cambiar el paradigma en el actual manejo de estos pacientes mejorando la utilización de tratamientos empíricos más acertados con su consecuente mejora en el uso de los antibióticos y su repercusión a largo plazo en la disminución de las tasas de resistencias de los microorganismos patógenos más frecuentes en humanos a los antibióticos de última línea como los carbapenems.



6 CONCLUSIONES

6.1 CONCLUSIONES

1. El sistema *Carbaplex iD* tiene capacidad para detectar 18 familias y un mínimo de 245 alelos distintos de las carbapenemasas más frecuentes descritas en aislados clínicos.
2. El sistema *Carbaplex iD* ha mostrado una Sensibilidad del 99% y una Especificidad del 100% con unas razones de verosimilitud positiva y negativa de >10 y 0,008 respectivamente y un valor predictivo positivo y negativo de 1.
3. La tasa de microorganismos gram negativos de origen nosocomial resistentes a carbapenems en nuestro entorno es del 21,6% y del 1,8% para microorganismos productores de carbapenemasas, siendo las principales especies bacterianas implicadas en este fenómeno *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* con unas tasas de organismos productores del 60%, 2% y 0,5% respectivamente.
4. Los tipos de carbapenemasas mas prevalentes en nuestro medio son para *A. baumannii* las cabapenemasas de la clase D *blaOXA-51* y *blaOXA-23* y para *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* la carbapenemasa de la clase B *blaVIM*.
5. En relación a la clonalidad de las cepas productoras de carbapenemasas, encontramos que los ST más frecuentes para *A. baumannii* son el 924 y 927 y para *K. pneumoniae* el 147.
6. La comparación entre el sistema *Carbaplex iD* contra placa cromogénica *CarbaSmart* para screening de portadores rectales de microorganismos productores de carbapenemasas mostró un mayor Especificidad por parte del sistema *Carbaplex iD* .
7. El sistema *Carbaplex iD* se ha adpatdo a la plataforma comercial Sepsis Flow Chip haciendo posible su implantación en los laboratorios de Microbiología Clínica.



UNIVERSITAS

Miguel

7 BIBLIOGRAFÍA

7.1 BIBLIOGRAFÍA

1. Navarro F. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2014; 32: 17–23.
2. Moreno Monge KM. Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia. *Rev Medica Costa Rica y Centroam* 2013: 599–605.
3. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1133–48.
4. Cayo R, Rodriguez M-C, Espinal P, *et al.* Analysis of genes encoding Penicillin-Binding Proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 5907–13.
5. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala J, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 234–58.
6. Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsushashi M. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984; 37:394-400.
7. Lu WP, Kincaid E, Sun Y, Bauer MD. Kinetics of β -lactam interactions with penicillin-susceptible and resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*. Involvement of acylation and deacylation β -lactam resistance. *J Biol Chem* 2001; 276: 31494–501.
8. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, *et al.* Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 2007; 67: 1027–52.
9. Goulenok TM, Majed K, Monchi M. Role and impact of carbapenem in nosocomial infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2011; 6: 45–53.
10. Shah PM. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 538–42.
11. Chambers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis* 1999; 179 Suppl : S353–9.
12. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 247–50.
13. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: Epidemiology and Prevention. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 60–7.
14. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and β -lactam

- resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 361–85.
15. Rumbo C, Gato E, Lopez M, *et al.* Contribution of efflux pumps, porins, and lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 5247–57.
 16. Piddock LJ V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 382–402.
 17. Hall BG. Revised Ambler classification of B-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 1050–1.
 18. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440–58.
 19. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012; 18: 263–72.
 20. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 470–82.
 21. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, *et al.* Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:306-25.
 22. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 373–83.
 23. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 826–36.
 24. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 351–3.
 25. Kim J, Lee JY, Kim S Il, *et al.* Rates of fecal transmission of extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients in intensive care units in Korea. *Ann Lab Med* 2014; 34: 20–5.
 26. Martínez-Martínez L, González-López J. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2015; 30: 33–7.
 27. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 8–14.
 28. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791–8.
 29. Bradley JS, Garau J, Lode H, *et al.* Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11: 93–100.

30. Doyle D, Peirano G, Lascols C, *et al.* Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3877–80.
31. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 839–53.
32. Datta P, Gupta V, Garg S, *et al.* Phenotypic method for differentiation of carbapenemases in Enterobacteriaceae: Study from north India. *Indian J Pathol Microbiol* 2012; 55: 357.
33. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 205–10.
34. Swayne RL, Ludlam H, Shet VG, *et al.* Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 35–8.
35. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, *et al.* Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 112–22.
36. Cury A, Andreazzi D, Maffucci M, *et al.* The modified Hodge test is a useful tool for ruling out klebsiella pneumoniae carbapenemase. *Clinics* 2012; 67: 1427–31.
37. Vasoo S, Cunningham S a., Kohner PC, *et al.* Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the carba NP test, with the modified hodge test for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3097–101.
38. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods* 2014; 107: 106–18.
39. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, *et al.* EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 141–60.
40. Hombach M, Mouttet B, Bloemberg G V. Consequences of revised CLSI and EUCAST guidelines for antibiotic susceptibility patterns of ESBL and AmpC β -lactamase-producing clinical Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2092–8.
41. Kahlmeter G. Breakpoints for intravenously used cephalosporins in Enterobacteriaceae - EUCAST and CLSI breakpoints. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 169–74.
42. Cantón R, Canut A, Morosini MI, *et al.* Breakpoints for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Is the problem solved? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32: 33–

- 40.
43. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, *et al.* Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 412–5.
44. Naas T, Ergani A, Carrër A, *et al.* Real-time PCR for detection of NDM-1 carbapenemase genes from spiked stool samples. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4038–43.
45. Chen L, Mediavilla JR, Endimiani A, *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (bla KPC) variants. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 579–85.
46. Swayne R, Ellington MJ, Curran MD, *et al.* Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo- β -lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42: 352–6.
47. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, *et al.* Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1608–13.
48. Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, *et al.* Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2015: 5–9.
49. Tenover FC, Canton R, Kop J, *et al.* Detection of colonization by carbapenemase-producing gram-negative bacilli in patients by use of the xpert mdro assay. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3780–7.
50. Nijhuis R, Samuelsen, Savelkoul P, *et al.* Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77: 316–20.
51. Huang T-D, Bogaerts P, Ghilani E, *et al.* Multicentre evaluation of the Check-Direct CPE® assay for direct screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from rectal swabs. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1669–73.
52. Wang L, Han C, Sui W, *et al.* MALDI-TOF MS applied to indirect carbapenemase detection: A validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strains. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 5259–66.
53. Chong PM, McCorrister S, Unger M, *et al.* MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of Enterobacteriaceae spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods* 2015; 111: 21–3.

