

CONVENIO DE COLABORACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DE UN PROYECTO

En Sevilla, a 14 de noviembre de 2014

REUNIDOS

De una parte,

D. Carlos Freixas Romagosa, con DNI [REDACTED] y D. Francisco Javier Barreiro González, con DNI nº [REDACTED] ambos en calidad de Apoderados de la empresa **ROCHE DIAGNOSTICS, S.L.U.**, con domicilio sito en 08174 Sant Cugat del Vallès, Avda. Generalitat, 171-173, y con C.I.F. [REDACTED] (en adelante, **Roche**).

De otra parte,

Dña. **Sandra Leal González**, con DNI [REDACTED] actuando en nombre y representación de la **Fundación Pública Andaluza para la Gestión de la Investigación en Salud de Sevilla –en delante FISEVI-**, en su calidad de Directora Gerente de la Fundación, en virtud de las atribuciones que tiene conferidas mediante escritura pública de poder otorgada ante el Notario de Sevilla D. Pedro Antonio Romero Candau, con fecha dos de febrero de dos mil doce bajo el número trescientos diez de su protocolo. La entidad está provista de CIF [REDACTED] se encuentra domiciliada en Sevilla, en la sede del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n (C.P. 41013).

Y, D. Álvaro Pascual, con DNI [REDACTED] en calidad de Jefe del Servicio de Microbiología y Coordinador del Laboratorio de Referencia para Tipado Molecular de Patógenos Nosocomiales de Andalucía, perteneciente a la Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena (en adelante, el **Investigador Principal**).

En adelante, conjuntamente denominadas las **Partes**.

Las Partes, reconociéndose capacidad legal y jurídica suficiente suscriben el presente documento, y al efecto,

EXPONEN

- I. Que FISEVI, está interesado en promover el estudio titulado "**Aplicación de una técnica de pirosecuenciación de ácidos nucleicos en la tipificación molecular y la caracterización de plásmidos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas**" (en adelante, la **Evaluación Diagnóstica**), el cual se encuentra dirigido por el Investigador Principal, teniendo los beneplácito dFISEVI.
- II. Que Roche está interesada en colaborar con FISEVI, quien busca fondos para llevar a cabo la Evaluación técnica. Esta colaboración se llevará a cabo de la forma que más adelante se indica.
- III. Que de acuerdo con lo anterior, las Partes deciden formalizar el presente Contrato de Colaboración (en adelante, el **Contrato**), de conformidad con las siguientes

CLAUSULAS

PRIMERA.- Objeto del Contrato

El objeto del presente Contrato es la ejecución del Proyecto de Investigación titulado "**Aplicación de una técnica de pirosecuenciación de ácidos nucleicos en la tipificación molecular y la caracterización de plásmidos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas**", dicha Evaluación definida en el Protocolo que se adjunta al presente como **Anexo I** al Contrato.

No se podrá iniciar la ejecución del Proyecto en tanto no se cuente con las autorizaciones administrativas y/o del Centro que correspondan.

Las Partes acuerdan cooperar bajo las condiciones y términos dispuestos a continuación.

SEGUNDA.- Acuerdos / Derechos de las Partes

La Evaluación Diagnóstica se realizará desde el 1 de enero de 2015 hasta el 31 de diciembre de 2015. Dicho Contrato se podrá prorrogar mediante acuerdo expreso y por escrito de las Partes.

Roche abonará a FISEVI en el contexto del presente Contrato la cantidad de **VEINTITRES MIL EUROS (23.000,00.-€)**.-IVA Excluido.

Como parte del presente Contrato, con el fin de poder llevar a cabo la Evaluación Diagnóstica, Roche cederá a FISEVI un **(1) pirosecuenciador 454 GS Junior y el equipamiento necesario para su correcta instalación** y suministrará los kits de reactivos (tests, calibradores y controles) que sean necesarios). La entrada de los equipos en el Hospital deberá contar con las correspondientes autorizaciones del Centro, que deberá solicitar el Dr. Pascual.

El material suministrado permanecerá como propiedad de Roche. El Investigador Principal lo utilizará sólo para los propósitos de la Evaluación técnica y no lo distribuirá a terceras partes que no sean colaboradores de este proyecto o que los usen para otros propósitos. Una vez acabada la Evaluación técnica el Investigador Principal y/o FISEVI devolverá el equipo y el material sobrante a Roche.

