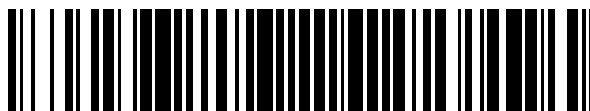


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 485**

51 Int. Cl.:

|                    |                            |           |
|--------------------|----------------------------|-----------|
| <b>C12Q 1/04</b>   | (2006.01) <b>A61B 5/20</b> | (2006.01) |
| <b>C12Q 1/02</b>   | (2006.01)                  |           |
| <b>A61K 51/12</b>  | (2006.01)                  |           |
| <b>G01N 33/497</b> | (2006.01)                  |           |
| <b>A61B 5/083</b>  | (2006.01)                  |           |
| <b>G01N 33/569</b> | (2006.01)                  |           |
| <b>G01N 33/60</b>  | (2006.01)                  |           |
| <b>G21H 5/02</b>   | (2006.01)                  |           |
| <b>A61B 5/08</b>   | (2006.01)                  |           |
| <b>A61B 5/145</b>  | (2006.01)                  |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2013** **PCT/US2013/063827**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014** **WO14058848**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013** **E 13845074 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 2906711**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico de infecciones bacterianas**

30 Prioridad:

**10.10.2012 US 201261711978 P**

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

**27.11.2018**

73 Titular/es:

**STC.UNM (100.0%)**  
**801 University Blvd. SE, Suite 101**  
**Albuquerque, NM 87106, US**

72 Inventor/es:

**TIMMINS, GRAHAM y**  
**SILKS, LOUIS, PETE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 691 485 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

Métodos para el diagnóstico de infecciones bacterianas

## 5 Estado de la técnica

Es importante detectar si un paciente tiene una infección bacteriana para proporcionar un tratamiento adecuado al paciente. A menudo, esta detección puede ser difícil debido a la localización de la infección, por ejemplo, en los pulmones o el tracto gastrointestinal. Se han notificado métodos para detectar la presencia de bacterias concretas midiendo las relaciones marcadas isotópicamente de los gases volátiles. Véase, por ejemplo, el documento U.S. 7.717.857, la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2012/0298868, y el documento PCT/US2013/029626. Pero siguen siendo necesarios métodos para detectar otras bacterias.

La infección epidémica con el patógeno intestinal *Clostridium difficile* (*C. diff.*) se está convirtiendo en muy importante en todo el planeta, especialmente en los Estados Unidos con estimaciones de que se produjeron 300.000 casos de enfermedades asociadas a *C. diff.* (CDAC) en 2005, y su incidencia sigue aumentando. McDonald, L.C., G.E. Killgore, A. Thompson, R. C. Owens, Jr., S.V. Kazakova, S.P. Sambol, S. Johnson, y D.N. Gerding, (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*, *N Engl J Med.* 353: 2433-2441; Zilberberg, M.D., A.F. Shorr, y M.H. Kollef, (2008) Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005, *Emerg Infect Dis.* 14: 929-931.

La infección por *C. diff.* da como resultado una enfermedad asociada a antibiótico, desde diarrea a la colitis pseudomembranosa potencialmente fatal. Se cree que cuando la microflora normal del intestino de los pacientes se altera por los tratamientos con antibióticos, esto permite que *C. diff.* prolifere y produzca enfermedades. *C. diff.* es también muy transmisible en hospitales o instalaciones de atención sanitaria prolongada y puede producir epidemias de infecciones. Además de su capacidad de generar toxinas que dañan al hospedador, *C. diff.* también puede fermentar p-hidroxifenilacetato, generado a partir de tirosina, a p-cresol. Se cree que esto proporciona a *C. diff.* una ventaja competitiva en el intestino por envenenamiento de otras especies. De hecho, las cepas epidémicas de *C. diff.* son productores eficaces de p-cresol.

Aunque están disponibles métodos para diagnosticar *C. diff.*, no son adecuados para estimar la carga bacteriana en un paciente para ayudar en un diagnóstico. Además, los métodos actualmente disponibles no son capaces de guiar el tratamiento. Por ejemplo, los intentos de utilizar la detección de cresol en heces como diagnóstico fallaron debido a problemas de sensibilidad. El patrón actual para el diagnóstico es un cultivo toxigénico, un ensayo caro basado en un cultivo que tarda 48 horas en proporcionar resultados. Carroll, K.C., Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: The next generation, *Anaerobe.* 17: 170-174. Se están desarrollando y ensayando numerosos inmunoensayos enzimáticos y técnicas basadas en la PCR, pero no está claro si pueden convertirse en la norma, o si se pueden utilizar en el seguimiento del tratamiento o la curación ya que ninguno de estos ensayos es cuantitativo.

El coste promedio de tratar cada caso de CDAC en los Estados Unidos está actualmente entre 9.000 dólares y 12.000 dólares. Además, la naturaleza muy transmisible de *C. diff.* en hospitales o instalaciones de atención sanitaria prolongada permite que aparezcan epidemias de infección y, por tanto, una detección rápida y un tratamiento eficaz son esenciales en el abordaje de *C. diff.* Por consiguiente, son deseables métodos y herramientas novedosos para el diagnóstico y el tratamiento de *C. diff.*

## Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método para determinar la presencia o ausencia de una infección por *C. diff.* en un paciente de acuerdo con la reivindicación 1 y el uso de tirosina marcada con  $^{13}\text{C}$  y/o ácido p-hidroxifenilacético marcado con  $^{13}\text{C}$  mediante administración oral para determinar la presencia o ausencia de una infección bacteriana por *Clostridium difficile* en una muestra de un paciente. ASATOOR ET AL, "The origin of urinary tyramine. Formation in tissues and by intestinal microorganisms", *CLINICA CHIMICA ACTA*, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 22, n.º 2, PÁGINAS 223 - 229, (19681001), y V De Preter ET AL, "The *in vivo* use of the stable isotope-labelled biomarkers lactose-[15 N]ureide and [2H4]tyrosine to assess the effects of pro-and prebiotics on the intestinal flora of healthy human volunteers", *British journal of nutrition*, (20040101), páginas 439 - 446, se refiere generalmente a la administración de  $^{14}\text{C}$ -tirosina a ratas y la administración de  $^2\text{H}_4$  tirosina a seres humanos. El documento WO2014062392 tiene una fecha de prioridad que precede a la fecha de presentación de la actual solicitud y a la fecha de publicación, que es posterior a la fecha de prioridad de la actual solicitud. El documento WO2014062392 se refiere a métodos de detectar infecciones en el pulmón, tracto gastrointestinal, e infecciones sistémicas midiendo las relaciones isotópicas de  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  del dióxido de carbono gaseoso en muestras de aliento exhalado de un sujeto tras la administración de un compuesto marcado isotópicamente con  $^{13}\text{C}$ .

JOSEPH ROMAGNUOLO ET AL, "Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation", *AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*, EE.UU., (20020501), vol. 97, n.º 5, PÁGINAS 1113-1126, describe el uso de ensayos de aliento para la detección de un crecimiento bacteriano en exceso, infección por *Helicobacter pylori*, intolerancia a la lactosa, mala absorción de bilis,

insuficiencia pancreática y disfunción hepática, en particular, el uso de tecnología de  $^{13}\text{C}$  para los ensayos de  $\text{CO}_2$  en aliento para detectar un crecimiento bacteriano en exceso, un síndrome clínico que implica la producción anómala de gas que se puede presentar como esteatorrea, anemia macrocítica o diarrea crónica y/o hinchazón. RICHARD S LORD ET AL, "Clinical Applications of Urinary Organic Acids. Parte 2. Dysbiosis Markers", ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW VOLUME NUMBER, (20080101), vol. 13, n.º 4, PÁGINAS 292 - 306, se refiere a tirosina y ácido p-hidroxifenilacético marcados isotópicamente, que supuestamente se divulgan como precursores metabólicos de p-cresol, y se centran exclusivamente en los marcadores de disbiosis que se pueden secretar en orina.

ASATOOR ET AL, "The origin of urinary tyramina. Formation in tissues and by intestinal microorganisms", CLINICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 22, n.º 2, PÁGINAS 223 - 229, (19681001), y V De Preter ET AL, "The *in vivo* use of the stable isotope-labelled biomarkers lactose-[ $^{15}\text{N}$ ]ureide and [ $^2\text{H}_4$ ]tyrosine to assess the effects of pro-and prebiotics on the intestinal flora of healthy human volunteers", British journal of nutrition, (20040101), páginas 439 - 446, se refiere generalmente a la administración de  $^{14}\text{C}$ -tirosina a ratas y la administración de  $^2\text{H}_4$  tirosina a seres humanos. El documento WO2014062392 tiene una fecha de prioridad que precede a la fecha de presentación de la actual solicitud y a la fecha de publicación, que es posterior a la fecha de prioridad de la actual solicitud. El documento WO2014062392 se refiere a métodos de detectar infecciones en el pulmón, tracto gastrointestinal, e infecciones sistémicas midiéndolas relaciones isotópicas de  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  del dióxido de carbono gaseoso en muestras de aliento exhalado de un sujeto tras la administración de un compuesto marcado isotópicamente con  $^{13}\text{C}$ .

JOSEPH ROMAGNUOLO ET AL, "Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation", AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, EE.UU., (20020501), vol. 97, n.º 5, PÁGINAS 1113-1126, describe el uso de ensayos de aliento para la detección de un crecimiento bacteriano en exceso, infección por *Helicobacter pylori*, intolerancia a la lactosa, mala absorción de bilis, insuficiencia pancreática y disfunción hepática, en particular, el uso de tecnología de  $^{13}\text{C}$  para los ensayos de  $\text{CO}_2$  en aliento para detectar un crecimiento bacteriano en exceso, un síndrome clínico que implica la producción anómala de gas que se puede presentar como esteatorrea, anemia macrocítica o diarrea crónica y/o hinchazón. RICHARD S LORD ET AL, "Clinical Applications of Urinary Organic Acids. Parte 2. Dysbiosis Markers", ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW VOLUME NUMBER, (20080101), vol. 13, n.º 4, PÁGINAS 292 - 306, se refiere a tirosina y ácido p-hidroxifenilacético marcados isotópicamente, que supuestamente se divulgan como precursores metabólicos de p-cresol, y se centran exclusivamente en los marcadores de disbiosis que se pueden secretar en orina.

El documento US4830010 se refiere a métodos para el diagnóstico de trastornos gastrointestinales en seres humanos o sujetos animales inferiores que comprende las etapas de administrar a dicho sujeto una cantidad segura y eficaz de urea y analizar el aliento de dicho sujeto para determinar la presencia de dióxido de carbono o productos de amoníaco de la hidrólisis de dicha urea, en el que la presencia de dichos productos de la hidrólisis es una indicación positiva de un trastorno gastrointestinal en dicho sujeto. Preferentemente, la urea administrada contiene nitrógeno o carbono marcados isotópicamente.

El documento US6264913 divulga un ensayo de aliento para evaluar el crecimiento bacteriano en exceso, que implica la administración de un sorbitol o derivado de sorbitol marcado isotópicamente a un sujeto y la medición de la marca en el aliento y/o la sangre.