54. Heid C a, Stevens J, Livak KJ, *et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986–94.
55. Number C. Real-Time PCR: Understanding C. *System* 2005; 43: 1–6.
56. Huggett J, Dheda K, Bustin S, *et al.* Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; 6: 279–84.
57. Lederman L. Real-Time PCR. *Biotechniques* 2008; 44: 179–83.
58. Arikawa E, Sun Y, Wang J, *et al.* Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics* 2008; 9: 328.
59. Tan W, Wang K, Drake TJ. Molecular beacons. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8: 547–53.
60. ABI. Applied Biosystems 7900HT fast real-time PCR system and 7300/7500 real-time PCR systems: chemistry guide 4348358, revision E. *ABI* 2005.
61. Van den Bruel A, Cleemput I, Aertgeerts B, *et al.* The evaluation of diagnostic tests: evidence on technical and diagnostic accuracy, impact on patient outcome and cost-effectiveness is needed. *J Clin Epidemiol* 2007; 60: 1116–22.
62. Pérez-Martínez D, Baztán JJ, González-Becerra M, *et al.* Evaluación de la utilidad diagnóstica de una adaptación española del Memory Impairment Screen de Buschke para detectar demencia y deterioro cognitivo. *Rev Neurol* 2005; 40: 644–8.
63. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, *et al.* The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1129–35.
64. Moons KG, Van Es GA, Michel BC, *et al.* Redundancy of single diagnostic test evaluation. *Epidemiology* 1999; 10: 276–81.
65. De Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, *et al.* A one-step microbial DNA extraction method using ‘Chelex 100’ suitable for gene amplification. *Res Microbiol* 1992; 143: 785–90.
66. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol -Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol. 2009: 1–14.
67. James J, Biemer MD. Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Ann of Clin Lab Sci* 1973; 3: 135-40.
68. Stover NA, Cavalcanti ARO. Using NCBI BLAST. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 2014; 1111–1135.
69. Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. *NCBI Handb* 2013.

70. Maiden MCJ, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, *et al.* MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 728–36.
71. Trajman A, Luiz RR. McNemar chi² test revisited: comparing sensitivity and specificity of diagnostic examinations. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 77–80.
72. Meletis G, Exindari M, Vavatsi N, *et al.* Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia* 2012; 16: 303–7.
73. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, *et al.* Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: Therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 102–11.
74. Mózes J, Ebrahimi F, Gorácz O, *et al.* Effect of carbapenem consumption patterns on the molecular epidemiology and carbapenem resistance of *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol* 2014; 63: 1654–62.
75. Opar A. Bad bugs need more drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 943–4.
76. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1–12.
77. Hugonnet S, Sax H, Eggimann P, *et al.* Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 76–81.
78. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, *et al.* The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 19–48.
79. Russell JA. Management of Sepsis. *N Engl J Med* 2006; 355: 1699–713.
80. García-Fernández S, Morosini M-I, Marco F, *et al.* Evaluation of the eazyplex® SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical Enterobacteriaceae isolates recovered at two Spanish hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2014: 1–4.
81. Buchan BW, Ledebor N. Emerging Technologies for the clinical microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27: 783–822.
82. Maurin M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2012; 12: 731–54.
83. Marlowe EM, Wolk DM. GeneXpert Testing: Applications for clinical microbiology. *Clin Microbiol Newsl* 2008; 30: 175–9.
84. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, *et al.* Clinical evaluation of the Filmarray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 4130–6.
85. Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, *et al.* FilmArray, an automated nested

multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection. *PLoS One* 2011; 6: e26047.

86. Bork JT, Leekha S, Heil EL, *et al.* Rapid testing using the verigene Gram-Negative blood culture nucleic acid test in combination with antimicrobial stewardship intervention against Gram-Negative bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 1588–95.

87. Dodémont M, De Mendonça R, Nonhoff C, *et al.* Performance of the Verigene Gram-negative blood culture assay for rapid detection of bacteria and resistance determinants. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3085–7.

88. Hill JT, Tran KT, Barton KL, *et al.* Evaluation of the Nanosphere Verigene BC-GN Assay for Direct Identification of Gram-Negative Bacilli and antibiotic resistance markers from positive Blood Cultures and potential impact for more-rapid antibiotic interventions. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3805–7.

89. Chalupka AN, Talmor D. The economics of sepsis. *Crit Care Clin* 2012; 28: 57–76, vi.





8 ANEXO I

8.1 SECUENCIAS CONSENSO

>KPC_consensio

ATGTCACTGTATCGCCGTCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGGC
 TGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCATTTCGCTAAA
 CTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGC
 TCAGGCGCAACTGTAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCCTGTGCAGC
 TCATTCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAGCAGG
 CCGGCTTGCTGGACACACCCATCCGTTACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTG
 GTCACCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCT
 GTCCGCGGCCGCGTGCAATACAGTGATAACGCCGCGCCAATTTGTTGCTG
 AAGGAGTTGGGCGGCCCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGC
 GATACCACGTTCCGTCTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGCCATC
 CCAGGCGATGCGCGCGATACTCATCGCCGCGCGCCGTGACGGAAAGCTTA
 CAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGCAGCGGCAGCAGTTT
 GTTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGGCG
 GTGCCGGCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAACCGGAACCTGCGGAGTGTAT
 GGCACGGCAAATGACTATGCCGTCTGTCGCCCCACTGGGCGCGCACCTATT
 GTGTTGGCCGTCTACACCCGGGCGCCTAACAAGGATGACAAGCACAGCGAG
 GCCGTCATCGCCGCTGCGGCTAGACTCGCGCTCGAGGGATTGGGCGTCAAC
 GGGCAGTAA

>SME_consensio

ATGTCAAACAAAGTAAATTTTAAAACGGCTTCATTTTTGTTTAGTGTTTGTTT
 AGCTTTGTTCGGCATTTAATGCTCATGCTAACAAAAGTGATGCTGCGGCAAA
 ACAAATAAAAAAATTAGAGGAAGACTTTGATGGGAGGATTGGCGTCTTTGC
 AATAGATACAGGATCGGGTAATACATTTGGGTATAGATCAGATGAGCGGTT
 CCCTTTATGCAGTTCATTTAAAGGTTTTTTGGCGGCTGCTGTTTTAGAGAGG
 GTGCAACAAAAAAAATAAGATATCAACCAAAGGTAAATATGAGAGTAG
 GGATCTAGAATATCATTACCTATTACAACAAAATATAAAGGCTCAGGTAT
 GACATTAGGTGATATGGCTTCTGCTGCATTGCAATATAGCGACAATGGGGC
 AACAAATATAATTATGGAACGATTTCTTGCGGTCCTGAGGGGATGACTAA

ATTTATGCGTTCTATTGGAGATAATGAGTTTAGGTTAGATCGCTGGGAACTG
 GAACTTAACACTGCAATCCCAGGAGATAAACGTGACACTTCAACGCCAAAA
 GCTGTTGCAAATAGTTTGAATAAACTAGCTTTGGGGAATGTTCTCAATGCTA
 AAGTGAAAGCGATTTATCAAAATTGGTTAAAAGGTAATACAACACTGGTGATG
 CTCGAATTCGTGCTAGTGTTCCCTGCTGATTGGGTTGTAGGTGACAAAACCTGG
 GAGCTGTGGGGCATATGGTACTGCGAATGATTATGCCGTCATTTGGCCTAAA
 AATAGAGCACCATTAATTGTCTCTATATATAACAACACGAAAATCGAAAGAT
 GATAAGCACAGTGATAAACTATTGCGGAAGCATCACGTATTGCAATTCAG
 GCAATTGATTAA