Ninguna información que pudiera identificar a los participantes o comprometer su anonimato será puesta a disposición de Roche.

Si fuera condición necesaria para el registro de una nueva aplicación clínica del producto, el Investigador Principal suministrará la base de datos de la Evaluación técnica a las autoridades competentes previa solicitud.

TERCERA.- Naturaleza del Acuerdo de Evaluación

El éxito del proyecto dependerá en gran medida de una cooperación de confianza de las Partes. De acuerdo con ello, las Partes harán todo lo que esté en sus manos para promover el proyecto común a través de una estrecha cooperación.

CUARTA.- Confidencialidad

Todas las Partes se obligan a guardar la debida confidencialidad, interna y con terceros, sobre cualquier tipo de información de la otra parte a la que accedan durante la vigencia del presente Contrato, utilizando dicha información únicamente para el cumplimiento del mismo y respondiendo de los perjuicios que del incumplimiento de este compromiso puedan derivarse para la otra parte.

Tanto FISEVI como, en su caso, el Investigador Principal, velarán para hacer cumplir con todas las leyes, normas, códigos de industria, permisos y órdenes de consentimiento aplicables así como actuar de manera apropiada y ética. No obstante lo que disponga al contrario el presente Contrato, Roche podrá rescindir este Contrato con carácter inmediato en el caso de que la Evaluación Diagnóstica incumpla con dichas condiciones.

Se hace constar expresamente que Roche, no tendrá acceso a ningún tipo de dato de carácter personal en relación con la Evaluación Diagnóstica.

QUINTA.- Propiedad Intelectual y Patentes

Los derechos de Propiedad Intelectual de todo el material, información y conocimiento aportados por cada una de las Partes e incluso por terceras, no se verán modificados y pertenecerán a todos los efectos y por tiempo indefinido a cada una de las Partes o tercero.

Los derechos de Propiedad Intelectual que se originen de trabajos realizados en el marco de la Evaluación técnica pertenecerán al Investigador Principal, o a FISEVI, sin perjuicio del derecho de Roche de poder utilizar los resultados obtenidos, una vez publicados, de forma gratuita, sin límite de tiempo ni geográfico, pudiendo utilizar los resultados obtenidos de la forma más amplia permitida en derecho (incluyendo, pero sin limitarse a, el derecho de edición, reproducción, distribución, comunicación pública y transformación).

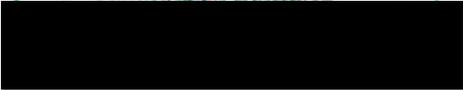
SEXTA.- Provisiones Finales

Roche responderá de los materiales que suministre al Investigador Principal para la realización de la Evaluación técnica objeto de este Contrato, así como de los eventuales daños y perjuicios directamente ocasionados por dichos materiales. Por su parte, el Investigador Principal, se comprometen a realizar diligentemente la Evaluación técnica a cumplir todos los requisitos legales aplicables al caso, y a responder de los eventuales daños y perjuicios ocasionados por una praxis deficiente o negligente en su realización.

El presente Contrato determina la relación de las Partes en lo que concierne al objeto del mismo. No existen acuerdos verbales adicionales.

Para cualquier conflicto que pudiera surgir en torno a la ejecución o interpretación del presente Contrato que no pudiera ser resuelto amistosamente, ambas partes se someten expresamente a la jurisdicción de los Jueces y Tribunales de Sevilla, con renuncia a su propio fuero y domicilio, en caso de ser distinto.

Cualquier modificación de este acuerdo, incluyendo esta sección, se realizará siempre por escrito, firmada por todas las Partes.

	 Roche Diagnostics, S.L.U.	
	D. Carlos Freixas Romagosa	D. Francisco Javier Barreiro González
FISEVI		Investigador Principal
		
D ^a Sandra Leal González		D. Álvaro Pascual Hernandez
		

ANEXO I
PROTOCOLO

Aplicación de una técnica de pirosecuenciación de ácidos nucleicos en la tipificación molecular y la caracterización de plásmidos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Unidad Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología Clínica y Medicina Preventiva. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena.

