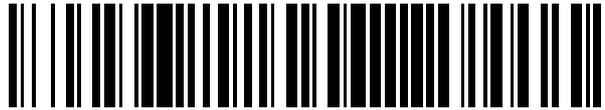


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 497**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)

**C12N 1/16** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/44** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.1998 E 05002486 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1536018**

54 Título: **Medio de cultivo y de identificación específica de diferentes especies de Candida y procedimientos de análisis**

30 Prioridad:

**20.08.1997 FR 9710635**

**20.04.1998 FR 9805269**

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

**20.03.2014**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)**

**CHEMIN DE L'ORME**

**69280 MARCY L'ETOILE, FR**

72 Inventor/es:

**ORENGA, SYLVAIN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 449 497 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo y de identificación específica de diferentes especies de *Candida* y procedimientos de análisis.

5 La presente invención se refiere a un medio de cultivo y de identificación específica de levaduras y a un procedimiento de análisis microbiológico para identificar específicamente las levaduras *Candida albicans* y *Candida tropicalis* y/o para diferenciar las levaduras *C. albicans* y *C. tropicalis*, tal como se define en su alcance más amplio por las reivindicaciones adjuntas.

10 La especie *C. albicans* es la más comúnmente aislada a partir de muestras clínicas, y provoca infecciones más o menos importantes de la piel, de las uñas y de las mucosas, en los individuos que presentan defensas inmunitarias normales, e infecciones muy serias, en los individuos debilitados y, en particular, en aquéllos infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Según los estudios, *C. tropicalis* es la segunda o la tercera especie en frecuencia de aislamiento, en las extracciones de origen humano. Es por lo tanto esencial, no únicamente el poder  
15 detectar muy rápidamente la presencia de estas levaduras en las extracciones sino también, asimismo, el diferenciar aquéllas que pertenecen a la especie *C. albicans*, de aquéllas de la especie *C. tropicalis*.

Para realizar este cometido, se han propuesto, en estos últimos años, numerosas técnicas para identificar rápidamente las levaduras *C. albicans*. El número más grande de entre éstas, se basa en la evidenciación de una actividad hexosaminidasa, es decir, de enzimas que tienen una actividad N-acetil-β-D-galactosaminidasa o N-acetil-β-manosaminidasa (FR-2 684 110, FR-2 659 982). No obstante, estos procedimientos sufren de una especificidad reducida con respecto a las levaduras de la especie *C. tropicalis*.

Los inventores de la presente invención han descubierto que, procediendo a inhibir una actividad enzimática de la especie *C. tropicalis*, en particular la actividad hexosaminidasa, es posible el paliar los inconvenientes de los ensayos anteriormente citados, y con ello el aportar un medio de identificación y/o de diferenciación de las levaduras, en particular de *C. albicans* y de *C. tropicalis*, rápido y poco costoso.

Además, la actividad enzimática glucosidasa ha sido ya objeto de investigaciones por parte de ciertos documentos, como el de Casal, M. y Linares, M.J. "Contribution to the study of the enzymatic profiles of yeast organisms with medical interest", Mycopathologie 81,155 - 159 (1983). Esta actividad, es positiva en algunas cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *Candida pseudotropicalis* (denominada, hoy día, *Candida Kefyr*), pero negativa, para otras *Candida*, como por ejemplo, las *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*.

35 Ha parecido por lo tanto interesante el intentar acumular, en un mismo medio, la posibilidad de investigar dos actividades enzimáticas diferentes, es decir, hexosaminidasa y glucosidasa. Se ha constatado el hecho de que, en los medios según la invención, este cúmulo permite diferenciar, de una forma más precisa a las *C. albicans*, con relación a las *C. guilliermondii*, *C. kefy*, *C. lusitaniae* y/o *C. tropicalis*, y con relación a las otras *Candida*, pero permite asimismo diferenciar a las *C. guilliermondii*, *C. kefy*; *C. lusitaniae* y/o *C. tropicalis*, con relación a las otras  
40 *Candida*.

Por supuesto, se prevé asociar, en un mismo medio, a los sustratos específicos de las actividades hexosaminidasa y glucosidasa que se investigan, un inhibidor, e incluso un activador de la actividad hexosaminidasa.