>NMC_consensu

ATGTCACTTAATGTAAAACNAAGTAGAATAGCCATCTTGTTTAGCTCTTGTT
 TAGTTTCAATATCATTTTTCTCACAGGCCAATACAAAGGGCATCGATGAGAT
 TAAAAACCTTGAAACAGATTTCAATGGTAGAATTGGTGTCTACGCTTTAGAC
 ACTGGCTCAGGTAAATCATTTCGTACAAAGCAAATGAACGATTTCCATTAT
 GTAGTTCTTTCAAAGGTTTTTTAGCTGCTGCTGTATTAAGGCTCTCAAGA
 TAATCAACTAAATCTTAATCAGATCGTGAATTATAATAACAAGAAGTTTAGA
 GTTCCATTCACCCATCACAATAAATAAAGATAATGGAATGTCATTAGGT
 GATATGGCTGCTGCCGCTTTACAATATAGCGACAATGGTGCTACTAATATTA
 TTCTTGAACGNTATATCGGTGGTCCTGAGGGTATGACTAAATTCATGCGGTC
 GATTGGAGATNAAGATTTTAGACTCGATCGTTGGGAGTTAGATCTAAACAC
 AGCTATTCNNGCGATGAACGTGACACATCTACACCTGCAGCAGTAGCTAA
 GAGCCTGAAAACCCTTGCTCTGGGTAACATACTTANTGAGCGTGAAAAGGA
 AACCTATCAGACATGGTTAAAGGGTAACACAACCGGTGCAGCGCGTATTCG
 TGCTAGCGTACCAAGCGATTGGGTAGTTGGCGATAAACTGGTAGTTGC
 GGAGCATAACGGTACGGCAAATGATTATGCGGTAGTCTGGCCAAAGAACCGN
 GCTCCTCTTATAATTTCTGTATACACNACAAAAAACGAAAAAGAAGCCAAG
 CATGAGGATAAAGTAATCGCAGAAGCTTCAAGAATCGCAATTGATAACCTT
 AAATAA

>GES_consensu

ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATG
 CGTCGGAAAAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAA
 AAGCAGCTCAGATCGGTGTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCG
 CGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTTTGCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCC
 GCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCAGGCACCGAGCGGGGGGA
 TCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCTCCTGCCACG
 GAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATT
 GGCGGACCTGCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGA
 GTCGGCTAGACCGGAAAGAGCCGGAGATGNGCGACAACACACCTGGCGAC
 CTCAGAGATACAACTACGCCTATTGCTATGGCACGTA CTGTGGCTAAAGTCC
 TCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCACACCATTGAGAGGTGGC
 TGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTTCTAAAG
 ATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACG
 ACATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATAC
 AACGGCCCCGAAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGT
 CGGTCAAGTTATTACACA ACTCATCCTGAGCACGGACAAATAG

>IMP_consensu

ATGAACAAATTATTTGTTTTATTTATATTTTTGTTTTGTAGCATTACTGCCGC
 AGGAGAGTCTTTGCCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAGAAGGCGTTTA
 TGTTCACTACTTCGTTTGAAGAAGTTAACGGTTGGGGTGTGTTCTTAAACAC
 GGTGTTGGTGGTTCTTGTAATACTGACGCCTATCTGATTGACACTCCATTTA
 CTGCTAAAGATACTGAAAAGTTAGTCACTTGGTTTGTGGAGCGCGGCTATA
 AAATAAAAGGCAGTATTTCTCACATTTTCATAGCGACAGCACGGGCGGAA
 TAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACGTATGCATCTGAATTAACAAA
 TGA ACTTCTTAAAAAAGACGGTAAGGTGCAAGCTAAAAATTCATTTAGCGG
 AGTTAGCTATTGGCTAGTTAAAAATAAAATTGAAGTTTTTTATCCAGGCCCA
 GGGCACACTCAAGATAACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTA
 TTCGGTGGTTGTTTTGTTAAACCGTACGGTCTTGGTAATTTGGGTGACGCAA
 ATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCCAAAATATTAATGTCTAAATATGGTA
 AGGCAAAACTGGTTGTTCCAAGTCATAGTGAAATTGGAGACGCATCACTCT

TGAAACTTACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGCTAAATGAAAGTAAAAAAC
CATCANAACCAAGCAACTAA

>VIM_consensu

ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAGTTATTGGTCTATTTGACCGCGTCTATCATGG
CTATTGCGAGTCCGCTCGCTTTTTCCGTAGATTCTAGCGGTGAGTATCCGAC
AGTCAGCGAAATTCCGGTTCGGGGAGGTCCGGCTTTACCAGATTGCCGATGG
TGTTTGGTTCGCATATCGCAACGCAGTCGTTTGATGGCGCAGTCTACCCGTCC
AATGGTCTCATTGTCCGTGATGGTGATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGT
GGGGTGCGAAAAACACAGCGGCACTTCTCGCGGAGATTGAGAAGCAAATTG
GACTTCCTGTAACGCGTGCAGTCTCCACGCACTTTCATGACGACCGCGTCCG
CGGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACCGTC
GACACGCCGGCTAGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCCACGCACTCTCT
AGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAACT
CTTCTATCCTGGTGCTGCGCATTTCGACCGACAACCTTAGTTGTGTACGTCCCG
TCTGCGAGTGTGCTCTATGGTGGTTGTGCGATTTATGAGTTGTCACGCACGT
CTGCGGGGAACGTGGCCGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCCACCTCCATTG
AGCGGATTCAACAACACTACCCGGAAGCACAGTTCGTCATTCCGGGGCACG
GCCTGCCGGGCGGTCTAGACTTGCTCAAGCACACAACGAATGTTGTAAAAG
CGCACACAAATCGCTCAGTCGTTGAGTAG

>GIM_consensu

ATGAAAAATGTATTAGTGTTTTTAATATTACTTGTAGCGTTGCCAGCTTTAG
CTCAGGGTCATAAACCGCTAGAAGTTATAAAAATTGAAGATGGAGTATATC
TTCATACCTCCTTTAAGAATATTGAAGGCTATGGGTTAGTTGATTCTGAATGG
GTTGGTAGTTCTGGATAATAATCAAGCCTATATTATCGACACACCTTGGTCT
GAAGAAGACACGAAGTTGTTATTATCCTGGGCGACTGACAGGGGATAACCAG
GTTATGGCTAGCATCTCAACTCATTCTCATGAAGATCGCACTGCTGGTATCA
AGTTGCTAAATTCAAAGTCAATTCCTACATACACATCAGAGTTAACTAAAA
AGCTTCTTGCCCGTGAAGGAAAGCCGGTTCCTACCCACTACTTTAAAGACGA
CGAATTCACACTGGGAAATGGGCTTATAGAGCTCTACTATCCAGGTGCTGG
GCATACAGAGGATAATATTGTTGCTTGGTTACCCAAAAGCAAATACTATTT