Investigador Principal: Álvaro Pascual. Jefe de Servicio de Microbiología y Coordinador del Laboratorio de Referencia para Tipado Molecular de Patógenos Nosocomiales de Andalucía (Programa PIRASOA).

Equipo investigador: Felipe Fernández Cuenca. Lorena López Cerero. Facultativos Especialistas de Área

1. ANTECEDENTES

Klebsiella pneumoniae es un patógeno de gran relevancia clínica y epidemiológica debido a su capacidad para transmitir genes de resistencia a antimicrobianos, incluidos los de amplio espectro como las carbapenemas, y su facilidad para producir brotes hospitalarios.

En los últimos años se está observando una tendencia creciente en las tasas de resistencia a carbapenemas. Las tasas de resistencia a carbapenemas en *K. pneumoniae* son muy variables (Cantón, 2012), dependiendo sobre todo del país y del centro hospitalario. Se han descrito tasas muy elevadas, cercanas al 60%, como sucede en Grecia, así como tasas mucho más discretas, como las descritas en Alemania (0.2%). La situación actual en España empieza a ser alarmante. Desde 2009 a 2012 se ha multiplicado por 16 veces el número de aislados productores de carbapenemasas en nuestro país (Oteo, 2013). Hasta la fecha, estos determinantes de resistencia están asociados a *K. pneumoniae*, suponiendo actualmente el 86% de las enterobacterias productoras de carbapenemasa. Las cepas de *K. pneumoniae* MDR resistente a carbapenemas se están convirtiendo en un serio problema de salud pública debido a las escasas opciones terapéuticas y a la dificultad para controlar los brotes (Lippmann, 2014). El principal mecanismo de resistencia a carbapenemas en *K. pneumoniae* es la producción de carbapenemasas (Lippmann, 2014). En un estudio multicéntrico realizado en España en 2013 se ha observado que las carbapenemasa más prevalentes en *K. pneumoniae* son las de clase D (OXA-48; 68.8%), B (VIM-1; 25.3%) y A (KPC-2; 3.4%). Sin embargo se están describiendo nuevos brotes como el producido por *K. pneumoniae* productora de KPC-3 en Madrid (Robustillo, 2012) y Córdoba, este último consecuencia de un caso importado desde Italia que se ha diseminado rápidamente a diferentes hospitales de la provincia (Lopez-Cerero L, 2014).

Las carbapenemasas descritas en *K. pneumoniae* se caracterizan además porque están codificadas por genes localizados generalmente en plásmidos. Esta peculiaridad hace que estas cepas adquieran una enorme importancia epidemiológica debido a la capacidad que tienen para transferir este mecanismo de resistencia a carbapenemas entre diferentes cepas bacterianas. Estos plásmidos, pertenecientes a varias familias (IncFII, IncI2, IncL/M, IncN, IncA/C, IncR, IncX, and ColE1) han capturado estos determinantes genéticos mediante transposones como Tn4401 en el caso de KPC o IS1999 en el caso de OXA-48. El análisis del entorno genético próximo de los genes codificantes de carbapenemasas permite trazar el origen de esta captura y seguir la evolución de los brotes a lo largo del tiempo. Además de este mecanismo de diseminación de carbapenemasas, se ha observado que ciertos clones de *K. pneumoniae* tienen un elevado potencial o facilidad para producir brotes (expansión clonal) que son muy difíciles de controlar. El número de estos clones epidémicos o de alto riesgo es de momento reducido pero están circulando por casi todo el mundo. La mayoría de los clones que se han descrito en España corresponden a un número limitado de secuencias tipo (ST) y a unos tipos concretos de carbapenemasas: ST15-VIM-1, ST11-OXA-48, ST405-OXA-48, ST101-KPC-2, and ST11-VIM-1., ST258-KPC-3 (Oteo, 2012) y ST512-KPC3 (Lopez-Cerero L, 2014). Además, algunos de estos clones exitosos vehiculizan plásmidos con alta capacidad de transmisión, como el clon ST512 con el plásmido pKpQIL, que originariamente fue detectado en Israel, pero que ha diseminado a varios países como Italia, Polonia, Reino Unido, Colombia, Canada y EEUU (Chen, 2014).