El documento US4830010 se refiere a métodos para el diagnóstico de trastornos gastrointestinales en seres humanos o sujetos animales inferiores que comprende las etapas de administrar a dicho sujeto una cantidad segura y eficaz de urea y analizar el aliento de dicho sujeto para determinar la presencia de dióxido de carbono o productos de amoníaco de la hidrólisis de dicha urea, en el que la presencia de dichos productos de la hidrólisis es una indicación positiva de un trastorno gastrointestinal en dicho sujeto. Preferentemente, la urea administrada contiene nitrógeno o carbono marcados isotópicamente.

El documento US6264913 divulga un ensayo de aliento para evaluar el crecimiento bacteriano en exceso, que implica la administración de un sorbitol o derivado de sorbitol marcado isotópicamente a un sujeto y la medición de la marca en el aliento y/o la sangre.

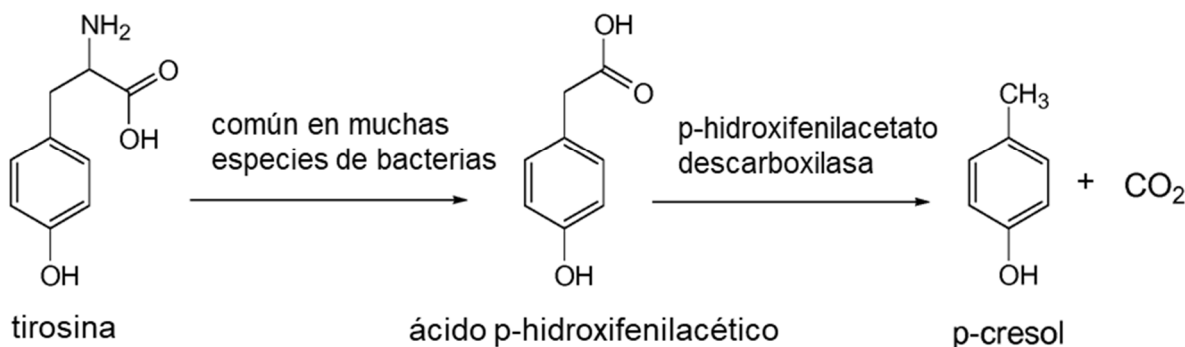
## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere un método para detectar infecciones por *C. diff.* en pacientes. En particular, el método de la invención puede utilizarse para detectar, diagnosticar, controlar, una infección por *C. diff.* Se administra al paciente una tirosina marcada isotópicamente o un ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente. Si el paciente está infectado con una bacteria que tiene una enzima p-hidroxifenilacetato decarboxilasa, la enzima convierte el compuesto marcado isotópicamente en un compuesto detectable, por ejemplo, dióxido de carbono marcado isotópicamente y/o p-cresol marcado isotópicamente. La comparación de la relación del dióxido de carbono marcado isotópicamente y/o el p-cresol marcado isotópicamente tras la administración con la relación del dióxido de carbono marcado isotópicamente y/o el p-cresol isotópicamente marcado antes de la administración permite la determinación de si el paciente tiene una infección. Este análisis puede proporcionar también información con respecto a la gravedad de la infección, así como el tipo de bacteria presente. La información con respecto a la

gravedad y el tipo de bacteria es útil en la determinación del ciclo de tratamiento para el paciente.

Una bacteria conocida en la técnica que tiene una enzima p-hidroxifenilacetato decarboxilasa es *C. diff.*, que puede fermentar el ácido p-hidroxifenilacético, un producto de degradación de la tirosina, a para-cresol usando la enzima p-hidroxifenilacetato decarboxilasa. Véase el Esquema 1.

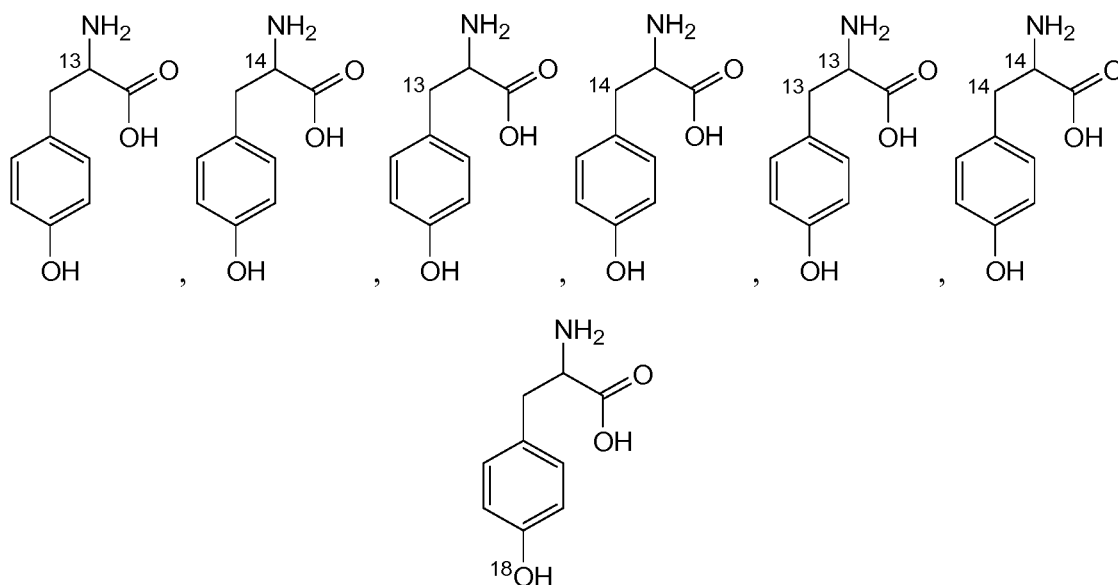
**Esquema 1**



A un paciente que tiene una infección bacteriana o que es sospechoso de tener una infección bacteriana, se administra estratégicamente, una tirosina o ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente. Los ejemplos de marcas isotópicas que se pueden usar en la invención incluyen una o más de <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, y <sup>18</sup>O. Como se usa en el presente documento, "marcado isotópicamente" se refiere a la presencia de un isótopo, por ejemplo, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, o <sup>18</sup>O, en un compuesto que está presente en una cantidad por encima de la abundancia natural.