45 Se describe asimismo un medio de cultivo y de identificación específica de las levaduras, que comprende un sustrato cromógeno o fluorígeno, susceptible de poder hidrolizarse mediante una enzima del grupo de las hexosaminidasas, caracterizado porque el medio comprende, además, por lo menos un compuesto selectivamente inhibidor de la actividad hexosaminidasa de *Candida tropicalis*.

50 Gracias a la invención, el medio de cultivo, permite en particular la identificación específica de las levaduras de la especie *C. albicans* y/o *C. tropicalis*.

Según un modo de realización, el medio de cultivo, comprende, en calidad de compuesto selectivamente inhibidor, una amida de fórmula (I):



en la que, en primer lugar, o bien R, R' y R'' están constituidas las unas con respecto a las otras, por:

- 60 - un átomo de hidrógeno,
- una cadena de hidrocarburo, saturada o insaturada, alifática o cíclica, que comprende eventualmente por lo menos un heteroátomo,
- 65 - o bien cada una de las R y/o R' y/o R'', forman conjuntamente una cadena de hidrocarburo cíclica, saturada o insaturada, que comprende eventualmente por lo menos un heteroátomo,

y, en segundo lugar, n es un número entero, superior o igual a 1.

5 Por una cadena de hidrocarburo que "comprende" por lo menos un heteroátomo, se entiende que la cadena de hidrocarburo puede estar sustituida mediante por lo menos un sustituyente tal como, en particular, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH, y un átomo de halógeno y/o puede estar interrumpida mediante por lo menos un heteroátomo tal como, en particular, O, S y N.

10 Según una forma de realización, el medio de cultivo comprende, en calidad de compuesto selectivamente inhibidor, una amida de fórmula (I):



15 en la que, en primer lugar, o bien R, R' y R'', están constituidas, de una forma independiente las unas con respecto a las otras, por:

- un átomo de hidrógeno,
- una cadena de hidrocarburo, saturada o insaturada, alifática o cíclica, eventualmente interrumpida mediante por lo menos un heteroátomo,
- o bien cada una de las R y/o R' y/o R'', forman conjuntamente, una cadena de hidrocarburo, cíclica, saturada o insaturada, que comprende eventualmente por lo menos un heteroátomo,

25 y, en segundo lugar, n es un número entero, superior o igual a 1.

Según otra forma de realización, el medio de cultivo comprende, en calidad de compuesto selectivamente inhibidor, una amida de fórmula (I):



en la que, en primer lugar, o bien R, R' y R'' están constituidas, de una forma independiente las unas con respecto a las otras, por:

- 35 - un átomo de hidrógeno,
- una cadena de hidrocarburo, alifática,

y, en segundo lugar, n es igual a 1 o 2.

40 Según una forma de realización, el compuesto selectivamente inhibidor, es una acetamida.

Según otra forma de realización de la invención, el medio de cultivo comprende un activador específico de la enzima hexosaminidasa de *C. albicans*.

45 Según una forma de realización preferida de la invención, el activador específico de la enzima hexosaminidasa es la N-acetil-glucosamina.

Según otra forma de realización, el medio de cultivo comprende una mezcla de compuestos selectivamente inhibidores.

50 Según una forma de realización, la mezcla de compuestos selectivamente inhibidores se encuentra constituida por acetamida y formamida.

Según una forma de realización preferida de la invención, el medio es líquido o gelificado.

55 Según una forma de realización, el medio de cultivo es gelificado y comprende, para 1 litro:

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| - peptonas o mezcla de peptonas                        | 0,01 - 40 g                 |
| - extracto de levadura                                 | 0,01 - 40 g                 |
| - glucosa (fuente de carbono)                          | 0 - 10g                     |
| - tampón fosfato (pH entre 5 y 8,5)                    | 2,5 - 100 mM                |
| - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosaminida | 20 - 600·10 <sup>-6</sup> M |
| - acetamida  | 0,01 - 20 g                 |
| - inhibidor de bacterias                               | 0 - 20 g                    |
| - agar   | 11 - 20 g                   |

Según otra forma de realización, el medio de cultivo gelificado o líquido descrito anteriormente, comprende además N-acetil-glucosamina a 1,0 g/l.

5 Según otra forma de realización, el medio de cultivo gelificado o líquido descrito anteriormente, comprende además formamida a 0,5 g/l.

10 Otro objeto de la presente invención, es un procedimiento de análisis microbiológico para identificar selectivamente las levaduras *C. albicans* y/o *C. tropicalis* y/o diferenciar las levaduras *C. albicans* y *C. tropicalis*, caracterizado porque se pone directamente la muestra a analizar en contacto con por lo menos un medio de identificación descrito anteriormente.