La electroforesis en campo pulsado (PFGE) constituye el método de referencia para el tipado o la identificación de clones de *K. pneumoniae*. Esta técnica posee un elevado poder de discriminación, pero adolece de una serie de limitaciones importantes, como el elevado coste del equipo, su laboriosidad y el tiempo necesario para analizar los pulsotipos. El MLST constituye otro método de tipado muy útil en el estudio de brotes. Se fundamenta en la secuenciación parcial de 6 o 7 genes metabólicos muy conservados (housekeeping genes) que están sujetos a escasa presión selectiva, como ocurre con algunos genes relacionados con el metabolismo o con factores de virulencia y los genes ribosomales. Aunque es una técnica muy laboriosa y costosa tiene la ventaja de que los resultados obtenidos (secuencias tipo) son objetivables, se pueden almacenar en formato electrónico y se pueden intercambiar entre laboratorios muy distantes geográficamente, lo que permite poder comparar perfiles o secuencias tipo entre aislados de distintos países o continentes. Existe también un método

basado en el mismo principio que el MLST para el tipado de plásmidos, denominado pMLST, que analiza las secuencias de genes conservados dentro de estas estructuras móviles (www.pubmlst.org/plasmid/).

La secuenciación de ADN de alto rendimiento (secuenciación masiva o de genomas únicos) está suponiendo un avance importante en el estudio de la epidemiología molecular de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemas y en el conocimiento de los mecanismos de transmisión de resistencia a antimicrobianos. Va a permitir obtener información tanto del clon como del plásmido que vehiculiza el gen codificante de carbapenemasa. En la actualidad existen varias plataformas de secuenciación masiva que se diferencian principalmente en su fundamento, el tiempo de duración de las carreras, el número de lecturas por carrera, el número de bases por lectura y el rendimiento (Mb/carrera) (Fox et al, 2009).

En el presente proyecto se pretende determinar la aplicabilidad o utilidad de la pirosecuenciación en la investigación de brotes mediante MLST, análisis de los plásmidos mediante pMLST, estudio del entorno genético y la caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenemas en cepas clínicas de *K. pneumoniae* (Monteiro et al., 2014; Zhao F et al., 2010). El estudio se realizará en el Laboratorio de Referencia para Tipado Molecular de Patógenos Nosocomiales de Andalucía perteneciente al programa PIRASOA y situado en el Servicio de Microbiología del H.U.V. Macarena de Sevilla. Esta tecnología nos permitirá establecer la relación clonal de los aislados de manera más exacta y en menor tiempo.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio es determinar si el método de secuenciación masiva basado en la pirosecuenciación es útil para:

- 2.1. Identificar genes relacionados con la resistencia a carbapenemas.
- 2.2. Comparar los entornos genéticos de los plásmidos encontrados en clones epidémicos y clones esporádicos de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa
- 2.3. La tipificación de de plásmidos (pMLST).
- 2.4. La tipificación de cepas mediante MLST.

3. METODOLOGIA

3.1. Sujetos de estudio

Se incluirán 10 aislados clínicos de *K. pneumoniae* MDR productora de carbapenemasa. Cinco aislados serán representativos de los principales clones o ST que están circulando en España y de las carbapenemasas más frecuentes y otros 5 aislados corresponderán a clones menos prevalentes de *K. pneumoniae* MDR productora de carbapenemasa:

Secuencia tipo (ST)	Carbapenemasa
ST11	OXA-245
	VIM-1
	OXA-48
	KPC-2
ST15	VIM-1
	OXA-48
ST405	OXA-48
ST16	OXA-48
ST147	VIM-1
ST340	VIM-1
ST437	OXA-245
ST101	KPC-2
ST846	OXA-48
ST13	OXA-48
ST1235	VIM-1
ST258	KPC-3
ST512	KPC-3

3.2. Identificación de genes de resistencia a carbapenemas, estudio de entornos genéticos de plásmidos y tipado de plásmidos

3.2.1. Obtención de plásmidos

Los plásmidos se obtendrán a partir de transconjugantes utilizando *E. coli* TOPO1 como receptora. La extracción de plásmidos se realizará con el sistema MIDI plasmid purification kit (Qiagen). La concentración de ADN plasmídico se determinará, mediante fluorimetría (Picogreen assay). Se realizará un análisis preliminar de plásmidos usando el método de la digestión con la nucleasa S1 para tener una aproximación sobre el número de plásmidos y el tamaño de los mismos.

