

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 629**

51 Int. Cl.:

C12N 3/00 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2011 PCT/FR2011/051982**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12028816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2011 E 11764808 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2611903**

54 Título: **Utilización de un activador de beta-glucosidasa para la detección y/o la identificación de C. Difficile**

30 Prioridad:

01.09.2010 FR 1056928

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

03.04.2017

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**CELLIER, MARIE;
HALIMI, DIANE y
ORENGA, SYLVAIN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 607 629 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

Utilización de un activador de beta-glucosidasa para la detección y/o la identificación de *C. Difficile*

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de identificación de los *Clostridium difficile*. Se refiere también a un medio de reacción específico de *Clostridium difficile* que comprende un activador de beta-glucosidasa.

10 *Clostridium difficile* (*C. difficile*) es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, y que forma unas esporas. Es el origen de patologías intestinales de gravedad variable: diarreas medianas o fulminantes, colitis pseudomembranosas o megacolon tóxico, que puede por sí mismo ser la causa de una sepsis. El *Clostridium difficile* se transmite por ingestión oral de esporas que residen en la acidez del estómago y germinan en el intestino. Un desequilibrio de la flora comensal del colon permite la proliferación de *C. difficile*, que produce unas toxinas que son la causa de las colitis. En numerosos casos, el desequilibrio de la flora comensal es el resultado de una toma de antibióticos. El *C. difficile* puede ser considerado como un microorganismo inofensivo del entorno, que se vuelve patógeno oportunista en condiciones particulares. El tránsito digestivo asintomático de *C. difficile* se estima en un 3% en la población adulta, pero puede alcanzar del 15 al 25% de los sujetos después de un tratamiento con antibióticos o una estancia en una unidad de alta endemicidad. Se observa habitualmente un porcentaje de tránsito elevado, del 20 al 40% en pacientes hospitalizados, hasta el 50-70% en los niños. La posibilidad de un diagnóstico precoz y rápido es un elemento clave para la prevención de las complicaciones severas, y para un tratamiento clínico eficaz.

El diagnóstico se basa en la búsqueda de las toxinas y en el cultivo.

25 La puesta en evidencia de las toxinas directamente a partir de las heces es un excelente marcador de la presencia de una cepa toxigena de *C. difficile*. El método de referencia consiste en buscar un efecto citopatógeno (CTA por "Cytotoxic activity" según la denominación anglosajona) mediante cultivo celular. Este método es muy sensible pero no está estandarizado y necesita unos técnicos especializados y un tiempo de respuesta de varios días. También se han desarrollado unos ensayos inmunoenzimáticos de tipo ELISA, que detectan o bien la toxina A sola, o bien las toxinas A y B. Se reduce el tiempo de obtención de un resultado. Sin embargo, se recomienda asociar las técnicas inmunológicas utilizadas para la detección de las toxinas al cultivo bacteriano para aislar las cepas de *C. difficile*. Este cultivo puede ser realizado sobre una agar *C. difficile* comercializado por la solicitante, siendo las colonias de *C. difficile* después identificadas por unos métodos bioquímicos tales como la galería API[®] 20 A o la galería rapid ID 32A. Sin embargo, la identificación por galería necesita tener un cultivo puro de la bacteria a identificar, en un medio de crecimiento adaptado a fin de obtener suficiente biomasa (3 a 4 Mc Farland) lo que toma, en el mejor de los casos, 48h (cultivo de aislamiento de 24 a 72 horas a partir de la extracción que da únicamente la detección presuntiva, y después cultivo de 24 a 72 horas para generar suficiente biomasa). La lectura de la galería se efectúa después tras 4h de incubación para el rapid ID 32 A y 24 a 48h para la galería 20A.

40 Finalmente, el diagnóstico se puede realizar mediante técnicas de biología molecular. No obstante, estas técnicas no son utilizadas de forma rutinaria en la actualidad.

45 Para sus trabajos con el objetivo de mejorar la identificación directa de *C. difficile*, en un cultivo bacteriano, la solicitante ha puesto en evidencia que la utilización de sustrato(s) enzimático(s) de beta-glucosidasa permite una identificación fácil y rápida de *C. difficile*. Dicha utilización de sustrato de beta-glucosidasa se describe en la solicitud WO 2009/092982 como reduciendo el tiempo de obtención de un resultado de identificación de *C. difficile*.

50 La identificación precoz y rápida de *C. difficile* susceptible de estar presente en una muestra sigue siendo un objetivo prioritario, y la solicitante ha proseguido sus investigaciones buscando más particularmente acelerar la revelación de la actividad enzimática. Ha puesto en evidencia así, de manera inesperada, que un medio de reacción que comprende un sustrato de beta-glucosidasa y un activador de beta-glucosidasa de fórmula general Ar-beta-D-glucopiranosido, en la que Ar- corresponde a un núcleo aromático o a varios núcleos aromáticos adyacentes, permite una identificación rápida de *C. difficile* en una muestra, dicho de otra manera, tal medio permite una detección más precoz de la actividad enzimática de al menos ciertas cepas de *C. difficile*. La utilización de un compuesto Ar-beta-D-glucósido permite una activación de la beta-glucosidasa y la observación de una coloración significativamente más intensa de las colonias de *C. difficile*. Ventajosamente, los compuestos Ar-beta-D-glucósido tienen un poder activador de la beta-glucosidasa de *C. difficile* muy superior al de los otros derivados beta-D-glucósido tales como celobiosa (4-O-beta-D-glucopiranosil-D-glucosa) o la metil-beta-D-glucosa.