15 A dicho efecto, la presente invención se refiere a un medio para la detección y la identificación específica de levaduras, caracterizada porque comprende dos sustratos, un primer sustrato, cromógeno o fluorígeno, susceptible de poder ser hidrolizado por una enzima del grupo de las hexosaminidasas, y un segundo sustrato, cromógeno o fluorígeno, susceptible de poder ser hidrolizado por una enzima del grupo de las glucosidasas.

20 Según una forma preferida de realización de la invención, en este medio, cada sustrato se encuentra constituido por una parte específica de la enzima y por una parte marcador, caracterizado porque la parte marcador del primer sustrato se diferencia de la parte marcador del segundo sustrato.

Según otra forma preferida de realización de la invención, el medio comprende un activador.

25 En el caso en el que hay un activador, este activador se encuentra constituido por una hexosamina y/o una hexosaminidina.

Según todavía otra forma preferida de realización de la invención, el sustrato de hexosaminidasa se encuentra constituido por un derivado de indoxilo y/o el sustrato de glucosidasa se encuentra constituido por un derivado de indoxilo.

30 En todos los casos, el medio es líquido o gelificado.

35 La presente invención se refiere también a un procedimiento de análisis microbiológico para detectar e identificar selectivamente ciertas especies de levaduras *Candida*, caracterizado porque la muestra se pone directamente en contacto con un medio según la reivindicación 1 a 7, porque se espera que aparezcan coloraciones en el medio, y porque se identifican por diferencias de coloraciones, las *C. albicans*, con relación, por una parte, a las *C. guilliermondii*, *C. kefyi*, *C. lusitaniae* y/o *C. tropicalis* y, por otra parte, a las otras *Candida*, así como las *C. guilliermondii*, *C. kefyi*, *C. lusitaniae* y/o *C. tropicalis*, con relación a las otras *Candida*.

40 Se esperan entre 36 y 60 horas y, de forma ventajosa, sustancialmente 48 horas, cuando el medio no contiene activador.

Se esperan entre 18 y 30 horas y, de forma ventajosa, sustancialmente 24 horas, cuando el medio contiene un activador.

45 Según una primera forma de realización, estos procedimientos permiten identificar *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. kefyi*, *C. lusitaniae* y/o *C. tropicalis*, con relación a las otras *Candida*, cuando el medio contiene:

- un sustrato de hexosaminidasa, y
- un sustrato de glucosidasa, y eventualmente
- 50 - un activador de hexosaminidasa.

Según una segunda forma de realización, estos procedimientos permiten identificar *C. albicans* con relación a *C. guilliermondii*, *C. kefyi*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* y/o a las otras *Candida*, cuando el medio contiene:

- 55 - un sustrato de hexosaminidasa y un sustrato de glucosidasa, y eventualmente
- un activador de hexosaminidasa.

60 Por "compuesto selectivamente inhibidor de la actividad de la hexosaminidasa de *C. tropicalis*", se entiende cualquier compuesto capaz de inhibir, de una forma selectiva, la actividad de la hexosaminidasa de *C. tropicalis*. Por ejemplo, los compuestos del tipo amida de fórmula descrita anteriormente, tienen la propiedad de inhibir específicamente la actividad hexosaminidasa de las *C. tropicalis*, sin afectar a la de las *C. albicans*.

Por "identificación", se entiende la detección y/o la cuantificación.

65 Por "muestra", se entiende en particular cualquier extracción de tipo biológico, una cepa o un conjunto de cepas de levaduras aisladas, por ejemplo, después del cultivo.

Se expone, a continuación, de manera general, la composición del medio de cultivo, expresado en g/l, del medio final.

- 5 El medio comprende una base nutritiva necesaria para el desarrollo de las levaduras y de los inhibidores específicos de la hexosaminidasa de *C. tropicalis*.