GGTGGCTGCCTCGTGAGGAGTCATGAGTGGGAAGGCTTAGGTTACGTAGGC
 GACGCCTCAATTAGCTCTTGGGCTGACTCAATTAATAATATTGTATCGAAAA
 AATATCCCATTCAAATGGTCGTTCCGGGGCATGGCAAAGTTGGAAGTTCAG
 ATATATTAGATCACACCATTGATCTTGCTGAATCAGCTTCTAACAAATTAAT
 GCAACCGACCGCTGAAGCGTCGGCTGATTAA

>SPM_consensu

ATGAACTCACCTAAATCGAGAGCCCTGCTTGGATTCATGGGCGCGTTTTGTT
 TGTTGCTCGTTGCGGGAGCGCCATTGTCTGCAAAAAGTTCGGATCATGTCTGA
 CTTGCCCTACAATCTAACGGCGACCAAGATTGATTCGGACGTTTTTCGTCGTC
 ACAGACCGCGATTTCTATTCTTCGAATGTCTTAGTAGCGAAAATGCTTGATG
 GGACCGTTGTCATTGTCTCTTCGCCGTTTGAAAATCTGGGTACGCAAACGCT
 TATGGATTGGGTGGCTAAGACTATGAAGCCGAAGAAAGTAGTAGCCATCAA
 TACGCACTTTCATTTGGACGGCACGGGTGGAAATGAAATTTACAAGAAGAT
 GGGCGCGGAGACGTGGTTCGAGCGATCTGACAAAGCAGTTGCGACTTGAGGA
 AAACAAGAAAGACCGGATAAAAGCAGCTGAGTTCTATAAAAACGAGGATC
 TGAAGCGAAGGATTCTGAGTTCCCATCCTGTTCCAGCGGATAATGTTTTTGA
 TTTGAAACAAGGCAAGGTCTTCTCGTTTTCTAATGAGCTGGTTGAGGTTTCA
 TTTCCAGGACCGGCTCACTCGCCCGATAATGTCGTCGTATATTTTCCCAAGA
 AGAAACTGCTGTTTGGCGGCTGCATGATAAAGCCGAAGGAAGTTGGTTATC
 TGGGAGATGCCAATGTGAAGGCATGGCCCGATTCAGCTCGGCGGCTAAAAA
 AGTTTGATGCGAAAATTGTTATACCTGGACACGGCGAATGGGGCGGACCGG
 AGATGGTTAACAAGACGATCAAGGTCGCGGAAAAGGCCGTTGGCGAAATG
 AGACTGTAG

>SIM_consensu

ATGAGAACTTTATTGATTTTATGTTTATTCGGCACTTTAAATACCGCGTTTGC
 GGAAGAAGCCCAGCCAGATTTAAAAATTGAAAAAATAGAAGAAGGGATCT
 ATCTTCATACATCTTTTCAAGAGTACAAGGGATTCGGCATCGTTAAAAACA
 AGGCTTAGTAGTTCTTGACAATCACAAGGCATATCTCATCGACACTCCAGCT
 TCCGCAGGAGATACTGAAAAGCTAGTAAACTGGCTCGAAAAAATGATTTT
 ACTGTCAATGGAAGCATTTC AACACATTTCCACGACGACAGTACTGCTGGG

ATAGAGTGGCTTAATACAAAAGTCCATCCCCACATATGCATCTAAATTGACA
 AATGAATTGCTAAATAAAAATGGCAAAACTCAAGCCAAGCACTCTTTTGAT
 AAAGAGAGCTTTTGGTTGGTCAAAAATAAAAATTGAAATTTTTTATCCAGGCC
 CAGGACACACTCAAGATAACGAAGTTGTCTGGATACCTAATAAAAAAATCC
 TATTCGGGGGCTGTTTTATAAAACCGAATGGCCTTGGCAATCTAAGTGACGC
 AAATTTGGAAGCTTGGCCAGGCTCCGCAAAAAAATGATATCAAATAACAG
 TAAGGCAAAACTTGTTATCCCAAGCCACAGTGAAATCGGAGACGCATCACT
 ATTGAAACTCACATGGGAACAGGCCATTAAAGGTTTAAATGAAAGCAAATC
 AAAACCGCCGCTCATTAATTA

>NDM_consensu

ATGGAATTGCCAATATTATGCACCCGGTCGCGAAGCTGAGCACCGCATT
 GCCGCTGCATTGATGCTGAGCGGGTGCATGCCCGGTGAAATCCGCCCGACG
 ATTGGCCAGCAAATGGAACTGGCGACCAACGGTTTGGCGATCTGGTTTTC
 CGCCAGCTCGCACCGAATGTCTGGCAGCACACTTCCTATCTCGACATGCCGG
 GTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGGTTTGATCGTCAGGGATGGCGGCCGCGT
 GCTGGTGGTCGATACCGCCTGGACCGATGACCAGACCGCCCAGATCCTCAA
 CTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCGGTCGCGCTGGCGGTGGTGACTCA
 CGCGCATCAGGACAAGATGGGCGGTATGGACGCGCTGCATGCGGCGGGGAT
 TGCGACTTATGCCAATGCGTTGTGGAACAGCTTGCCCCGCAAGAGGGGAT
 GGTGCGGCGCAACACAGCCTGACTTTCGCCGCAATGGCTGGGTGGAACC
 AGCAACCGCGCCCAACTTTGGCCCGCTCAAGGTATTTTACCCCGGCCCGGC
 CACACCAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCGACATCGCTTTT
 GGTGGCTGCCTGATCAAGGACAGCAAGGCCAAGTCGCTCGGCAATCTCGGT
 GATGCCGACACTGAGCACTACGCCGCGTCAGCGCGCGGTTTGGTGCGGCG
 TTCCCCAAGGCCAGCATGATCGTGATGAGCCATTCCGCCCCCGATAGCCGC
 GCCGCAATCACTCATAACGGCCCGCATGGCCGACAAGCTGCGCTGA

>OXA-23_consensu

ATGAATAAATATTTTACTTGCTATGTGGTTGCTTCTCTTTTTCTTTCTGGTTGT
 ACGGTTACGATAATTTAATAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGA
 CATAATCAGGTGATTCATCAATACTTTGATGAAAAAACACCTCAGGTGTG

CTGGTTATTCAAACAGATAAAAAAATTAATCTATATGGTAATGCTCTAAGCC
 GCGCAAATACAGAATATGTGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAATGCCCT
 GATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAA
 GGGCGAGAAAAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACACTAGGAG
 AAGCCATGAAGCTTTCTGCAGTCCCAGTCTATCAGGAACTTGCGCGACGTAT
 CGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGCT
 GAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGGTAGGACCATTAAAGGTT
 ACGCCTATTCAAGAGGTAGAGTTTGTTCCTCAATTAGCACATACACAGCTTC
 CATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAAAAAATATGCTTCTTTTAGAAG
 AGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACTGGTTGGGCAATGGATATAA
 AACCACAAGTGGGCTGGTTGACCGGCTGGGTTGAGCAGCCAGATGGAAAAA
 TTGTCGCTTTTGCATTAAATATGGAAATGCGGTCAGAAATGCCGGCATCTAT
 ACGTAATGAATTATTGATGAAATCATTAAAACAGCTGAATATTATTTAA