60 Se conoce que los compuestos de fórmula general Ar-beta-D-glucósido, en la que Ar- representa al menos un núcleo aromático, homo- o heterocíclico, pueden ser utilizados como sustratos de beta-glucosidasa. Esta utilización está detallada en la solicitud WO 2009/092982 (*supra*). Asimismo, Hildebrand y Schrotch informan que la arbutina, o hidroquinona beta-D-glucopiranosido, se utiliza como fuente de carbono, a una concentración del 0,5% peso/volumen, dicho de otra manera de 5 g/l, en combinación con glucosa, en un medio de reacción. La hidrólisis de la arbutina en hidroquinona, medida mediante métodos cromatográficos, es un marcador de la actividad beta-glucosidasa de *Pseudomonas syringae* (Hildebrand y Schrotch, Applied Microbiology, 1964; 12 (6): 487-491). Esto disuade al experto en la materia de utilizar un compuesto Ar-beta-D-glucósido como activador de la beta-glucosidasa

en un medio de reacción para la detección o la identificación de *C. difficile*, ya que se encontraría en competencia con el sustrato destinado a revelar la actividad enzimática del microorganismo diana.

5 Finalmente, la técnica anterior informa que la arbutina administrada por vía oral se excreta y metaboliza en las orinas y puede, para ello, ser utilizada por sus propiedades diuréticas y antibacterianas (Schindler *et al.*, 2002; J. Clin. Pharmacol.; 42 (8): 920-927; Siegers *et al.*, 2003, Phytomedicine; 10 (Suppl 4):58-60). Tal utilización disuade también de la utilización de la arbutina en un medio de reacción para detectar una bacteria.

10 Antes de una descripción detallada de la invención, se dan las definiciones siguientes para permitir comprender mejor la invención. No son de ninguna manera limitativas.

15 Por medio de reacción, se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la expresión de un metabolismo y/o el crecimiento de microorganismos. El medio de reacción puede ser sólido, semisólido o líquido. Por medio sólido, se entiende por ejemplo un medio gelificado. El agar es el agente gelificante tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar gelatina, agarosa u otros gelificantes naturales o artificiales. Un cierto número de preparaciones están disponibles en el comercio, como por ejemplo el agar Columbia, la gelosa Trypcase-soja, la gelosa Mac Conkey, la gelosa Sabouraud o más generalmente las descritas en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press). El medio de reacción según la invención debe permitir el crecimiento de las *C. difficile*.

20 El medio de reacción puede comprender uno o varios elementos en combinación, tales como unos aminoácidos, unas peptonas, unos hidratos de carbono, unos nucleótidos, unos minerales, unas vitaminas, etc. El medio puede comprender también un colorante. A título indicativo, se puede citar como colorante el azul de Evans, el rojo neutro, la sangre de oveja, la sangre de caballo, un opacificante tal como el óxido de titanio, la nitroanalina, el verde malaquita, el verde brillante, uno o varios indicadores metabólicos, uno o varios reguladores metabólicos, etc.

25 El medio de reacción puede ser un medio de revelación o un medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la inoculación y, en el segundo caso, el medio de detección y/o de identificación constituye también el medio de cultivo.

30 El experto en la materia puede también utilizar una bi-caja, que permite comparar fácilmente dos medios, que comprende diferentes sustratos o diferentes mezclas selectivas, en los cuales se ha depositado una misma muestra biológica.

35 El medio de reacción puede comprender uno o varios activadores de crecimiento de las cepas de *C. difficile*. Por activador de crecimiento, se entiende un compuesto o un grupo de compuestos que estimula el crecimiento de microorganismos. Se puede citar en particular la sangre, el suero, las yemas de huevos. Sin ser limitativa, una concentración comprendida entre 0,1 y 10% es particularmente adecuada para la presente invención.

40 El medio de reacción puede comprender uno o varios agentes reductores. Por agente reductor, se entiende un compuesto o un grupo de compuestos que facilita el crecimiento de los gérmenes anaeróbicos neutralizando el oxígeno disuelto presente en el medio. Se puede citar en particular la cisteína, el piruvato, la oxirasa, el sulfito de sodio, la ditionita, la histidina, el sulfuro ferroso. Sin ser limitativa, una concentración comprendida entre 0,05 y 50 g/l, preferiblemente entre 0,1 y 2 g/l es particularmente adecuada para la presente invención.

45 El medio de reacción puede comprender uno o varios inductores de la germinación de las esporas de *C. difficile*. Por inductor de la germinación de las esporas, se entiende un compuesto o un grupo de compuestos que favorece el paso del estado de espора al estado vegetativo de las *C. difficile*. Se puede citar asimismo el taurocolato de sodio.

50 Sin ser limitativa, una concentración comprendida entre 0,1 y 10 g/l, preferiblemente entre 1 y 5 g/l es particularmente adecuada para la presente invención.

55 El medio de reacción puede comprender uno o varios agentes selectivos. Por agente selectivo, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de un microorganismo diferente del microorganismo diana. Sin ser limitativa, una concentración comprendida entre 5 mg/l y 5 g/l es particularmente adecuada para la presente invención.

60 Se puede citar como agente selectivo, los antibióticos, los antifúngicos. Por antibiótico, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de una bacteria. Pertenecen en particular a los grupos de las cefalosporinas, de los aminósidos, de los polipéptidos, de las sulfamidas, de las quinolonas. A título indicativo, se pueden citar en particular los antibióticos cefotaxima, ceftazidima, ceftioxima, ceftriaxona, cefpodoxima, aztreonam, gentamicina, trimetoprima, tobramicina, moxalactam, fosfomicina, D-cicloserina, polimixina, colistina, las quinolonas tales como el ácido nalidíxico.