Los elementos constituyentes de la base nutritiva, comprenden:

- 10 - peptonas de 0,01 a 40 g/l, tales como la peptona de carne, el producto comercializado por la sociedad bioMérieux, con la marca bioSoyase o análogo, o también una mezcla de peptonas; preferentemente, la peptona o la mezcla de peptonas se encuentra presente en el medio a aproximadamente 6 g/l  $\pm$  0,5 g/l;
- 15 - un extracto de levadura de 0,01 a 40 g/l, de una forma preferente, aproximadamente 1,5 g/l, que aporte vitaminas de crecimiento de levaduras;
- 20 - una fuente de carbono, tal como la glucosa, el glicerol, un acetato, un piruvato, un lactato, la arginina, un aminobutirato, o una mezcla de estos compuestos, en la proporción de 0 a 10 g/l; la fuente de carbono es preferentemente la glucosa, en una cantidad de 1 g/l;
- 25 - un tampón añadido al medio con el fin de obtener un pH favorable para el desarrollo de *C. albicans*, comprendido entre 5 y 8,5; el tampón se selecciona entre los tampones fosfatos, Tris, Hepes (ácido N-2-hidroxiethyl-piperazina-N'-2-etansulfónico) y citrato, en la proporción de 2,5 a 100 mM; preferentemente, el tampón es un tampón fosfato de 10 mM para ajustar el pH del medio a un valor cercano a 7;
- agar, de 11 a 20 g/l, preferentemente 15 g/l.

30 El sustrato cromógeno o fluorígeno puede ser cualquier sustrato cromógeno o fluorígeno hidrolizable por una hexosaminidasa, tal como una galactosaminidasa, glucosaminidasa o manosaminidasa, para liberar un producto coloreado o fluorescente. Preferentemente, el sustrato se selecciona de entre los que presentan una fuerte coloración o fluorescencia con pocas moléculas, y que no inducen ninguna modificación del metabolismo de los microorganismos, excepto en cuanto a lo referente a la actividad enzimática buscada. Estos sustratos se seleccionan preferentemente, para los sustratos cromógenos, entre los que comprenden un grupo cromóforo, tal como el indolilo, sustituido o no y, en particular, entre la 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida o la 5-bromo-6-cloro-3-indolil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida de 20 a 600 mM, ventajosamente la 5-bromo-cloro-3-indolil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida, a 200 mM, y para los sustratos fluorígenos, entre la 4-metilumbeliferil-N-acetil-b-D-galactosaminida, la 4-metilumbeliferil-N-acetil-b-D-glucosaminida.

40 El inhibidor específico de la hexosaminidasa de las levaduras de la especie *C. tropicalis* se elige, preferentemente, de entre el grupo de los compuestos del tipo amida (I) o sus mezclas. Éste se elige, principalmente, entre las amidas tales como la formamida, la acetamida, la propionamida, la glicinamida, la succinamida y otras. La cantidad del compuesto del tipo amida se encuentra comprendida entre 0,01 y 20 g/l. Preferentemente, el inhibidor elegido es la acetamida a 1 g/l.

45 Con el fin de obtener, para las levaduras de la especie *C. albicans*, una actividad intensa y precoz, de una forma preferible, puede añadirse al medio de cultivo un activador de hexosaminidasa, tal como el que se describe en el documento FR-A-2 684 110. Del mismo modo, al medio, se le puede añadir un inhibidor o una mezcla de inhibidores de las bacterias, que permita inhibir el crecimiento de las bacterias a Gram positivo, y de las a Gram negativo, sin afectar al de las levaduras y, si posible al de los hongos. De una forma preferible, los inhibidores de bacterias se eligen de entre el grupo de los antibióticos, tales como la gentamicina, el cloranfenicol, la penicilina, la estreptomina, la cicloheximida, la neomicina, la tetraciclina, la oxitetraciclina o una mezcla de antibióticos, y/o entre la telurita, un molibdato y análogos, o sus mezclas. De una forma ventajosa, se elige el cloranfenicol (0,5 g/l), o una mezcla de gentamicina (0,1 g/l) y de cloranfenicol (0,05 g/l). Es asimismo posible inhibir el crecimiento de las bacterias disminuyendo el pH del medio, hasta un pH ácido.

55 Tal y como se demuestra mediante los ejemplos a continuación, la reacción de hidrólisis enzimática permanece específica después de 24 horas de incubación.

#### 60 Ejemplo 1:

Se realizaron unos ensayos para ensayar el efecto de la acetamida sobre la actividad hexosaminidasa de las levaduras.

65 Se prepararon dos medios, según las técnicas habituales. El primer medio, el cual se designará de ahora en adelante como Medio I, contiene todos los elementos de base nutritiva, así como un sustrato cromógeno de una hexosaminidasa y una mezcla inhibidora de bacterias.