3.2.2. Preparación y secuenciación de las librerías de plásmidos

Las librerías plasmídicas se procesarán individualmente. Una vez purificado el DNA plasmídico y determinado el tamaño de cada uno de ellos, se preparará una librería de ADN. Si el tamaño del plásmido es mayor de 2500pb se procederá a la ruptura del DNA en fragmentos de aproximadamente 1400-1800 pb mediante nebulización, si el tamaño es inferior a 2500pb se excluirá el paso de nebulización y se procederá directamente con el siguiente paso, una vez se haya linearizado el plásmido. El siguiente paso será la unión de adaptadores específicos a cada uno de esos fragmentos. En este caso cada adaptador incluirá un MID que será diferente para cada plásmido. Tras la purificación de la muestra mediante la eliminación de los fragmentos excesivamente pequeños, obtendremos la librería de ADN. Por medio de un proceso de emulsión, basada en la amplificación clonal, o PCR de emulsión, los fragmentos obtenidos en la librería se dispondrán en bolas de captura de 18 micras de diámetro y cada uno de ellos se amplificará aproximadamente en diez millones de copias idénticas que quedarán inmovilizados en las bolas de captura. Para llevar a cabo dicha amplificación clonal, se mezclarán de forma equimolar varias librerías plasmídicas (El número de librerías a mezclar dependerá del tamaño de cada plásmido). Después de la amplificación, las bolas de captura se colocarán en una placa

especial (PicoTiter) para la secuenciación. La muestra se secuenciará utilizando los reactivos del GS Junior+ sequencing kit y el pirosecuenciador GS Junior+ (Roche, Brandford, EE. UU.). Una placa completa del secuenciador Junior permite la obtención de 100.000 lecturas con un tamaño medio de 800 nucleótidos.

Se necesitará una representación de lecturas por nucleótido (cobertura), no superior a 20X por plásmido (la cobertura se calcula como el cociente entre el número de nucleótidos totales secuenciados y el tamaño del plásmido: $\sim 100.000 \times \sim 800 / \text{tamaño DNA plasmídico}$). En función de los tamaños y del número total de plásmidos obtenidos, podremos determinar el número de runs necesarios para obtener una cobertura adecuada para llevar a cabo un ensamblado de las lecturas obtenidas.

3.2.3. Análisis Bioinformático

El ensamblaje de los contigs se realizará con el software GS De Novo Assembler v3.0 ó programa Newbler (Roche 454 LifeSciences).

La predicción y anotación de los ORF se realizará con el software Artemis. Cada secuencia de proteína se comparará con las depositadas en la base de datos BLASTp con un cut-off mínimo de identidad del 30% y sobre un 80% de cobertura de la secuencia.

3.3. Tipificación de cepas bacterianas (MLST)

3.3.1. Preparación y secuenciación de los genomas bacterianos.

Se procederá a la obtención de ADN cromosómico (gDNA) para cada cepa bacteriana que se quiere secuenciar, aproximadamente 1 microgramo, mediante métodos estándar de purificación de ADN. Las librerías se prepararán y secuenciarán utilizando los reactivos del GS Junior+ sequencing kit y el pirosecuenciador GS Junior+ (Roche, Brandford, EE. UU.). Brevemente, una vez purificado el gDNA de la bacteria se preparará una librería de ADN procediendo a la ruptura del gDNA en pequeños fragmentos de aproximadamente 1400-1800 pb mediante nebulización. El siguiente paso será la unión de adaptadores específicos a cada uno de esos fragmentos y, tras la purificación de la muestra mediante la eliminación de los fragmentos excesivamente pequeños, obtendremos la librería de ADN. Por medio de un proceso de emulsión, basada en la amplificación clonal, o PCR de emulsión, los fragmentos obtenidos en la librería se dispondrán en bolas de captura de 18 micras de diámetro y cada uno de ellos se amplificará aproximadamente en diez millones de copias idénticas que quedarán inmovilizados en las bolas de captura. Después de la amplificación, las bolas de captura se colocarán en una placa especial (PicoTiter) para la secuenciación. Una placa completa del secuenciador Junior+ permite la obtención de 100.000 lecturas con un tamaño medio de 800 nucleótidos. Dado el pequeño tamaño del genoma de *K. pneumoniae* (~5,5 Mb), el procesamiento de una placa, que tendría aproximadamente 100.000 lecturas, permitirá obtener una representación de lecturas por nucleótido del genoma bacteriano, o cobertura, de aproximadamente 14,4X (la cobertura se calcula como el cociente entre el número de nucleótidos totales secuenciados y el tamaño del genoma bacteriano: $\sim 100.000 \times \sim 800 / 5500000 = \sim 14,4$). La realización de 5 runs nos proporcionaría una cobertura adecuada para llevar a cabo un ensamblado de las lecturas obtenidas cubriendo prácticamente la totalidad del cromosoma bacteriano.