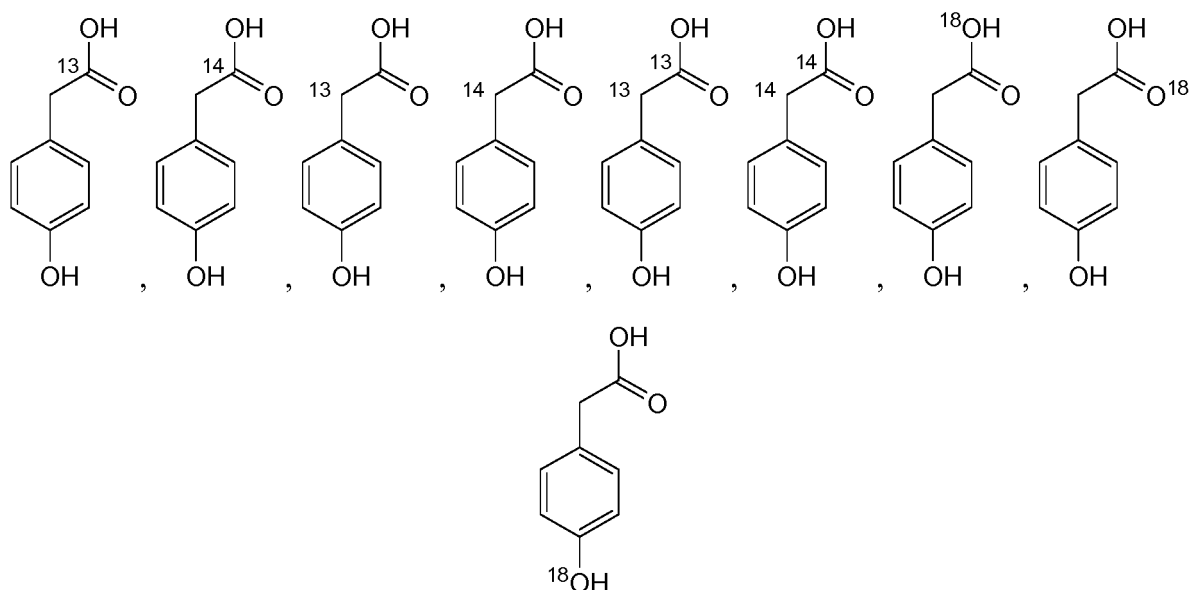
Administrando el compuesto marcado estratégicamente, la enzima bacteriana, si está presente, convertirá la tirosina marcada o el ácido p-hidroxifenilacético marcado a un compuesto diagnósticamente detectable, por ejemplo, p-cresol marcado isotópicamente o dióxido de carbono marcado isotópicamente. El dióxido de carbono marcado isotópicamente se puede detectar en, por ejemplo, el aliento del paciente. El p-cresol marcado isotópicamente se puede detectar en, por ejemplo, el aliento, la orina, y/o la sangre, preferentemente la orina y/o la sangre, del paciente.

Los ejemplos de compuestos de tirosina marcados isotópicamente incluyen:



En el alcance de la invención, se prefiere utilizar la forma L de la tirosina que se produce naturalmente. Pero la forma D, así como las mezclas de D y L-tirosina, están también comprendidas en el alcance de la invención.

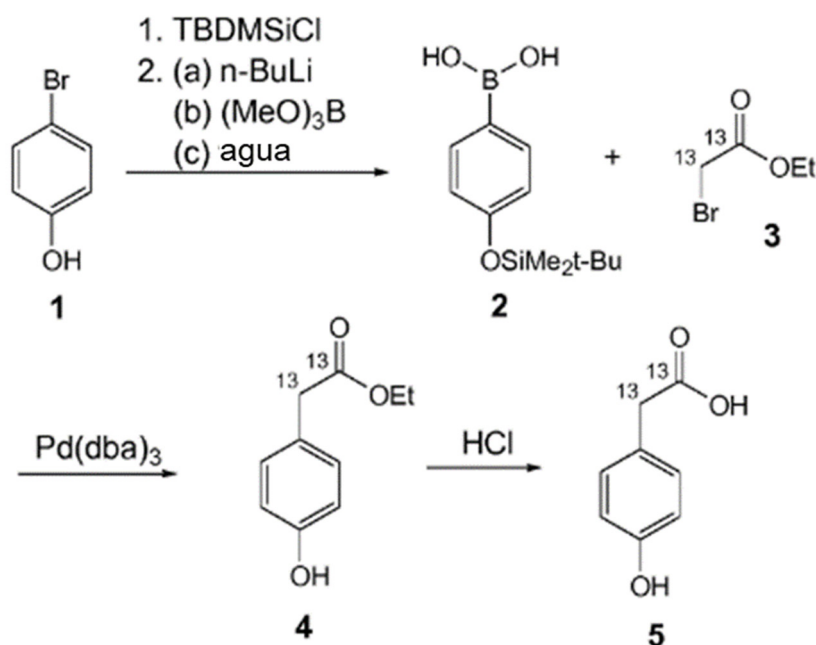
Los ejemplos de compuestos de ácido p-hidroxifenil acético marcados isotópicamente incluyen:



5 y corresponden a los ésteres de alquilo C<sub>1-6</sub> del ácido p-hidroxifenil acético. Como se usa en el presente documento, "alquilo C<sub>1-6</sub>" es un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *terc*-butilo, pentilo, y similares. Se incluyen también los grupos alquilo cíclicos. Los ejemplos de grupos cicloalquilo C<sub>1-6</sub> incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

10 Los compuestos marcados isotópicamente pueden adquirirse comercialmente o pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. En el Esquema 2 se muestra una preparación preferida de una realización.