65 Por antifúngico, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de una levadura o de un moho. A título indicativo, se puede citar en particular la amfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el

voriconazol, la cicloheximida.

De manera general, el medio de reacción puede además contener un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática o metabólica de los microorganismos diana gracias a una señal detectable directa o indirectamente. Para una detección directa, este sustrato puede estar unido a una parte que actúa como marcador, fluorescente o cromógeno. Para una detección indirecta, el medio de reacción según la invención puede comprender además un indicador de pH, sensible a la variación de pH inducida por el consumo del sustrato y que revela el crecimiento de los microorganismos diana. Dicho indicador de pH puede ser un cromóforo o un fluoróforo. Se citarán como ejemplos de cromóforos el rojo neutro, el azul de anilina, el azul de bromocresol. Los fluoróforos comprenden por ejemplo la 4-metilumbeliferona, los derivados del hidroxicumarina o los derivados de la resorufina.

Por sustrato de beta-glucosidasa, apto para la identificación de *C. difficile*, se entiende un sustrato que induce, en condiciones de crecimiento adecuadas, la coloración de *C. difficile*. Se entiende en particular el 2-hidroxifenil-beta-glucósido (Catecol-beta-glucósido); Magenta-beta glucósido (5 Bromo-6 cloro-3 indoxil-beta glucósido); DHF-beta glucósido (Dihidroxi flavona-beta glucósido); la Esculina (Esculetin-beta glucósido); CHE-beta glucósido (3,4 Ciclohexenoesculetin-beta glucósido); 8 Hidroxiquinolin-beta glucósido; X-beta glucósido (5 Bromo-4 cloro-3 indoxil-beta glucósido); Rose-beta glucósido (6 Cloro-3 indoxil-beta glucósido); 6 Bromo-3 indoxil-beta glucósido; Blue-beta glucósido (5 Bromo-3 indoxil-b glucósido); 6 Fluoro-3 indoxil-beta glucósido; Alizarin-beta glucósido; (P) Nitrofenil-beta glucósido; 4 Metilumbeliferil-beta glucósido, Naftolbenzein-beta glucósido, Indoxil-N metil-beta glucósido, 5 Bromo-4 cloro-3 indoxil-N metil-beta glucósido, el Naftil-beta glucósido; el Aminofenil-beta glucósido; el Dicloroaminofenil-beta glucósido, Aldol™-beta-glucósido (BIOSYNTH, Lukas M. Wick, Alexander Bayer, Christophe Weymuth, Günter Schabert, Vanessa Pfister, Aysel Aslan, Urs P. Spitz, « Novel Chromogenic Enzyme Substrates », ASM General Meeting, 2009, Philadelphia, I-091/285).

El medio de reacción puede comprender además un activador enzimático. Por activador enzimático, se entiende un compuesto que sirve para activar el proceso de digestión enzimática, dicho de otra manera, reducir el tiempo de incubación para revelar la actividad enzimática y/o incrementar dicha actividad enzimática.

Los activadores de beta-glucosidasa pueden tener por fórmula general Ar-beta-D-glucósido, en la que Ar- representa un núcleo aromático. Por núcleo aromático, se entiende un compuesto insaturado, es decir que presenta dobles enlaces y que comprende uno o varios anillos adyacentes, homo- o heteroatómicos, teniendo cada anillo de 5 a 7 vértices. De manera no limitativa, se citará la arbutina (hidroquinona-beta-D-glucósido), la 4-metilumbeliferil-beta-glucósido, el 4 aminofenil-beta-glucósido, la salicina (2-(hidroximetil)-fenil-beta-D-glucósido), la esculina (6,7-dihidroxi-cumarin-beta-glucósido). Algunos de estos compuestos son unos sustratos de la beta-glucosidasa. A título de la invención, son considerados como unos activadores ya que permiten reducir el tiempo de incubación necesario para la detección de la hidrólisis del compuesto utilizado como sustrato, o permiten incrementar esta hidrólisis. Así, de manera sorprendente, la combinación de un sustrato enzimático y de tal activador permite obtener una detección más precoz y/o más intensa de la actividad enzimática que cuando estos compuestos se utilizan por separado.

El poder activador de un compuesto puede ser puesto en evidencia en particular para ciertas cepas de *C. difficile* que tiene una actividad beta-glucosidasa tardía y/o débil, si la combinación de dicho compuesto y del sustrato permite una detección más precoz y/o más intensa que si el sustrato o si el activador se utilizaba solo o con una molaridad al menos equivalente a la suma de las molaridades del sustrato y del activador en combinación.

Por muestra biológica, se entiende una pequeña parte o pequeña cantidad aislada de una entidad para el análisis. Puede ser una muestra clínica, procedente de una extracción de líquido biológico o una muestra alimenticia, procedente de cualquier alimento. Esta muestra puede así ser líquida o sólida. Se puede citar de manera no limitativa, una muestra clínica de sangre total, suero, plasma, orinas, heces, extracciones de nariz, gargantas, piel, heridas, líquido cefalorraquídeo, una muestra alimenticia de agua, bebidas tales como leche, zumo de frutas, yogur, carne, huevos, verduras, mahonesa, queso, pescado, etc., una muestra alimenticia procedente de una alimentación destinada a los animales, tales como en particular una muestra procedente de harinas animales. Esta extracción se puede utilizar tal cual o previamente al análisis, sufrir una preparación de tipo enriquecimiento, extracción, concentración, purificación, según unos métodos conocidos por el experto en la materia.