>OXA-24_consensu

ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGCATTCTATTCTAGTTTCTCTCAG
 TGCATGTTTCATCTATTTAAACTAAATCTGAAGATAATTTTCATATTTCTTCTC
 AGCAACATGAAAAAGCTATTTAAAGCTATTTTGATGAAGCTCAAACACAGG
 GTGTAATTATTATTAAGAGGGTAAAAATCTTAGCACCTATGGTAATGCTCT
 TGCACGAGCAAATAAAGAATATGTCCCTGCATCAACATTTAAGATGCTAAA
 TGCTTTAATCGGGCTAGAAAATCATAAAGCAACAACAATGAGATTTTCAA
 ATGGGATGGTAAAAAAGAAGTATCCTATGTGGGAGAAAGATATGACTTT
 AGGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCAGTTCCAGTATATCAAGAGCTTGCAAG
 ACGGACTGGCCTAGAGCTAATGCAGAAAGAAGTAAAGCGGGTTAATTTGG
 AAATACAAATATTGGAACACAGGTCGATAATTTTTGGTTAGTTGGCCCCCT
 AAAATTACACCAGTACAAGAAGTTAATTTGCCGATGACCTTGACATAAC
 CGATTACCTTTTAAATTAGAACTCAAGAAGAAGTTAAAAAATGCTTCTA
 ATTAAGAAGTAAATGGTAGTAAGATTTATGCAAAAAGTGGATGGGGAATG
 GGTGTTACTCCACAGGTAGGTTGGTTGACTGGTTGGGTGGAGCAAGCTAAT
 GGAAAAAATCCCCTTTTCGCTCAACTTAGAAATGAAAGAAGGAATGTCT
 GGTCTATTCGTAATGAAATTAATAAGTCGCTAGAAAATCTTGGAATCA
 TTAA

>OXA-48_consensu

ATGCGTGTATTAGCCTTATCGGCTGTGTTTTTGGTGGCATCGATTATCGGAA
 TGCTGCGGTAGCAAAGGAATGGCAAGAAAACAAAAGTTGGAATGCTCACT
 TTAAGAACATAAATCACAGGGCGTAGTTGTGCTCTGGAATGAGAATAAGC
 AGCAAGGATTTACCAATAATCTTAAACGGGCGAACCAAGCATTTTTACCCG
 CATCTACCTTTAAAATTCCCAATAGCTTGATCGCCCTCGATTTGGGCGTGGT
 TAAGGATGAACACCAAGTCTTTAAGTGGGATGGACAGACGCGCGATATCGC
 CACTTGAATCGCGATCATAATCTAATCACCGCGATGAAATATTCAGTTGTG
 CCTGTTTATCAAGAATTTGCCCGCCAAATTGGCGAGGCACGTATGAGCAAG
 ATGCTACATGCTTTCGATTATGGTAATGAGGACATTTTCGGGCAATGTAGACA
 GTTTCTGGCTCGACGGTGGTATTCGAATTTTCGGCCACGGAGCAAATCAGCTT
 TTTAAGAAAGCTGTATCACAATAAGTTACACGTATCGGAGCGCAGCCAGCG
 TATTGTCAAACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGTGAATATATTATTCGG
 GCTAAAACCTGGATACTCGACTAGAATCGAACCTAAGATTGGCTGGTGGGTC
 GGTTGGGTTGAACTTGATGATAATGTGTGGTTTTTTTTCGATGAATATGGATA
 TGCCACATCGGATGGTTTAGGGCTGCGCCAAGCCATCACAAAAGAAGTGC
 TCAAACAGGAAAAAATTATTCCCTAG

>OXA-51_consensu

ATGAACATTAAGCACTCTTACTTATAACAAGCGCTATTTTTATTTTCAGCCT
 GCTCACCTTATATAGTACTGCTAATCCAAATCACAGCGTTCAAATCTGA
 TGAAAAAGCAGAGAAAATTAATAATTTATTTAACGAAGCACACTACGGG
 TGTTTTAGTTATCCAACAAGGCCAACTCAACAAAGCTATGGTAATGATCTT
 GCTCGTGCTTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCGACCTTCAAATGCTTAATG
 CTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGT
 GGGATGGNAAAAAAGGCTATTCCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTA
 GCGATGCTATGAAAGCTTCCGCTATTCCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTC
 GTATTGGACTTGAGCTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCA
 ATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAA
 AATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAAC
 GCTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTGCAATCCATGCTATTCATA
 GAAGAAAAGAATGGAAATAAATATACGCAAAAAGTGGTTGGGGATGGGA

TGTAAACCCACAAGTAGGCTGGTAACTGGATGGGTTGTTTCAGCCTCAAGG
 GAATATTGTAGCGTTCTCCCTTAACTTAGAAATGAAAAAAGGAATACCTAG
 CTCTGTTTCGAAAAGAGATTACTTATAAAAAGTTTAGAACAATTAGGTATTTTA
 TAG

>OXA-55_consensu

ATGAATAAAGGTTTGCACAGAAAGCGCCTGAGTAAGCGTTTGCTGCTGCC
 ATGTTGCTGTGTTTATTGGCTCAACAAACGCAGGCTGTGGCAGCTGAGCAG
 ACCAAGGTCAGTGACGTCNGCTCTGAGGTCACGGCNGAGGGTTGGCAAGAG
 GTACGCCGCTGGGACAANCTGTTTGAATCCGCAGGNGTTAAAGGCAGTTTN
 CTGCTTTGGGATCAAAGCGTTCTTTGGGGCTCTCCAACAATCTAAGTCGCG
 CCGCCGAAGGCTTTATTCCGGCTTCCACCTTCAAGNTCCCCTCCAGCCTTAT
 TCGGTTGGAAACCGGGGCGGTGCGCGATGAAACCAGTCGTTTTAGCTGGGA
 CGGAAAGGTTTCNGAAATTGCCGNCTGGAACAGGGACCAGAGTTTTTCGCAC
 CGCAATGAAGTACTCTGTGGTGCCTGTATATCAGCAGTTGGCCAGGGAGAT
 AGGCCCCAAAGTGATGGCAGCTATGGTGCAGGCTGNAATATGGCAATCA
 GGATATCGGTGGCCAAGCGGACAGCTTCTGGCTCGACGGCCAAGTGAAGAT
 TACAGCATTTCAACAAGTGGATTTTCTAAGGCAACTGCATGACAACAAGTT
 GCCTGTGTCCGAGCGCAGCCAGCGAATTGTCAAACAGATGATGCTGACCGA
 AGCGAGTACTGACTATATNATTCGNGCCAAGACAGGCTATGGTGTGCGGCG
 TACGCCGGCCATAGGTTGGTGGGTCGGTTGGTTGGAGTTGGACGACAACAC
 TGTCTATTTGCGCGTTAACCTGGATCTGGCCTCGGCCAGCCAGTTACCGTTG
 CGCCAACAAGTGGTGAACAGGTGCTCAAGCAGGAACAGCTGCTGCCTTGA