Esquema 2

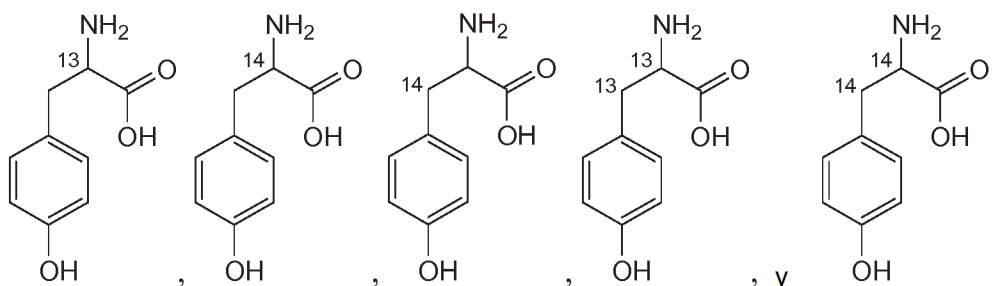


15 De acuerdo con el Esquema 2, el tratamiento de 4-bromo-fenol (1) con un grupo protector tal como un grupo protector de sililo, por ejemplo, t-butil-dimetilsililo (TBDMSi), dará lugar a un compuesto éter protegido. La transmetalación con, por ejemplo, *n*-butillitio, seguido de, por ejemplo, trimetil borato, proporciona el éster de borato resultante. El éster se hidroliza rápidamente en presencia de agua al ácido borónico correspondiente (2). El bromoacetato esterificado marcado 3 puede prepararse a escala molar a partir de <sup>13</sup>CO. El acoplamiento del bromoacetato de etilo con el ácido borónico se efectúa mediante, por ejemplo, un catalizador de paladio tal como

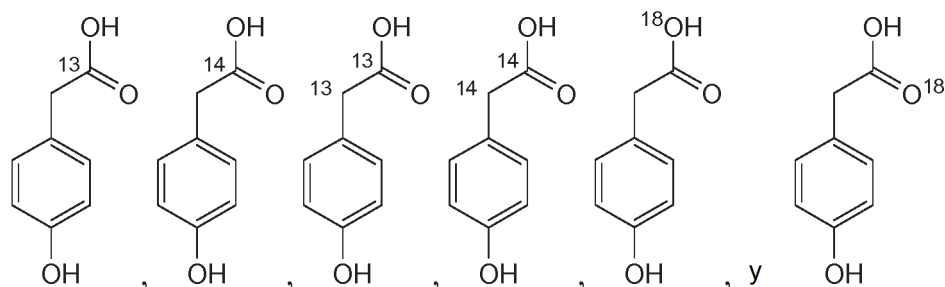
20

Pd(dba)<sub>3</sub>. El producto (4) se somete a continuación a, por ejemplo, tratamiento ácido para retirar el grupo protector de fenol y escindir el éster de etilo para dar 5. Una ventaja de esta ruta de síntesis es que todas las etapas son escalables, para permitir cientos de gramos de producto.

- 5 Se administra al paciente una tirosina marcada isotópicamente y/o ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente que produce dióxido de carbono marcado isotópicamente. En estos métodos, el dióxido de carbono marcado isotópicamente se detecta preferentemente en muestras de aliento del paciente tras la administración de la tiroxina marcada isotópicamente o el ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente.
- 10 Los ejemplos de tirosina marcada isotópicamente que producen dióxido de carbono marcado isotópicamente incluyen:



- 15 Los ejemplos de ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente que producen dióxido de carbono marcado isotópicamente incluyen:



- 20 Se puede administrar al paciente un compuesto marcado isotópicamente. Se puede administrar al paciente una mezcla de dos o más compuestos marcados isotópicamente.

La marca isotópica incorporada en los compuestos se guiará por el método diagnóstico que se va a emplear. Preferentemente, la marca isotópica es <sup>13</sup>C. En otras realizaciones, la marca isotópica es <sup>14</sup>C. En otras realizaciones

- 25 más, la marca isotópica es <sup>18</sup>O.

- El compuesto marcado isotópicamente que produce dióxido de carbono marcado isotópicamente tras la exposición a enzimas bacterianas se puede administrar al paciente usando cualquier medio conocido. En los métodos actuales, se puede actuar de forma indiferente del hecho de que la tirosina marcada isotópicamente o el ácido p-hidroxifenilacético se administre por vía oral o preferentemente, mediante una ruta de administración pulmonar (por ejemplo, intratraqueal, inhalación). En el caso de administración oral, la tirosina marcada isotópicamente o el ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente puede administrarse en una forma farmacéutica oral normalizada, preferentemente como una forma farmacéutica de liberación inmediata o como una forma farmacéutica entérica, junto con un transportador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La administración mediante inyección, es decir, inyección intramuscular, subcutánea, peritoneal, e intradérmica, puede ser también adecuada.