Después de haberlo puesto en contacto con la muestra, el medio de reacción se incuba a una temperatura apropiada, generalmente comprendida entre 20 y 50°C, preferiblemente entre 30 y 40°C. De manera preferida, la incubación se efectúa anaeróbicamente, dicho de otra manera, en ausencia de oxígeno, según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

Por lo tanto, la invención se refiere a un medio de reacción que comprende al menos un sustrato de beta-glucosidasa, y un compuesto de fórmula general Ar-beta-D-glucosidasa, en la que Ar- designa un compuesto aromático, diferente de dicho sustrato, y se selecciona entre la arbutina o la hidroquinona-beta-D-glucopiranosido, el 4-metilumbeliferil-beta-glucósido, el 4-aminofenil-beta-glucósido, la salicina o 2-(hidroximetil)fenil-beta-D-glucósido, a una concentración inferior a 5 g/l.

Preferiblemente, el compuesto Ar-beta-D-glucósido está a una concentración comprendida entre 0,3 y 1,5 g/l.

De manera preferida, el compuesto Ar-beta-D-glucósido es la arbutina.

5 Según un modo preferido de realización de la invención, el sustrato de beta-glucosidasa se selecciona entre la Alizarina-beta-glucósido, el Magenta-beta-glucósido (5-Bromo-6-cloro-3-indoxil-beta-glucósido), el DHF-beta-glucósido, el 3HF-beta-glucósido, el CHE-beta-glucósido (3,4-Ciclohexenoesculetina-beta-glucósido) y los ALDOL™-beta-glucósido de la compañía BIOSYNTH (Wick *et al.* 2009. ASM General meeting - Philadelphia (PA, USA)). Dicho sustrato de beta-glucosidasa está a una concentración comprendida entre 25 y 1000 mg/l, preferiblemente entre 50 y 400 mg/l.

10 Según la invención, el activador enzimático es un sustrato enzimático cuyo producto de hidrólisis es diferente del producto de la hidrólisis del sustrato enzimático.

15 Según un modo preferido de realización de la invención, el activador enzimático es un sustrato enzimático cuyo producto no es detectable a simple vista en el medio de reacción, mientras que el producto de la hidrólisis del sustrato enzimático sí lo es.

20 Según otro modo preferido de realización de la invención, el medio de reacción comprende además un activador de la germinación de las esporas de *C. difficile*, siendo dicho activador preferiblemente el taurocolato de sodio, a una concentración comprendida entre 0,1 y 10,0 g/l, preferiblemente comprendida entre 1,0 y 5,0 g/l.

La invención se refiere también a un procedimiento de detección y/o de identificación de *C. difficile* que comprende las etapas que consisten en:

25 a) poner en contacto una muestra susceptible de contener *C. difficile* con un medio de reacción que comprende al menos un sustrato de beta-glucosidasa y un compuesto de fórmula general Ar-beta-D-glucósido, diferente de dicho sustrato, en la que Ar- designa un compuesto aromático, seleccionado entre la arbutina o hidroquinona-beta-D-glucopiranosido, el 4-metilumbelliferil-beta-glucósido, el 4-aminofenil-beta-glucósido, la salicina o 2-(hidroximetil)fenil-beta-D-glucósido, a una concentración inferior a 5 g/l;

30 b) incubar, y

c) detectar la hidrólisis del sustrato de beta-glucosidasa, que indica la presencia de *C. difficile*.

35 Según un modo preferido de realización, el procedimiento según la invención utiliza en la etapa a) un medio tal como se ha definido anteriormente.

40 Según otro modo preferido de realización, la incubación realizada en la etapa b) del procedimiento según la invención se realiza en anaerobiosis.

Los ejemplos siguientes son dados a título explicativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

45 Ejemplo 1: puesta en evidencia del efecto activador de la arbutina sobre un sustrato de beta-glucosidasa

1. Medio y microorganismos

50 Se han ensayado ocho cepas de *Clostridium difficile*, de la colección de la solicitante, sobre unos medios que comprenden arbutina a diferentes concentraciones en presencia o no de CHE-beta-glucósido. La lectura de las cajas se efectúa después a 24h. Los medios se componen de la siguiente manera:

Base CromID® *C. difficile* común a todos los medios:

Compuestos	Conc. en g/l
Peptona, extractos tisulares y celulares	12,5
Cloruro de sodio	6
Sulfato de magnesio	0,3
L-arginina	1
Bisulfito de sodio	0,1
agar	13
Citrato de hierro amoniacal	0,3
Glucosa	0,2
TRIS	0,1
Taurocolato de sodio	2,5

ES 2 607 629 T3

Después se añade arbutina y/o CHE-beta-glucósido según los medios:

Concentración en g/l	Medio T1	medio A1	medio A2	medio A3	medio T2	medio B1	medio B2	medio B3
CHE-b-glucósido	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,3
Arbutina g/l	0	0,1	0,3	1	0	0,1	0,3	1

Las referencias y los ribotipos respectivos de las cepas ensayadas se indican en la tabla siguiente:

5

nº de cepas	Ribotipo
06 03 006	O27
08 01 092	O27
08 01 104	O27
08 01 109	O27
08 01 112	O103
08 01 113	O27
08 01 116	O27
08 01 118	O27

2. Ensayo

Los medios se distribuyen en cajas de Petri.

10

La inoculación se efectúa a partir de pre-cultivos de 48h a 37°C en anaerobiosis.

Se realiza una suspensión en agua fisiológica a 0,5 McF, después las cepas son inoculadas a lazo calibrado de 10 µl.

15

Se efectúan unas lecturas después de 24h de incubación a 37°C en anaerobiosis.