La composición del Medio I, para un litro de medio final, es la siguiente:

- bioSoyase (bioMérieux)	6,0 g
- extracto de levadura (bioMérieux)	1,5 g
- glucosa (Merck)	1,0 g
- tampón fosfato (Merck)	10,0 mM
- Mn <sup>2+</sup> (Merck)	1,0 mM
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosaminida (Biosynth)	0,1 g
- Gentamicina	0,1 g
- Cloranfenicol	0,05 g
- agar (bioMérieux)	15,0 g

5 El pH del medio se ajusta a un valor de aproximadamente 7.

El segundo medio, denominado Medio II, corresponde al medio según la invención, y contiene todos los elementos que se han descrito anteriormente para el medio I, más un inhibidor específico de la hexosaminidasa de las *C. tropicalis*, es decir un compuesto acetamida (Sigma), a 1,0 g.

10 Sobre estos dos medios, se cultivaron directamente 12 cepas de levaduras, en placas de Petri. Las cepas procedentes de la colección de la solicitante, pertenecen a las especies siguientes: *C. albicans* (3 cepas), *C. glabrata* (2 cepas), *C. krusei* (1 cepa), *C. parapsilosis* (1 cepa), *C. tropicalis* (3 cepas), *Saccharomyces cerevisiae* (1 cepa), *Trichosporon spp.* (1 cepa). Las placas se incubaron a una temperatura de 37°C durante 48 horas. Las colonias  
15 formadas se examinaron visualmente, respectivamente, después de 24 y 48 horas de incubación, según las interpretaciones siguientes:

- las colonias azules corresponden a cepas que producen la N-acetil-β-D-glucosaminidasa que pertenece, a priori, a la especie *C. albicans*;
- las colonias blancas corresponden a las cepas que no producen la enzima antes citada, o en las que esta enzima se inhibe mediante el compuesto de tipo amida, por lo cual, éstas pertenecen a otras especies de levaduras que se identificarán entonces mediante las técnicas habituales.

25 Los resultados se presentan en la tabla I siguiente:

Tabla I

Especies	Coloración						
	A 24 horas			A 48 horas			
	Medio	Fuerte	Débil	Ninguno	Fuerte	Débil	Ninguno
<i>C. albicans</i>	I	1*	2	-	3	-	-
	II	1	2	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	I	-	-	2	-	-	2
	II	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	I	-	-	3	3	-	-
	II	-	-	3	-	1	2
<i>S. cerevisiae</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	I	-	-	1	1	-	-
	II	-	-	1	1	-	-

\*: número de cepas, "-" = 0.

30 Tal y como se desprende de la tabla I anterior, la adición del compuesto de tipo amida permite una detección específica de las cepas de *C. albicans*. En efecto, sólo las cepas de *C. albicans*, así como una cepa de *Trichosporon*, después de 48 horas de incubación únicamente, producen colonias coloreadas sobre el medio según la invención. Las colonias de *C. tropicalis* que son azules después de 48 horas sobre el Medio I, proporcionan colonias incoloras sobre el Medio II, excepto una muy débilmente coloreada, después de 48 horas de incubación.

35 **Ejemplo 2:**

Se reprodujo el experimento del ejemplo 1, pero utilizando medios líquidos, en lugar de medios gelificados.

Los medios III y IV corresponden por lo tanto a los medios I y II del ejemplo 1, pero se encuentran desprovistos de agar. Además, la concentración de la 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-b-D-glucosamida, es de 150 mg/l de medio final, para una utilización en medio líquido. Los medios se repartieron en ampollas de vidrio, a razón de 3 ml por ampolla. Las cepas estudiadas son las mismas que en el ejemplo 1. Se efectuó una suspensión contrastada a 2 MacFarland, con la ayuda de un nefelómetro, para cada una de las cepas directamente en las ampollas que contenían el medio. Las ampollas inoculadas de esta forma se incubaron durante 48 horas, a 37°C. Éstas se examinaron, después de respectivamente 24 y 48 horas, según las interpretaciones del ejemplo 1.