- En el alcance de la invención, una o más muestras de aliento exhaladas del paciente se pueden recoger antes de la administración de la tirosina isotópicamente marcada o el ácido p-hidroxifenilacético isotópicamente marcado. Dichas muestras se pueden usar como controles en los métodos de la invención.

- 40 Después de un periodo de tiempo tras la administración de la tirosina marcada isotópicamente o del ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente, se recogen una o más muestras de aliento exhalado del sujeto. Un "periodo de tiempo adecuado" se refiere al lapso de tiempo requerido para que el compuesto marcado

isotópicamente se convierta en dióxido de carbono por una enzima bacteriana. Preferentemente, las muestras se recogieron después de un plazo no superior a 40-70 minutos después de la administración.

Las muestras se pueden recoger en cualquier recipiente adecuado para contener muestras de aliento exhalado, por ejemplo, una bolsa o vial. También se pueden dirigir las muestras a un dispositivo de detección utilizando una boquilla adecuada. Se pueden exhalar también directamente las muestras en el dispositivo en que se recogen usando una cánula nasal desde un puerto adecuado en otro equipo respiratorio, por ejemplo, un ventilador.

Se analizaron las muestras para determinar la relación isotópica del dióxido de carbono marcado isotópicamente al dióxido de carbono no marcado isotópicamente, es decir,  $^{13}\text{CO}_2$  a  $^{12}\text{CO}_2$ , en las muestras. Preferentemente, al menos una mayoría de los alientos exhalados, y más preferentemente cada aliento exhalado, se muestrea durante un periodo de tiempo dado o hasta que la determinación del nivel de actividad ha alcanzado una precisión preestablecida. La relación de dióxido de carbono marcado isotópicamente a dióxido de carbono no marcado isotópicamente puede medirse utilizando cualquiera de los dispositivos conocidos en la técnica.

La relación de dióxido de carbono marcado isotópicamente a dióxido de carbono no marcado isotópicamente puede determinarse y compararse hasta una referencia predeterminada o un valor de control, determinado a partir del paciente antes de la administración de la tirosina marcada isotópicamente o del ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente. Una medición obtenida a partir del paciente que evidencia una relación por encima de la relación de referencia evidenciará la existencia de una infección por *C. diff*. Una medición de aproximadamente la relación de referencia evidenciará la ausencia de infección o la ausencia de *C. diff*. que tenga una enzima p-hidroxifenilacetato decarboxilasa.

Pueden tomarse numerosos alientos en diferentes momentos del paciente y generarse un gráfico o curva que muestre la relación del dióxido de carbono marcado isotópicamente al dióxido de carbono que se produce naturalmente en el aliento del paciente en función del tiempo. Una curva que muestra un aumento en la relación del dióxido de carbono marcado isotópicamente a dióxido de carbono no marcado isotópicamente en el tiempo, en comparación con un control sin infección, es una evidencia de una infección por *C. diff*. Las concentraciones de dióxido de carbono marcado isotópicamente en las muestras se comparan con una relación normalizada que puede obtenerse de un grupo de control no infectado, o más preferentemente, del paciente antes de la administración de la tirosina marcada isotópicamente o del ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente.

Una curva puede ajustarse a las concentraciones medidas y a continuación analizarse, determinando preferentemente la tasa de aumento de la curva, o mediante la magnitud de la meseta. Dicho análisis indica el nivel de actividad de las bacterias en el paciente, que se puede usar para diagnosticar la presencia de bacterias en el paciente.

El instrumento de medición utilizado en los métodos de la presente invención puede ser cualquier instrumento que puede medir cantidades de dióxido de carbono marcado isotópicamente y no marcado isotópicamente. Los instrumentos particularmente preferidos son espectrómetros de masas con analizadores de gases, espectrómetros de láser infrarrojo, y espectrómetros de masas con relación de isótopos. Estos instrumentos son bien conocidos en la técnica y son rápidos, precisos, y sensibles. Los ejemplos de espectrómetros infrarrojos preferidos se describen en el documento U.S. 5.063.275. Se describe un dispositivo particularmente preferido en la solicitud publicada de EE.UU. n.º 2012/0298868.

El instrumento de medición debe ser capaz de medir la concentración de dióxido de carbono marcado isotópicamente y no marcado isotópicamente de forma rápida. También, el instrumento de medición, o un dispositivo asociado, debe ser capaz de llevar a cabo el análisis asociado, incluyendo proporcionar una lectura, o en el caso donde se va a generar una curva, generando la curva y ajustando la curva y proporcionando el análisis de la curva. Dichos análisis se llevarán a cabo rápidamente. Preferentemente, el instrumento de medición, tanto solo como junto con el dispositivo asociado, debe ser capaz de medir la concentración del dióxido de carbono marcado isotópicamente y no marcado isotópicamente y llevar a cabo el análisis asociado en aproximadamente 1 minuto, preferentemente menos de 30 segundos, más preferentemente menos de aproximadamente 5 segundos.

Puede preferirse el ajuste y el análisis de una curva de las concentraciones medidas sobre las otras estrategias. La presente invención, sin embargo, permite obtener rápidamente muestras de aliento repetidas tanto en un periodo único de tiempo como en múltiples periodos de tiempo y a continuación maximiza la velocidad y la precisión del análisis proporcionando un número como punta de referencia (para el análisis del periodo de tiempo único) por encima del cual puede realizarse el diagnóstico de la infección activa o, en el caso de múltiples periodos de tiempo, ajustando los valores medidos a una curva, y a continuación calculando la tasa de aumento de la curva, que evidencia la infección y su intensidad.