3. Resultados

20 Escala de lectura de la actividad enzimática/coloración

* 0 = ninguna actividad

* 0,5 = coloración muy pálida

25

* 1 = coloración clara de baja intensidad

* 2 = coloración pura de intensidad media,

30

* 3 = presencia de una coloración intensa,

* 4 = presencia de una coloración muy intensa.

La coloración obtenida con este sustrato es gris hasta una intensidad de 1 y negra para los otros valores

35

		T1	A1	A2	A3	T2	B1	B2	B3
<i>Clostridium difficile</i> 109	24h	0	0	0	0	1	1	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 104	24h	0	0	0	0	0,5	1	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 092	24h	0	0	0	0	0	1	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 006 (ATCC 027)	24h	0	0	0	0	1	1	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 116	24h	0	0	0	0	1	1	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 118	24h	0	0	0	0	0,5	1	3	4
<i>Clostridium difficile</i> 113	24h	0	0	0	0	1	1	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 112	24h	0	0	0	0	0	4	4	4

Así, después de 24h de incubación, se obtiene: en número de cepas coloreadas en negro sobre los diferentes medios:

	T1	A1	A2	A3	T2	B1	B2	B3
Intensidad de coloración >= 1	0/8	0/8	0/8	0/8	4/8	8/8	8/8	8/8

40

4. Interpretación

En ausencia de sustrato, no se observa ninguna coloración.

5 La arbutina sola no permite tampoco obtener una coloración de las colonias.

Por el contrario, a partir de la adición de arbutina en presencia de CHE-beta-glucósido, se observa una activación de la beta-glucosidasa que se traduce por una intensificación de la coloración (gris a negro).

10 5. Conclusión

La arbutina actúa como activador de beta-glucosidasa sobre las cepas de *Clostridium difficile*.

Ejemplo 2: ensayo de una concentración óptima en arbutina sobre diferentes cepas de *C. difficile*

15

1. Medio y microorganismos

Se han ensayado veinte y cuatro cepas de *Clostridium difficile*, de la colección de la solicitante, sobre 5 medios que comprenden cada uno una concentración diferente en arbutina. La lectura de las cajas se efectúa después a 24h.

20

Los medios utilizados se preparan a partir del medio CromID® *C. difficile* indicado anteriormente, para el ejemplo 1, al que se añaden respectivamente cefotaxima a 0,016 g/l, fungizona a 0,005 g/l y D-cicloserina a 0,25 g/l (concentraciones finales), y arbutina según la tabla siguiente:

	medio 1	medio 2	medio 3	medio 4	medio 5
Arbutina g/l	0	0,75	1	1,25	1,5

25

Las referencias y los ribotipos respectivos de las cepas ensayadas se indican en la tabla siguiente:

n° de cepas	Ribotipo
02 01 042	ND
02 01 043	ND
02 06 146	ND
02 06 148	ND
06 03 006	027
08 01 078	027
08 01 080	027
08 01 084	027
08 01 088	010
08 01 092	027
08 01 094	078
08 01 095	027
08 01 096	027
08 01 098	027
08 01 100	027
08 01 102	001
08 01 103	014
08 01 104	027
08 01 109	027
08 01 111	027
08 01 113	027
08 01 114	002
08 01 116	027
08 01 118	027

ND = no determinado

30 2. Ensayos

Los medios se distribuyen en cajas de Petri.

La inoculación se efectúa a partir de pre-cultivos de 48h a 37°C en anaerobiosis.

35

Se realiza una suspensión en agua fisiológica a 0,5 McF, después se inoculan las cepas con lazo calibrado de 10 µl.

Se efectúan unas lecturas después de 24h de incubación en anaerobiosis.

3. Resultados

5 Escala de lectura de la actividad enzimática/coloración

* 0 = ninguna actividad

* 0,5 = coloración muy pálida

10

* 1 = coloración clara de baja intensidad

* 2 = coloración pura de intensidad media,

15

* 3 = presencia de una coloración intensa,

* 4 = presencia de una coloración muy intensa.

La coloración obtenida con este sustrato es gris hasta una intensidad de 1 y negra para los otros valores.

20

Los resultados observados aquí, en los diferentes medios, se obtuvieron después de 24h de incubación a 37°C en anaerobiosis.

	M1	M2	M3	M4	M5
<i>Clostridium difficile</i> 42	3	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Clostridium difficile</i> 43	3	3	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 146	0	2	2	1,5	1,5
<i>Clostridium difficile</i> 148	3	3	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 6	0,75	3	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 78	3	3	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 80	0,75	1,5	3	3	2,5
<i>Clostridium difficile</i> 84	2	2	2	2	2
<i>Clostridium difficile</i> 88	4	4	4	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 92	0	3	3	2,75	2,75
<i>Clostridium difficile</i> 94	3	3	3	3	2,75
<i>Clostridium difficile</i> 95	0,5	3	3	2,5	1
<i>Clostridium difficile</i> 96	1	2,5	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 98	0,75	3	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 100	0,5	3	3	3	2,75
<i>Clostridium difficile</i> 102	3	3	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 103	3	4	4	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 104	0,1	2,5	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 109	0,1	3	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 111	0	2,5	2,5	2,5	3
<i>Clostridium difficile</i> 113	0	2,5	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 114	3	3	3	2,5	2,5
<i>Clostridium difficile</i> 116	0	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Clostridium difficile</i> 118	0	2,5	2,5	2,5	2,5

25 Así, después de 24h de incubación, se obtiene, en número de cepas coloreadas en negro, en los diferentes medios:

	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
Coloración >= 1	12/24 de los cuales 0/15 O27	24/24 de los cuales 15/15 O27			

4. Interpretación

30 A partir de la adición de arbutina en el medio, la coloración está claramente mejorada. A 24h, en el medio sin arbutina, solamente 12 cepas de 24 presentan una coloración superior o igual a 1, mientras que en presencia de 750 mg/l de arbutina, 24 cepas/24 son coloreadas con una intensidad mínima de 1.