10 Los resultados, se presentan en la tabla II siguiente:

Tabla II

Especies	Coloración						
	A 24 horas			A 48 horas			
	Medio	Fuerte	Débil	Ninguno	Fuerte	Débil	Ninguno
<i>C. albicans</i>	III	1*	2	-	3	-	-
	IV	1	2	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	III	-	-	2	-	-	2
	IV	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	III	-	2	1	3	-	-
	IV	-	-	3	-	2	1
<i>S. cerevisiae</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	III	-	-	1	-	1	-
	IV	-	-	1	-	1	-

\*: número de cepas, "-" = 0.

15 Tal y como se desprende de la tabla II anterior, la adición del compuesto amidado permite una detección específica de las cepas de *C. albicans*. En efecto, sólo las cepas de *C. albicans*, proporcionan tubos coloreados en azul después de 24 horas de incubación, en el medio según la invención. Las cepas de *C. tropicalis*, que proporcionan tubos coloreados en el Medio III, proporcionan tubos incoloros en el medio IV. Después de 48 horas de incubación, la coloración de los tubos que comprenden cepas de *C. tropicalis*, se inhibe asimismo o por lo menos se reduce de una forma muy fuerte.

**Ejemplo 3:**

Se realizaron unos ensayos para ensayar el efecto de la acetamida sobre la actividad hexosaminidasa de las levaduras, en presencia de un activador específico de esta enzima.

Se reprodujo el experimento del ejemplo 1, pero añadiendo N-acetil-glucosamina al medio. Los medios V y VI corresponden por lo tanto a los medios I y II del ejemplo 1, a los cuales se les ha añadido N-acetil-glucosamina, a 1,0 g/l de medio final. Las cepas estudiadas son las mismas que en el ejemplo 1. Éstas se cultivaron directamente en placas de Petri. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C. Las colonias formadas se examinaron visualmente, después de respectivamente 24 y 48 horas de incubación, según las interpretaciones del ejemplo 1.

Los resultados se presentan en la tabla III siguiente:

Tabla III

Especies	Coloración						
	A 24 horas			A 48 horas			
	Medio	Fuerte	Débil	Ninguno	Fuerte	Débil	Ninguno
<i>C. albicans</i>	V	2*	1	-	3	-	-
	VI	2	1	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	V	-	-	2	-	-	2
	VI	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	V	-	-	1	-	-	1
	VI	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	V	-	-	1	-	-	1

Especies	Coloración						
	A 24 horas			A 48 horas			
	Medio	Fuerte	Débil	Ninguno	Fuerte	Débil	Ninguno
<i>C. tropicalis</i>	VI	-	-	1	-	-	1
	V	-	-	3	3	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	VI	-	-	3	-	-	3
	V	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	VI	-	-	1	-	-	1
	V	-	-	1	1	-	-
	VI	-	-	1	1	-	-

\*: número de cepas, "-" = 0.

5 Tal y como se desprende de la tabla III anterior, la adición del compuesto de tipo amida permite una detección específica de las cepas de *C. albicans*. En efecto, sólo las cepas de *C. albicans*, así como una cepa de *Trichosporon*, después de 48 horas de incubación únicamente, producen colonias coloreadas sobre el medio según la invención. Las cepas de *C. tropicalis* que son azules sobre el Medio V, proporcionan colonias incoloras sobre el Medio VI. El conjunto de estos dos medios permite por lo tanto también una identificación específica de las levaduras de la especie *C. tropicalis*, puesto que después de 24 horas de incubación, éstas son las únicas que son positivas sobre el medio V, y negativas sobre el medio VI.

10 **Ejemplo 4:**

Se realizaron unos ensayos para ensayar el efecto de una mezcla de compuestos amidados sobre la actividad hexosaminidasa de las levaduras, en presencia de un activador específico de esta enzima.

15 Se reprodujo el experimento del ejemplo 3, pero añadiendo formamida al medio VI, a 0,5 g/l de medio final (medio VIII), siendo el medio VII idéntico al medio V del ejemplo 3. Las cepas estudiadas son las mismas que en el ejemplo 3. Éstas se cultivaron directamente en placas de Petri. Las placas se incubaron durante 48 horas, a 37°C. Las colonias formadas se examinaron visualmente, después de respectivamente 24 y 48 horas de incubación, según las interpretaciones del ejemplo 1.

20 Los resultados se presentan en la tabla IV a continuación:

Tabla IV

Especies	Coloración						
	A 24 horas			A 48 horas			
	Medio	Fuerte	Débil	Ninguno	Fuerte	Débil	Ninguno
<i>C. albicans</i>	VII	2*	1	-	3	-	-
	VIII	2	1	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	VII	-	-	2	-	-	2
	VIII	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	VII	-	-	3	3	-	-
	VIII	-	-	3	-	-	3
<i>S. cerevisiae</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	VII	-	-	1	1	-	-
	VIII	-	-	1	-	1	-

\*: número de cepas, "-" = 0.