>OXA-58_consensu

ATGAAATTATTA AAAAATATTGAGTTTAGTTTGCTTAAGCATAAGTATTGGGG
 CTTGTGCTGAGCATAGTATGAGTCGAGCAAAAACAAGTACAATTCCACAAG
 TGAATAACTCAATCATCGATCAGAATGTTCAAGCGCTTTTAAATGAAATCTC
 AGCTGATGCTGTGTTTGTACATATGATGGTCAAATATTA AAAAATATGGC
 ACGCATTTAGACCGAGCAAAAACAGCTTATATTCCTGCATCTACATTTAAA
 TTGCCAATGCACTAATTGGTTTAGAAAATCATAAAGCAACATCTACAGAAA
 TATTTAAGTGGGATGGAAAGCCACGTTTTTTTTAAAGCATGGGACAAAGATTT

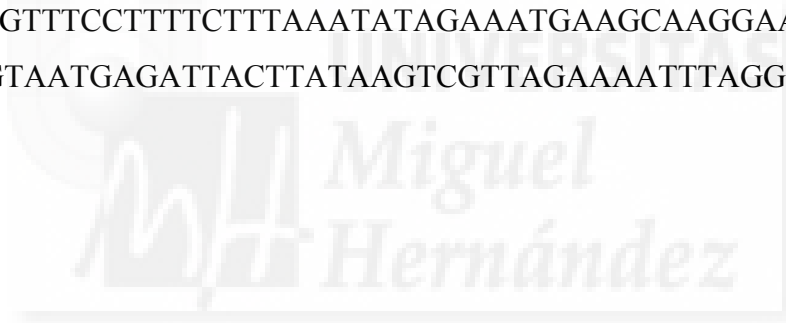
TACTTTGGGCGAAGCCATGCAAGCATCTACAGTGCCTGTATATCAAGAATTG
GCACGTCGTATTGGTCCAAGCTTAATGCAAAGTGAATTGCAACGTATTGGTT
ATGGCAATATGCAAATAGGCACGGAAGTTGATCAATTTTGGTTGAAAGGGC
CTTTGACAATTACACCTATAACAAGAAGTAAAGTTTGTGTATGATTTAGCCCA
AGGGCAATTGCCTTTTAAACCTGAAGTTCAGCAACAAGTGAAAGAGATGTT
GTATGTAGAGCGCAGAGGGGAGAATCGTCTATATGCTAAAAGTGGCTGGGG
AATGGCTGTAGACCCGCAAGTGGGTGGTATGTGGGTTTTGTTGAAAAGGC
AGATGGGCAAGTGGTGGCATTGCTTTAAATATGCAAATGAAAGCTGGTGA
TGATATTGCTCTACGTAAACAATTGTCTTTAGATGTGCTAGATAAGTTGGGT
GTTTTTCATTATTTATAA

>OXA-62_consensu

ATGAATACGATAATCTCTCGCCGGTGGCGTGCCGGCCTGTGGCGGCGGCTG
GTCGGCGCGGTCGTCTTGCCCGCAACGCTCGCCGCCACCCCTGCGGCCTATG
CGGCCGACGTGCCGAAAGCCGCGTTGGGGCGCATCACCGAGCGCGCCGACT
GGGGCAAGCTGTTCCGCCGCGGAGGGCGTGAAGGGCACGATCGTGGTGCTCG
ACGCACGCACGCAAACCTATCAGGCCTACGACGCCGCACGTGCCGAGAAGC
GCATGTCGCCGGCGTCGACCTACAAGATATTCAACAGCCTGCTGGCGCTCG
ACTCCGGGGCGCTGGACAACGAACGCGCGATCATTCCCTGGGATGGCAAGC
CGCGACGCATCAAGAACTGGAACGCGGCGATGGACCTGAGGACCGCGTTTC
GCGTGTCATGCCTGCCCTGCTATCAGGTCGTCTCGCACAAAGATCGGGCGCCG
GTACGCGCAGGCGAAGCTGAACGAGGTCGGGTATGGCAACCGCACCATTTGG
CGGCGCGCCGGACGCCTATTGGGTCGACGACAGTCTGCAGATTTGCGCGCG
TGAGCAGGTGGACTTCGTGCAGCGTCTCGCGCGTGGCACGTTGCCGTTCTCT
GCGCGCTCGCAGGACATCGTGCGCCAGATGTGATCGTCGAAGCCACGCCG
GACTATGTGCTTCACGGCAAGACGGGTGGTTCGTCGACAAGAAGCCCGAT
ATCGGCTGGTGGGTAGGGTGGATCGAGCGCGACGGCAACATCACCAGCGTC
GCGATCAACATCGACATGCTGTCGGAGGCGGACGCCCCGAAACGGGCACGC
ATCGTGAAGGCGGTGCTGAAGGACCTGAAGCTGATCTGA

>OXA-182_consensu

ATGAAAAAATTTATACTTCCTATCTTCAGCATTCTATTCTACTTTCTCTCAG
TGCATGCTCATCTATTCAAACATAAATTTGAAGATACTTTTCATATTTCTAATC
AGAAACATGAAAAAGCTATTAAGCTATTTTGATGAAGCTCAAACACAAG
GTGTAATTATTATTAAGGAAGGTAAAAATATTAGCTCCTATGGTAATAACCT
TGTACGAGCACATACAGAATATGTCCCTGCATCAACATTTAAGATGCTAAAT
GCTTTAATCGGACTAGAAAATCATAAAGCGACAACAAATGAGATTTTTAAA
TGGGATGGTAAAAAAGATCTTATCCTATGTGGGAGAAAGATATGACTTTG
GGTGAGGCCATGGCACTTTCAGCTGTTCCCTGTATATCAAGATCTTGCGAGAC
GGATTGGCTTAAATCTCATGCAAAAAGAAGTTAAACGCGTTGGTTTTGGTA
ATATGAACATTGGAACACAAGTTGATAATTTCTGGTTGATTGGTCCTCTTAA
GATTACACCAATACAAGAAGTGAATTTTGCCGATGATCTTGCGAATAATCG
ATTACCCTTTAAATTAGAACTCAAGAAGAAGTAAAAAAGATGCTTCTGAT
TAAAGAAGTCAATGGTAGTAAAATTTATGCTAAAAGCGGATGGGGAATGGA
TGTAAGCCCACAAGTAGGTTGGTTAACAGGTTGGGTAGAAAAATCTAATGG
AGAAAAAGTTTCCTTTTCTTTAAATATAGAAATGAAGCAAGGAATGTCTGGT
TCTATTCGTAATGAGATTACTTATAAGTCGTTAGAAAATTTAGGGATCATCT
AA





UNIVERSITAS

Miguel

9 ANEXO II

Alemán

9.1 ARTÍCULOS

1. Galiana A, Coy J, Marco-Guzman N, Rosales F, Gimeno A, Merino E, Royo G, Rodríguez JC. Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. *PLoS ONE*. En prensa.
2. Galiana A, Garcinuño P, Sanchez-Guillen L, Gimeno A, Andres-Franch M, Lopez P, Ruiz-Garcia M, Rodriguez JC, Royo G. Real Time Multiplex PCR for the detection of the main clinical relevant carbapenemases. *Biotechnology Journal*. En prensa.
3. Galiana A, Garcinuño P, Andres-Franch M, Ruiz-Garcia M, Lopez P, Rodriguez JC, Royo G. Carbapenemase producers in the Southeast Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. En prensa.
4. Galiana A, Garcinuño P, Sanchez-Guillen L, Gimeno A, Andres-Franch M, Lopez P, Ruiz-Garcia M, Rodriguez JC, Royo G. Prevalence and detection of carbapenemase carriers in ICU's. *Journal of Clinical Microbiology*. En prensa.