Un método de análisis ilustrativo implica las siguientes etapas. Se recoge rápidamente una pluralidad de muestras de aliento exhalado, del orden de una muestra aproximadamente cada pocos segundos o así, preferentemente de tal manera que al menos una mayoría, y lo más preferible todos los alientos exhalados del sujeto en un momento predeterminado durante un(s) periodo(s) predeterminado se muestrean. A continuación, se mide la concentración de

dióxido de carbono y la concentración de un elemento marcado isotópicamente, tal como carbono-13 (en dióxido de carbono) se compara con su homólogo que se produce naturalmente (*por ejemplo* carbono-12 en dióxido de carbono) en el aliento del sujeto. Cuando la relación del elemento marcado isotópicamente al elemento que se produce naturalmente es aproximadamente 0 o aproximadamente una relación control (la relación control se basa en las mediciones tomadas en el sujeto antes de la administración de la tirosina marcada isotópicamente o del ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente), entonces, una infección por *C. diff.* como se describe en el presente documento no está presente en el paciente. En los casos donde la relación del elemento marcado isotópicamente al elemento que se produce naturalmente está por encima de un valor predeterminado (por ejemplo, establecida a partir de grupos control), las mediciones por encima del valor predeterminado y/o el aumento de la relación en función del tiempo, evidencian la existencia de una infección por *C. diff.* como se describe en el presente documento.

Aunque la medida y el análisis de los alientos exhalados de un sujeto durante un único periodo predeterminado representa una estrategia preferida para determinar la existencia o ausencia de una infección por *C. diff.*, se pueden usar también estrategias alternativas. En los casos donde se toman numerosas mediciones del aliento exhalado del sujeto en diferentes periodos, se puede ajustar o generar una curva de las concentraciones medidas. Si la relación permanece uniforme en el eje x (esencialmente 0 o próximo a 0 -basándose en el sujeto o en un grupo control-) en función del tiempo, puede descartarse la presencia de una infección por *C. diff.* como se describe en el presente documento. Se puede determinar la tasa de aumento de la curva calculando la integral o mediante derivación (cálculo de la derivada), preferentemente tras la medición de la concentración del(de los) producto(s) de escisión en cada muestra. El análisis de la curva indica el nivel de actividad bacteriana en el paciente. Un rápido aumento en las concentraciones medidas (una curva más pronunciada), evidenciaría un alto nivel de actividad bacteriana en el paciente, mientras que un aumento más lento en las concentraciones medidas (una curva menos pronunciada) evidenciaría un nivel más bajo de actividad de *C. diff.* Si la infección es sistémica, se requerirá un periodo de tiempo mayor para la absorción y distribución del compuesto marcado en el sitio de infección y la liberación del dióxido de carbono marcado. La técnica se demostrará también útil en el control de las respuestas de la infección a los fármacos. Si los fármacos son eficaces, entonces la carga bacteriana (medida como la tasa de aumento de gas marcado isotópicamente, o el valor de la meseta), continuará disminuyendo -si los fármacos son ineficaces debido a la resistencia, entonces esto no va a suceder y se utilizarán por tanto terapias con fármacos alternativos.

La estrategia de punto único (periodo de tiempo predeterminado) para el análisis diagnóstico tiene numerosas ventajas, por ejemplo, facilidad de uso y diagnóstico rápido. La invención proporciona también métodos diagnósticos que se pueden usar en una clínica o en una consulta de un médico. Se puede realizar un único cálculo tomando numerosas muestras de alientos exhalados del paciente o sujeto durante un periodo de tiempo predeterminado y analizando a continuación los gases marcados isotópicamente en la muestra, proporcionando una relación de dióxido de carbono marcado isotópicamente a dióxido de carbono no marcado isotópicamente y comparando la relación con una relación predeterminada obtenida del paciente o de un grupo control.

En otras estrategias, el cálculo de una derivada de un gráfico producido a partir de numerosas muestras recogidas (procedentes de periodos de tiempo variables) que proporcionan numerosos puntos de datos tiene ventajas sobre los métodos de análisis, tales como el cálculo de una integral. En primer lugar, el cálculo de la derivada no requiere obtener una muestra de aliento de referencia antes de que se administre al paciente tirosina marcada isotópicamente o ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente. ya que la derivada representa la tasa de aumento de las concentraciones medidas de dióxido de carbono, la concentración de partida del dióxido de carbono no es importante. Sin embargo, la concentración inicial de dióxido de carbono en la muestra de aliento de referencia es importante para el cálculo adecuado de la integral, ya que dicha concentración inicial representa un valor de fondo que debe sustraerse de las concentraciones medidas tras la administración de tirosina marcada isotópicamente o ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente.

Una vez que la medición resultante ha alcanzado un nivel predeterminado o después que ha transcurrido un periodo de tiempo predeterminado, no se recogen más muestras.

El presente método que utiliza un ensayo de aliento tiene numerosas ventajas, cuyos ejemplos se enumeran aquí. En primer lugar, el aliento exhalado del sujeto puede analizarse en tiempo real; es decir, existe un retraso relativamente pequeño entre el tiempo en que tiene lugar la actividad bacteriana, y el tiempo en el que se mide dicha actividad. En segundo lugar, las muestras de aliento exhalado se obtienen rápidamente y se analizan inmediatamente de una manera que aumenta sustancialmente la precisión de los resultados. dependiendo del método, se pueden obtener una o múltiples muestras. En general, una única muestra (procedentes de numerosos alientos exhalados) representa un método conveniente que presenta facilidad de uso y cumplimiento por parte del paciente. Por el contrario, obtener múltiples muestras del paciente aumenta la precisión del ensayo. Existe también menos error estadístico debido a que se recogen muchas muestras. Además, en este aspecto, debido a que las muestras se recogen preferentemente hasta que se alcanza un nivel de precisión preestablecido, se pueden eliminar prácticamente los resultados ambiguos, evitando la necesidad de repetir el ensayo.