3.3.2. Análisis Bioinformático

El estudio bioinformático que consistirá en el análisis de la calidad y filtrado de las secuencias, ensamblado y posterior anotación de fases de lectura abierta (ORFs). De esta forma, a partir de los ficheros de secuencia que se obtengan del secuenciador (ficheros FastQ), en primer lugar se procederá a determinar la calidad de las secuencias y a filtrar nucleótidos de baja calidad en los extremos, para que no interfieran en el posterior ensamblado mediante el uso de herramientas como el Fastx-toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html). Posteriormente se llevará a cabo el ensamblado de las lecturas utilizando el software GS De Novo Assembler v3.0 de Roche, que permitirá ensamblar la gran mayoría de las secuencias en unos pocos *scaffolds* cubriendo prácticamente en su totalidad la longitud del genoma bacteriano dado su pequeño tamaño y la gran cobertura que produce la mega-secuenciación. El análisis del genoma consistirá en la predicción y anotación de todas las fases de lectura

abierta (*Open Reading Frames*, ORFs) mediante el uso de programas de rastreo genómico como geneMark. Estos programas se entrenan con modelos genómicos similares y permiten descubrir ORFs en secuencias no conocidas con un alto grado de precisión. A partir de las ORFs podemos obtener las proteínas codificadas y todas las listas de proteínas que están codificadas en el genoma bacteriano se anotarán con la herramienta Blast2GO. Esta herramienta permite la anotación funcional de proteínas a gran escala mediante el uso de búsquedas por similitud (BLAST), y la posterior transferencia de anotación funcional (términos GO) a las proteínas del nuevo genoma mediante el uso de un algoritmo ponderado basado en las propiedades de la ontología GO. De esta forma, para cada cepa bacteriana obtendremos una lista de todas las proteínas que están codificadas en su genoma junto con su anotación funcional completa, lo que nos permitirá determinar la presencia de mecanismos de resistencia.



4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Chen L, et al. Complete nucleotide sequence of a blaKPC-harboring IncI2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Oct;57(10):5019-25.
2. Cantón R, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:413-31.
3. Chen L, et al. Molecular survey of the dissemination of two blaKPC-harboring IncFIA plasmids in New Jersey and New York hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2289-94.
4. Fox S, et al. Applications of ultra-high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol.* 2009;553:79-108
5. Lippmann N, et al. Clinical epidemiology of *K. pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2014 Apr;14:271-2.
6. López-Cerero L., et al. KPC-3-producing *K. pneumoniae* ST512 outbreak in Spain: dissemination due to an import transfer. *Int J Antimicrob Agents.* En prensa.
7. Oteo J, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:6344-7.
8. Zhao F, et al. Sequencing and genetic variation of multidrug resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2010 Apr 12;5(4):e10141.
9. Monteiro J, et al. Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) variants by pyrosequencing. *J Microbiol Methods.* 2014 May;100:42-5.

5. MEMORIA ECONOMICA

Personal: contratación de 1 técnico de laboratorio a tiempo completo con experiencia en técnicas de secuenciación durante 12 meses 23.000€ (costes de gestión incluidos)

Equipamiento: cesión sin cargo por parte de Roche diagnóstico de 1 pirosecuenciador GS Junior+ y del equipamiento accesorio necesario para su desarrollo.