9.2 COMUNICACIONES A CONGRESOS

COMUNICACIONES CIENTÍFICAS A CONGRESOS NACIONALES

1. EVALUACIÓN DEL KIT DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR SEPSIS FLOW CHIP
Autores: Antonio Galiana, Juana Carrero-Lérida, Asunción Olmo, Juan Carlos Rodríguez. SEIMC XIX, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2015.
2. ES POSIBLE LA DETECCIÓN DE AGRUPACIONES DE CASOS PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRUDUCTORA DE CARBAPENEMASAS MEDIANTE ESPECTROMETRIA DE MASAS (MALDI-TOF)
Autores: Pedro Luis Garcinuño, Antonio Galiana, María Aznar, Ramón Guardiola, Leticia Álvarez-Paredes, María Ortega, Evangelina Ojeda, Belén Francisca Sánchez-

Borge, Gregoria Megias, Almudena Silvia Tinajas, Eva Ojeda, Adelina Gimeno, Antonia Sánchez-Bautista, Inmaculada Vidal, José Sánchez-Paya, Esperanza Merino, Joaquín Portilla, Gloria Royo, Juan Carlos Rodríguez. SEIMC XVIII, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2014.

3. EVALUACIÓN DEL KIT SEPSIS FLOW CHIP PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS MULTIRRESISTENTES.

Autores: Antonio Galiana, Juana Carrero-Lérida, Asunción Olmo, Juan Carlos Rodríguez. SEIMC XX, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2016.

COMUNICACIONES CIENTÍFICAS A CONGRESOS INTERNACIONALES

1. SEPSIS FLOW CHIP: A NEW MOLECULAR SYSTEM FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF THE MAIN PATHOGENS RESPONSABLE FOR NOSOCOMIAL INFECTIONS.

Autores: Antonio Galiana, Juana Carrero-Lérida, Asunción Olmo, Juan Carlos Rodríguez. 25th ECCMID. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2015.

2. EVALUATING THE SEPSIS FLOW CHIP KIT FOR DETECTING MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA.

Autores: Antonio Galiana, Juana Carrero-Lérida, Asunción Olmo, Sami Azrak², Juan Carlos Rodríguez. 26th ECCMID. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2016.

9.3 SOLICITUD DE PATENTE EUROPEA



European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY

Questions about this communication ?
Contact Customer Services at www.epo.org/contact



GALIANA CABRERA, Antonio José
Fundación Para El Fomento De La Investigación
Sanitaria Y Biomédica De La Comunitat Valenciana
C/ Micer Mascó 31
46010 Valencia
ESPAGNE

Date 05.08.15

Reference	Application No./Patent No. 14718156.4 - 1404
Applicant/Proprietor Fundación Para El Fomento De La Investigación Sanitaria Y Biomédica De La Comunitat Valenciana	

Notification of the data mentioned in Rule 19(3) EPC

In the above-identified patent application you are designated as inventor/co-inventor.
Pursuant to Rule 19(3) EPC the following data are notified herewith:

DATE OF FILING : 28.02.14

PRIORITY : ES/31.12.12/ ESP 201232077

TITLE : PRIMERS FOR THE DETECTION AND TYPING OF
CARBAPENEMASE-PRODUCING BACTERIAL STRAINS, AND
DETECTION METHOD AND KIT

DESIGNATED STATES : AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE
IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM
TR

Receiving Section



9.4 INFORME EUROPEO DE PATENTABILIDAD


PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT3136.1 IPER	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/IB2014/000230	International filing date (<i>day/month/year</i>) 28.02.2014	Priority date (<i>day/month/year</i>) 31.12.2012	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12Q1/68			
Applicant Fundación Para El Fomento De La Investigación			
<p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>11</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> (<i>sent to the applicant and to the International Bureau</i>) a total of sheets, as follows:</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions).</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2).</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)).</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (<i>sent to the International Bureau only</i>) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in the form of an Annex C/ST.25 text file, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3ter of Annex C of the Administrative Instructions).</p>			
<p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the report</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>			
Date of submission of the demand 27.02.2015		Date of completion of this report 09.07.2015	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80293 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Werner, Andreas Telephone No. +49 89 2399-8762	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

 International application No.
PCT/IB2014/000230

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- the international application in the language in which it was filed
 - a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-29 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-77 as originally filed

Claims, Numbers

1-24 as originally filed

Drawings, Sheets

1/4-4/4 as originally filed

- a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. The amendments have resulted in the cancellation of:
- the description, pages
 - the claims, Nos.
 - the drawings, sheets/figs
 - the sequence listing (*specify*):
4. This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- the description, pages
 - the claims, Nos.
 - the drawings, sheets/figs
 - the sequence listing (*specify*):

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/B2014/000230

5. This report has been established:
- taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-*bis*) and 70.2(e)).
 - without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4*bis* and 70.2(e)).
6. With regard to top-up searches (Rules 66.1 *ter* and 70.2(f)):
- A top-up search was carried out by this Authority on 26.06.2015 (all discovered documents are listed in the Supplemental Box Relating to Top-up Search).
 - Additional relevant documents have been discovered during the top-up search.
 - No top-up search was carried out by this Authority because it would serve no useful purpose.
7. Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded".