35 Las cepas que presentan ya una fuerte coloración en el control no parecen o están poco impactadas por la presencia de arbutina si no se supera 1 g/l. Más allá, se observa para algunas cepas una ligera disminución de la intensidad de coloración.

5. Conclusión:

5 La arbutina actúa aquí como un activador de beta-glucosidasa y su acción parece significativa para la detección precoz de los *Clostridium difficile* y en particular para el ribotipo O27.

Ejemplo 3: ensayo del efecto activador de la arbutina sobre diferentes sustratos de beta-glucosidasa

1. Medio y microorganismos

10 Las ocho cepas de *Clostridium difficile* ensayadas en el ejemplo 1 se ensayaron sobre unos medios que comprenden DHF-beta-glucósido (medio A), alizarina-beta-glucósido (medio B) o 3HF-beta-glucósido (medio C) y una concentración creciente en arbutina.

15 La lectura de las cajas se efectúa después a 24h y 48h.

Los medios utilizados son preparados en base al medio cromID[®] *C. difficile* indicado anteriormente, para el ejemplo 1, al que se añade arbutina según la tabla siguiente:

	Medio T	Medio 1	medio 2	medio 3
Arbutina g/l	0	0,250	0,5	1

20 En función de los sustratos, los medios son por lo tanto los siguientes:

* DHF- beta-glucósido a 400 mg/l (medios TA, 1A, 2A y 3A)

25 * Alizarina-beta-glucósido a 50 mg/l (medios TB, 1 B, 2B y 3B)

* 3HF-beta-glucósido a 300 mg/l (medios TC, 1C, 2C y 3C)

2. Ensayos

30 Los medios se distribuyen en cajas de Petri.

La inoculación se efectúa a partir de precultivos de 48h a 37°C en anaerobiosis.

35 Se realiza una suspensión en agua fisiológica a 0,5 McF, después se inoculan las cepas con lazo calibrado de 10 µl.

Se efectúan unas lecturas después de 24h y 48h de incubación a 37°C y en anaerobiosis.

3. Resultados

40 Escala de lectura de la actividad enzimática/coloración

* 0 = ninguna actividad

45 * 0,5 = coloración muy pálida

* 1 = coloración clara de baja intensidad

50 * 2 = coloración pura de intensidad media,

* 3 = presencia de una coloración intensa,

* 4 = presencia de una coloración muy intensa.

55 Color de las colonias:

Medio A: Marrón

Medio B: malva

60 Medio C: Marrón

		DHF-b-glucósido				Alizarina-b-glucósido				3HF-b-glucósido			
		TA	1A	2A	3A	TB	1B	2B	3B	TC	1C	2C	3C
<i>Clostridium difficile</i> 6	24h	2	2,5	3	3,5	0,5	1	1	0,75	0	0	0	0
	48h	2,5	2,5	3	3,5	0,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1	1,5
<i>Clostridium difficile</i> 92	24h	2	2	3	3,5	0,5	1	1	0,75	0	0	0	0
	48h	2,5	2,5	3	3,5	0,5	1,5	1,5	1,5	0,5	1	1,5	1,5
<i>Clostridium difficile</i> 104	24h	2	2,5	3	4	0,5	1	1	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5
	48h	2,5	2,5	3	4	0,5	1,5	1,5	1,5	1	1	1,5	2
<i>Clostridium difficile</i> 109	24h	2	2,5	3	4	0,5	1	1	1	0	0	0	0
	48h	2,5	3	3	4	0,5	1,5	1	1	1	1,5	1,5	1,5
<i>Clostridium difficile</i> 112	24h	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0
	48h	3	3	3	2,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0	1	1,5	1,5
<i>Clostridium difficile</i> 113	24h	2	2	2	2,5	1	1	1	1	0	0	0	0
	48h	2,5	2,5	3	3	1	2	2	1,5	1	1	1,5	2
<i>Clostridium difficile</i> 116	24h	2	2	2	2,5	1	1,25	1,25	1	0,1	0,1	0,1	0,1
	48h	2,5	2,5	2,5	3	1	1,5	1	1	0,5	1,5	1,5	1,5
<i>Clostridium difficile</i> 118	24h	2	2	2	3	1	1,5	1,5	1	0	0	0	0
	48h	2,5	2,5	3	3	1,5	2	2	1,5	0,5	1	1,5	1,5

4. Interpretación

En presencia de arbutina, se observa una mejora de la intensidad de coloración, sea cual sea el sustrato utilizado. Esta mejora es sobretodo visible durante la utilización de DHF- β -glucósido, a partir de 24h y esencialmente en presencia de 1 g/l de arbutina. Para la alizarina-beta-glucósido, la mejora es menos clara a 24h, pero se marca más a 48h sobre todos los medios que contienen arbutina. Finalmente, para el 3HF-beta-glucósido la aportación de este compuesto es visible sólo a 48h, pero se observa una activación real de la actividad beta-glucosidasa, sea cual sea la concentración utilizada y sean cuales sean las cepas.

Sin embargo, la concentración ideal varía según el sustrato utilizado y sería próxima a 1 g/l con el DHF-beta-glucósido y el 3HF-beta-glucósido y de 500 mg/l con la alizarina-beta-glucósido.