25 Tal y como se desprende de la tabla IV anterior, la adición del compuesto de tipo amida, permite una detección todavía más específica de las cepas de *C. albicans*. En efecto, sólo las cepas de *C. albicans* producen colonias significativamente coloreadas sobre el medio según la invención. Las cepas de *C. tropicalis* que son azules sobre el Medio VII, proporcionan colonias incoloras sobre el Medio VIII y la cepa de *Trichosporon*, fuertemente coloreada después de 48 horas de incubación sobre el medio VII, no lo es más que de una forma muy débil sobre el medio VIII.

30 **Ejemplo 5:**

35 Se realizaron unos ensayos para ensayar el interés de combinar un sustrato de hexosaminidasa y un sustrato de β-glucosidasa en un medio para el aislamiento e identificación de levaduras.

## ES 2 449 497 T3

5 Al medio I del ejemplo 1, se le añadió un sustrato de  $\beta$ -glucosidasa, el 6-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucósido, a 0,07 g/l (medio IX). A este medio, se le añadió o bien un activador de hexosaminidasa (N-acetil-glucosamida), a 1 g/l (medio X), o bien un inhibidor de hexosaminidasa de las *C. tropicalis* (Acetamida), a 1 g/l (medio XI), o bien una combinación del activador y el inhibidor anteriormente citados, a las mismas concentraciones (medio XII).

10 Sobre estos cuatro medios, se cultivaron directamente dieciocho cepas de levaduras, en placas de Petri. Las cepas procedentes de la colección de la solicitante, pertenecen a las especies siguientes: *C. albicans* (3 cepas), *C. glabrata* (2 cepas), *C. guilliermondii* (2 cepas), *C. kefir* (2 cepas), *C. krusei* (1 cepa), *C. lusitaniae* (2 cepas), *C. parapsilosis* (1 cepa), *C. tropicalis* (3 cepas), *Saccharomyces cerevisiae* (1 cepa), *Trichosporon spp.* (1 cepa). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente, respectivamente después de 24 y 48 horas de incubación, según las interpretaciones siguientes:

- 15 - las colonias azules corresponden a cepas que producen la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, que pertenece *a priori* a la especie *C. albicans*;
- las colonias rosas corresponden a las cepas que producen la  $\beta$ -glucosidasa, que pertenecen *a priori* a las especies *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*;
- 20 - las colonias malvas corresponden a las cepas que producen las dos actividades enzimáticas;
- las colonias blancas corresponden a las cepas que no producen ninguna de las enzimas anteriormente citadas, o en donde estas enzimas están inhibidas, por lo cual, éstas pertenecen a otras especies de levaduras que deberán identificarse entonces mediante unas técnicas habituales.

25

Los resultados se presentan en la tabla V a continuación:

Tabla V

Especies	Coloración						
	A 24 horas			A 48 horas			
	Medio	Fuerte	Débil	Ninguno	Fuerte	Débil	Ninguno
<i>C. albicans</i>	IX	1-azul	2-azul	-	3-azul	-	-
	X	2-azul	1-azul	-	3-azul	-	-
	XI	1-azul	2-azul	-	3-azul	-	-
	XII	2-azul	1-azul	-	3-azul	-	-
<i>C. glabrata</i>	IX	-	-	2	-	-	2
	X	-	-	2	-	-	2
	XI	-	-	2	-	-	2
	XII	-	-	2	-	-	2
<i>C. guilliermondii</i>	IX	-	-	2	2-rosa	-	-
	X	-	-	2	2-rosa	-	2
	XI	-	-	2	2-rosa	-	2
	XII	-	-	2	-	2-rosa	2
<i>C. kefir</i>	IX	-	2-rosa	2	2-rosa	-	2
	X	-	2-rosa	2	2-rosa	-	2
	XI	-	2-rosa	2	2-rosa	-	2
	XII	-	2-rosa	2	2-rosa	-	2
<i>C. krusei</i>	IX	-	-	1	-	-	1
	X	-	-	1	-	-	1
	XI	-	-	1	-	-	1
	XII	-	-	1	-	-	1
<i>C. lusitaniae</i>	IX	-	-	2	1-rosa	1-rosa	2
	X	-	-	2	2-rosa	-	2
	XI	-	-	2	1-rosa	1-rosa	2
	XII	-	-	2	2-rosa	-	2
<i>C. parapsilosis</i>	IX	-	-	1	-	-	1
	X	-	-	1	-	-	1
	XI	-	-	1	-	-	1
	XII	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	IX	2-rosa	1-rosa	-	2-malva	1-rosa	-
	X	2-rosa	1-rosa	-	2-malva	1-rosa	3
	XI	2-rosa	1-rosa	-	3-rosa	-	3
	XII	2-rosa	1-rosa	-	3-rosa	-	3