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/B2014/000230**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:
- the entire international application,
 - claims Nos. 1-24(partially)
- because:
- the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
 - the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
 - the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*).
 - no international search report has been established for the said claims Nos. 1-24(partially)
 - a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - furnish a sequence listing in the form of an Annex C/ST.25 text file, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.
 - furnish a sequence listing on paper or in the form of an image file complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.
 - pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
 - See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/IB2014/000230

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N) Yes: Claims 1-24(partially)

No: Claims

Inventive step (IS) Yes: Claims 1-24(partially)

No: Claims

Industrial applicability (IA) Yes: Claims 1-24(partially)

No: Claims

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/B2014/000230

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search and/or examination:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
 - d. furnished to this Authority as an amendment* under PCT Article 34 on :
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file, and preferably identified as "Amended" at the first line of text.
 - on paper or in the form of an image file.
 2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
 3. Additional comments:
- * *If item 4 in Box No. 1 applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2014/000230

Reference is made to the following documents:

- D1 SWAYNE, R ET AL: "Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo-[beta]-lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum [beta]-lactamases", INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, vol. 42, no. 4, 1 October 2013 (2013-10-01), pages 352-356, XP055129072, ISSN: 0924-8579, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.06.018, cited as "P".
- D2 IWAYA A ET AL: "Rapid and quantitative detection of blood *Serratia marcescens* by a real-time PCR assay: Its clinical application and evaluation in a mouse infection model", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 248, no. 2, 15 July 2005 (2005-07-15), pages 163-170, XP027871991, ISSN: 0378-1097
- D3 US 2009/163382 A1 (OH JI-YOUNG [KR] ET AL) 25 June 2009 (2009-06-25)
- D4 WO 2010/130882 A1 (LICENTIA LTD [FI]; KIRVESKARI JUHA [FI]; KOSKELA SUVI [FI]) 18 November 2010 (2010-11-18)
- D5 MONTEIRO J. ET AL: "Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR", JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, vol. 67, no. 4, 9 January 2012 (2012-01-09), pages 906-909, XP055074291, ISSN: 0305-7453, DOI: 10.1093/jac/dkr563
- D6 WO 2007/140004 A2 (UNIV CREIGHTON [US]; HANSON NANCY D [US]) 6 December 2007 (2007-12-06)
- D7 DOYLE, DIANA ET AL: "Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 50, no. 12, 19 September 2012 (2012-09-19), pages 3877-3880, XP002710011, ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.02117-12
- D8 ELLINGTON M. J. ET AL: "Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases", Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 59, no. 2, 13 November 2006 (2006-11-13), pages 321-322, XP055129258, ISSN: 0305-7453, DOI: 10.1093/jac/dkl481

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2014/000230

- D9 SWAYNE R L ET AL: "Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in Enterobacteriaceae", INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, vol. 38, no. 1, 10 March 2011 (2011-03-10), pages 35-38, XP028372871, ISSN: 0924-8579, DOI: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2011.03.010
- D10 WO 2011/138402 A1 (CHECK POINTS HOLDING B V [NL]; VOS PIETER [NL]) 10 November 2011 (2011-11-10)

The following documents have been cited by the applicant:

- D12 ABD-ELSALAM K: "Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design", Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 91-95, XP055172456, Retrieved from the Internet: URL:<http://bioline.utsc.utoronto.ca/archive/00000201/01/jb03019.pdf>
- D13 THORNTON B ET AL: "Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software", Biochemistry and Molecular Biology Education, vol. 39, no. 2, 28 March 2011 (2011-03-28), pages 145-154, XP055198714, ISSN: 1470-8175, DOI: 10.1002/bmb.20461

Re Item III**Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

Only part of the claimed subject-matter has been searched, following a lack of unity established in the PCT search phase (Rule 13 PCT). Since no further search fees were paid, the International Search Report was established for the first invention, identified as follows:

1. claims: 1-24 (partially)
Pair of primers SEQ ID NO:67-68;
Kits thereof further comprising at least a probe, preferably comprising the sequence SEQ ID NO:69, 70 and/or 71; more preferably comprising the pairs of primers SEQ ID NO:28-29, 46-47, 55-56, 67-68 and 72-73;

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2014/000230

Uses and methods thereof for the detection and/or typing of carbapenemase-producing bacterial strains, comprising an IMP-3-like, an IMP-15-like and/or an IMP-19-like carbapenemase of class B1.

Therefore no opinion will be provided for the subject-matter pertaining to claims 1-24, insofar as they relate to the further inventions.

Re Item V**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

Invention 1: SEQ ID NO:67-68, preferably in combination with probes SEQ ID NO:69, 70 and/or 71

1 Novelty (Art. 33(2) PCT)

Novelty has not been contested.

2 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

2.1 In the IPEA-408, the examiner found the applicant's arguments regarding document D2 convincing and indicated the possibility to attest an inventive step when departing from D2 as closest prior art. However, the applicant had not provided arguments in favor of an inventive step when departing from any of D3-D10 as closest prior art. As explained in detail in the WO-ISA accompanying the search report (see items 1.1.2-1.1.8), each of these documents discloses alternative primer pairs for detecting IMP genes in a multiplex setting wherein also further carbapenemases may be detected, and hence would be suitable as a starting point for the assessment of inventive step. No comparison testifying for an unexpected technical effect of the primer pair SEQ ID NO:67-68 over said primer pairs was available, and hence an inventive step had to be denied.

2.2 The applicant cited documents D12-D13. In response to the IPEA-408, the applicant did not amend the claims but provided further arguments and supplementary experimental data (sequence alignments, stability calculations and PCR experiments).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2014/000230

- 2.2.1 Inventive step vis-à-vis documents D3 and D6: The applicant argues that the primers disclosed therein can only detect VIM and IMP genes, i.e. carbapenemases of class B (IMP, VIM, GIM, SPM, NDM, SIM), whereas the classes A (NMC, IMI, SME, KPC, GES) and D (oxa-like) are not detected.
- This appears to be correct. The examiner agrees that present claims are inventive over this subject-matter, because the present pair of primers SEQ ID NO:67-68 is capable of detecting members of all of said classes of carbapenemases (p.5 l.11-20; Examples and Table 2 of the present description).
- 2.2.2 Inventive step vis-à-vis document D4: The applicant argues that two separate reactions are necessary, one for VIM, IMP, KPC and OXA-48, and another one for NDM. The examiner agrees with this argumentation and concurs that present claims are inventive over said prior art D4.
- 2.2.3 Inventive step vis-à-vis document D5: The applicant argues that the IMP primers of D5 ("IMPF", "IMPR") are inherently unsuitable to detect any allele of the IMP gene by PCR as shown by a BLAST search, and provides supportive experimental evidence. Moreover, the primer pairs disclosed in D5 would be unsuitable for co-amplification in a multiplex format, due to the formation of primer dimers (Fig.1-4). The arguments appear to be convincing.
- 2.2.4 Inventive step vis-à-vis document D7: The applicant argues that the IMP primers of D7 ("IMP_F", "IMP_R") would be unsuitable for co-amplification in a multiplex format, due to the formation of primer dimers (Fig.5-8). This argument appears to be convincing.
- 2.2.5 Inventive step vis-à-vis documents D8 and D9: The applicant argues that D8 only detects class B carbapenemases, whereas D9 does not detect IMP carbapenemases at all. Even when combining primers from documents D7, D8 and/or D9, they would be unsuitable for co-amplification in a multiplex format, due to the formation of primer dimers (Fig.9-12). These arguments appear to be convincing.
- 2.2.6 Inventive step vis-à-vis document D10: The applicant argues that D10 does not use PCR, but instead relies on a ligase detection assay with target-specific hybridizing probe pairs. Since claim 1 is functionally limited to a pair of primers, this argument can be accepted.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2014/000230

2.3 In conclusion, all objections on inventive step have been convincingly addressed by the applicant's arguments. Accordingly, an inventive step can be acknowledged for claims 1-24 in those parts relating to invention 1.

3 Industrial application (Art. 33(4) PCT)

Compliance with Art. 33(4) PCT has already been acknowledged.