5. Conclusión

Este ensayo demuestra el interés de la arbutina para la activación de la actividad beta-glucosidasa en las cepas de *Clostridium difficile*.

Ejemplo 4: ensayo del efecto activador de los compuestos Ar-beta-glucósido sobre la actividad beta-glucosidasa.

1. Medio y microorganismos

Se han ensayado seis cepas de *Clostridium difficile* sobre unos medios que comprenden un compuesto que podría actuar como activador de la beta-glucosidasa en estas cepas. Los ribotipos de estas cepas se indican en las tablas *supra*. El de la cepa referenciada 08 01 091 es 056. Los compuestos ensayados como activadores de beta-glucosidasa son los siguientes:

* arbutina;

* O-metil-b-glucósido;

* Celobiosa;

* Salicina;

* 4-aminofenil-b-glucósido;

* 4-metil-umbeliferona-b-glucósido;

* esculina.

Se han ensayado a concentraciones que permiten obtener la misma molaridad para cada uno de los compuestos.

Los medios utilizados se preparan en base al medio chomID[®] *C. difficile* indicado anteriormente para el ejemplo 1, al cual se añade el sustrato CHE-beta-glucósido a 0,3 g/l y, respectivamente, uno de los compuestos según la tabla siguiente:

	Arbutina	O-metil-b-Glu	Celobiosa	Salicina	4AminoPhe	4MU-b-glu	esculina
T	-	-	-	-	-		
M1	1 g/l	-	-	-	-		
M2	-	0,7 g/l	-	-	-		
M3	-	-	1,25 g/l	-	-		
M4	-	-	-	1 g/l	-		
M5	-	-	-	-	1 g/l		
M6						1,25 g/l	
M7							1,25 g/l

2. Ensayos

Los medios son repartidos en cajas de Petri.

- 5 La inoculación se efectúa a partir de precultivos de 48h a 37°C en anaerobiosis.
- Se realiza una suspensión en agua fisiológica a 0,5 McF, después se inoculan las cepas con lazo calibrado de 10 µl.
- 10 Se efectúan unas lecturas después de 24h de incubación a 37°C y en anaerobiosis.

3. Resultados

Escala de lectura de la actividad enzimática/coloración

- 15 * 0 = ninguna actividad
- * 0,5 = coloración muy pálida
- 20 * 1 = coloración clara de baja intensidad
- * 2 = coloración pura de intensidad media,
- 25 * 3 = presencia de una coloración intensa,
- * 4 = presencia de una coloración muy intensa.

La coloración obtenida con este sustrato es gris hasta una intensidad de 1 y negra para los otros valores.

	T	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<i>Clostridium difficile</i> 91	4	4	0	4	4	4	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 94	0,5	3	0	0,5	4	4	3	3
<i>Clostridium difficile</i> * 6	4/1	4	0	4/1	4	4	3	3/1
<i>Clostridium difficile</i> 111	0,5	4	0	0	4	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 112	0	4	0	0	4	4	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 116	0,5	3	0	0,5	4	4	3	3

- 30 * = cepa que presenta unas colonias de colores heterogéneas; los resultados indicados en forma de fracción x/y significan que algunas cepas presentan una intensidad x y otras presentan una intensidad y.

4. Interpretación

- 35 El O-metil-beta-glucósido y la celobiosa no tienen efecto activador sobre la beta-glucosidasa de las *Clostridium difficile*. Por el contrario, se observa una disminución de la coloración sobre las cepas que presentan una coloración sobre el control.
- 40 Por el contrario, como para la arbutina, se observa la activación de la beta-glucosidasa y por lo tanto un aumento de la coloración de las colonias en presencia de salicina, de 4-aminofenil-beta-glucósido, de 4-metil-umbeliferona o de esculina. Se observa también una homogeneización de la coloración para las cepas heterogéneas, en presencia de uno de estos compuestos. Para el medio que contiene esculina, se observa una fuerte difusión de la coloración negra en la gelosa, haciendo a veces difícil la lectura del medio.

5. Conclusión:

Este ensayo demuestra el efecto activador de la beta-glucosidasa de *C. difficile* por unos compuestos que poseen al menos un anillo aromático tales como la arbutina, la salicina, el 4-aminofenil-beta-glucósido, la 4-metil-umbeliferona

o la esculina.

Ejemplo 5: ensayo de 2 sustratos de beta-glucosidasa a base de ALDOL™ (ALDOL™ 455-beta-glucósido y ALDOL™ 484-beta-glucósido – BIOSYNTH)

5

1. Medio y microorganismos

10

Se han ensayado ocho cepas de *Clostridium difficile* sobre 4 medios diferentes, respectivamente un medio control de crecimiento (T), un medio (1) que contiene 75mg/l de ALDOL™ 455-beta-glucósido, un medio (2) que contiene 75mg/l de ALDOL™ 484-beta-glucósido, y un medio (3) que contiene CHE-b-glucósido a razón de 300mg/l y citrato de hierro amoniacal (300mg/l).

15

La composición de la base nutritiva común a todos los medios se indica a continuación. Se trata de la base chromID® *C. difficile* libre de citrato de hierro amoniacal pero suplementada con 1 g/l de arbutina.

Compuestos	Conc. en g/l
Extractos tisulares y celulares	12,5
Cloruro de sodio	6
Sulfato de magnesio	0,3
L-arginina	1
Bisulfito de sodio	0,1
Agar	13
Arbutina	1
Glucosa	0,2
TRIS	0,1
Taurocolato de sodio	2,5

20

Después de la fundición de los agares, la base se separa en 4*80 ml, repartidos en los frascos T, 1, 2 y 3. En el frasco 3, se habrán pesado previamente 300 mg/l de CHE-beta-glucósido y 300 mg/l de citrato de hierro amoniacal. Un ciclo de autoclave permite esterilizar los medios. Después del retorno de los medios en sobrefusión, los sustratos a base de ALDOL™ se añaden en aditivos, solubilizados en un disolvente de tipo DMSO (dimetilsulfóxido) a partir de una solución madre concentrada.