Especies	Coloración						
	A 24 horas			A 48 horas			
	Medio	Fuerte	Débil	Ninguno	Fuerte	Débil	Ninguno
<i>C. cerevisiae</i>	IX	-	-	1	-	-	1
	X	-	-	1	-	-	1
	XI	-	-	1	-	-	1
	XII	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	IX	-	-	1	1	-	-
	X	-	-	1	-	-	1
	XI	-	-	1	-	-	1
	XII	-	-	1	-	1	-

\*: número de cepas - color de las colonias, "-" = 0.

Tal y como se desprende de la tabla V anterior, la adición de una combinación de un sustrato de hexosaminidasa y de un sustrato de  $\beta$ -glucosidasa, permite una detección de un número más importante de especies de levadura. En efecto, es posible el distinguir sobre el medio según la invención, las cepas de *C. albicans*, por una parte, y las cepas de *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. lusitanae* y *C. tropicalis* por otra, de las otras especies de levaduras. Los medios X, XI y XII, ilustran el interés de asociar esta combinación de sustrato a un activador de hexosaminidasa, a un inhibidor específico de la hexosaminidasa de las cepas de *C. tropicalis* o a la mezcla de los dos. Sobre el medio X, la detección de las cepas de *C. albicans* es más rápida que sobre el medio IX, sobre el medio XI, la diferencia entre las cepas de *C. albicans* y las de *C. tropicalis*, es más clara y, el medio XII, combina las ventajas de los medios X y XI.

5

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Medio de cultivo para la identificación específica y/o la diferenciación de las levaduras *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, caracterizado porque comprende dos sustratos:
- un primer sustrato, cromógeno o fluorígeno, constituido por una parte marcador y por una parte susceptible de ser hidrolizada por una enzima del grupo de las hexosaminidasas, y
  - 10 - un segundo sustrato, cromógeno o fluorígeno, constituido por una parte marcador y por una parte susceptible de ser hidrolizada por una enzima del grupo de las glucosidasas.
- siendo dicha parte marcador del segundo sustrato diferente de la parte marcador del primer sustrato.
- 15 2. Medio según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende un activador de hexosaminidasa
3. Medio según la reivindicación 2, caracterizado porque el activador está constituido por una hexosamina y/o una hexosaminidina.
- 20 4. Medio según las reivindicaciones 2 o 3, caracterizado porque comprende un activador específico de la enzima hexosaminidasa de *C. albicans*.
5. Medio según la reivindicación 4, caracterizado porque el activador específico de la enzima hexosaminidasa es la N-acetil-glucosamina.
- 25 6. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el primer sustrato de la hexosaminidasa está constituido por un derivado de indoxilo y/o porque el segundo sustrato de glucosidasa está constituido por un derivado de indoxilo.
- 30 7. Medio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el medio es líquido o gelificado.
8. Procedimiento de análisis microbiológico para detectar e identificar selectivamente algunas especies de levaduras *Candida*, caracterizado porque se pone la muestra directamente en contacto con un medio según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, porque se espera a que aparezcan unas coloraciones en el medio, y porque se identifican, mediante estas diferencias de coloración, las *C. albicans* con respecto, por un lado, a las *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* y/o *C. tropicalis* y, por otro lado, a las otras *Candida*, así como las *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* y/o *C. tropicalis*, con respecto a las otras *Candida*.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se espera entre 36 y 60 horas y de forma ventajosa sustancialmente 48 horas, cuando el medio no contiene ningún activador según la reivindicación 5.
- 40 10. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se espera entre 18 y 30 horas y de forma ventajosa sustancialmente 24 horas, cuando el medio contiene un activador según la reivindicación 5.