2. Ensayos

25

Los medios se distribuyen en cajas de Petri.

Se efectúa la inoculación a partir de pre-cultivos de 48h a 37°C en anaerobiosis.

30

Se realiza una suspensión en agua fisiológica a 0,5 McF, después las cepas son inoculadas con lazo calibrado de 10 µl según el método de las 3 esferas.

Se efectúan unas lecturas después de 24h de incubación a 37°C y en anaerobiosis. Los resultados se consignan a continuación.

35

3. Resultados

Tras la hidrólisis enzimática de los diversos sustratos por las cepas de *C. difficile*, las coloraciones de las colonias aisladas obtenidas sobre los medios 1, 2 y 3 son respectivamente amarillo, naranja y marrón.

40

Escala de lectura de la expresión de la actividad enzimática (intensidades de coloración)

* 0 = ninguna actividad

45

* 0,5 = coloración muy pálida

* 1 = coloración clara de baja intensidad

* 2 = coloración pura de intensidad media,

50

* 3 = presencia de una coloración intensa,

* 4 = presencia de una coloración muy intensa.

		T	1	2	3
<i>Clostridium difficile</i> 0801108	24h	0	3	4	2
<i>Clostridium difficile</i> 0801105	24h	0	3	3	4
<i>Clostridium difficile</i> 0801088	24h	0	3	4	4
<i>Clostridium difficile</i> 0801091	24h	0	3	4	3
<i>Clostridium difficile</i> 0801094	24h	0	3	3	3
<i>Clostridium difficile</i> 0603006	24h	0	2	3	2
<i>Clostridium difficile</i> 0801112	24h	0	3	3	4
<i>Clostridium difficile</i> 0801116	24h	0	3	3	4

4. Interpretación

5 Los sustratos ALDOL™ 455-beta-glucósido y ALDOL™484-beta-glucósido (BIOSYNTH) permiten una excelente detección de *C. difficile*. Las intensidades de coloraciones (amarillo y naranja respectivamente) obtenidas son elevadas a partir de 24h de incubación. Los rendimientos obtenidos con estos dos sustratos son sustancialmente idénticos a los obtenidos con CHE-beta-glucósido.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medio de reacción que comprende al menos un sustrato de beta-glucosidasa y un compuesto de fórmula Ar-beta-D-glucósido en la que Ar- designa un compuesto aromático, diferente de dicho sustrato y seleccionado entre la arbutina o hidroquinona-beta-D-glucopiranosido, el 4-metilumbeliferil-beta-glucósido, el 4-amino-beta-glucósido, la salicina o 2-(hidroximetil)fenil-beta-D-glucósido, a una concentración inferior a 5 g/l.
- 10 2. Medio de reacción según la reivindicación 1, en el que el compuesto Ar-beta-D-glucósido está a una concentración comprendida entre 0,3 y 1,5 g/l.
3. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el compuesto Ar-beta-D-glucósido es la arbutina.
- 15 4. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sustrato de beta-glucosidasa se selecciona entre el Alizarina-beta-glucósido, el Magenta-beta-glucósido (5-Bromo-6-cloro-3-indoxil-beta-glucósido), el DHF-beta-glucósido, el 3HF-beta-glucósido y el CHE-beta-glucósido (3,4-Ciclohexenoescuetina-beta-glucósido) y los ALDOL™ beta-glucósido.
- 20 5. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sustrato de beta-glucosidasa está a una concentración comprendida entre 25 y 1000 mg/l y más preferiblemente entre 50 y 400 mg/l.
6. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un activador de la germinación de las esporas de *Clostridium difficile*.
- 25 7. Medio de reacción según la reivindicación 6, en el que dicho activador de la germinación de las esporas de *Clostridium difficile* es el taurocolato de sodio.
8. Medio de reacción según la reivindicación 6 o 7, en el que el taurocolato de sodio está a una concentración comprendida entre 0,1 y 10 g/l, preferiblemente comprendida entre 1 y 5 g/l.
- 30 9. Procedimiento de detección y/o de identificación de *Clostridium difficile* que comprende las etapas que consisten en:
- 35 a) poner en contacto una muestra susceptible de contener *Clostridium difficile* con un medio de reacción que comprende al menos un sustrato de beta-glucosidasa y un compuesto de fórmula general Ar-beta-D-glucósido, diferente de dicho sustrato, en la que Ar- designa un compuesto aromático, seleccionado entre la arbutina o hidroquinona-beta-D-glucopiranosido, el 4-metilumbeliferil-beta-glucósido, el 4-aminofenil-beta-glucósido, la salicina o 2-(hidroximetil)fenil-beta-D-glucósido, a una concentración inferior a 5 g/l;
- 40 b) incubar en una atmósfera anaeróbica; y
- c) detectar la hidrólisis del sustrato de beta-glucosidasa, que indica la presencia de *Clostridium difficile*.
- 45 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el medio utilizado en la etapa a) es un medio según una de las reivindicaciones 1 a 8.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 o 10, en el que la incubación realizada en la etapa b) se realiza en anaerobiosis.
- 50 12. Utilización de la arbutina como activador de beta-glucosidasa en un medio de detección y/o de identificación de *Clostridium difficile*.