Se puede llevar a cabo la lectura de las relaciones isotópicas mediante, por ejemplo, análisis de espectrometría de masas de gases sensibles y técnicas de espectroscopía de láser, que puede permitir dispositivos más compactos y portátiles. En determinados aspectos de la invención, se puede usar el espectrómetro de masas Finnegan Delta Plus

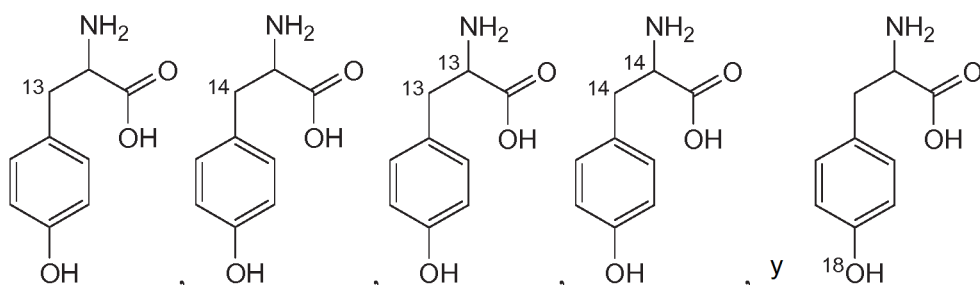


XL™. Se puede efectuar la recogida de gases exhalados utilizando una bolsa de recogida de gases normalizada, utilizando un vial de vidrio con un septo (el sujeto simplemente flota en el vial a través del septo) o usando cualquier otro método para recoger las muestras de aliento del sujeto.

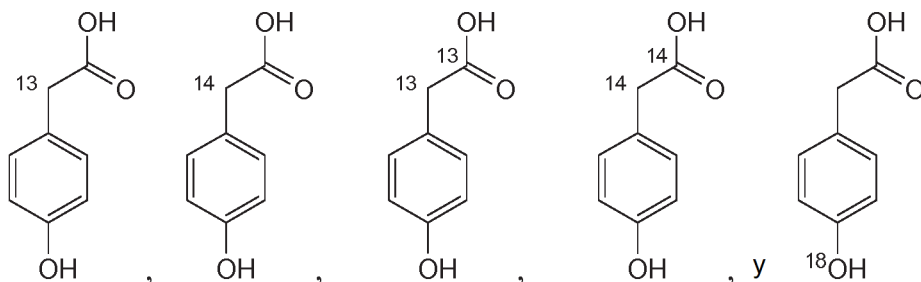
- 5 Es preferible que se administre al paciente una tirosina marcada isotópicamente o ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente que produce p-cresol marcado isotópicamente. En estos métodos, el p-cresol marcado isotópicamente se detecta preferentemente en el aliento, orina, y/o muestras de sangre del paciente tras la administración de la tirosina marcada isotópicamente o del ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente. Preferentemente, el p-cresol se detecta en la orina y/o muestra(s) de sangre del paciente.

10

Ejemplos de tirosina marcada isotópicamente que producen p-cresol marcado isotópicamente:



- 15 Ejemplos de ácido p-hidroxifenilacético que producen p-cresol marcado isotópicamente:



- 20 La marca isotópica se guiará según el método diagnóstico que se va a emplear. Preferentemente, la marca isotópica es  $^{13}\text{C}$ . En otras realizaciones, la marca isotópica es  $^{14}\text{C}$ . En otras realizaciones más, la marca isotópica es  $^{18}\text{O}$ .

- 25 Análogamente a los métodos descritos anteriormente para comparar la relación de dióxido de carbono marcado isotópicamente a dióxido de carbono no marcado isotópicamente, se puede comparar la relación de p-cresol marcado isotópicamente a p-cresol no marcado isotópicamente a fin de determinar si el paciente tiene una infección bacteriana tal como la que se describe en el presente documento.

- 30 Las formulaciones orales de los compuestos marcados isotópicamente en una forma farmacéutica entérica para promover la liberación en el intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon). Las composiciones farmacéuticas pueden ser formas farmacéuticas orales que comprenden cantidades eficaces de tirosina marcada isotópicamente y/o ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente con un vehículo, aditivo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, sobrecitos, cápsulas o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, diluyentes, aromatizantes, adyuvantes de dispersión, emulsionantes o aglutinantes. Es preferible que la tirosina marcada isotópicamente y/o el ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente se administre a los pulmones del sujeto
- 35 mediante administración pulmonar, por ejemplo, administración intratraqueal. Las composiciones farmacéuticas para la administración pulmonar se utilizan usualmente como inhalantes. las composiciones se pueden formar como inhalantes de polvo seco, suspensiones de inhalantes, soluciones inhalantes, inhalantes encapsulados y similares a formas conocidas de inhalantes. Dichas formas de inhalantes pueden prepararse introduciendo la composición farmacéutica en un inhalador adecuado tal como un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco, botella atomizadora, nebulizador etc., antes del uso. de las formas de inhalantes anteriores, pueden ser preferibles los inhalantes en polvo.
- 40

Cuando las composiciones farmacéuticas se pueden usar en forma de un polvo, el diámetro de partícula promedio

del polvo no está especialmente limitado, pero, a la vista de la residencia de las partículas en los pulmones, es preferible que las partículas se encuentren comprendidas en el intervalo de aproximadamente 0.1 a 20 µm, y particularmente aproximadamente 1 a 5 µm. Aunque la distribución del tamaño de partículas de la composición farmacéutica en polvo no está particularmente limitada, es preferible que las partículas que tienen un tamaño de aproximadamente 25 µm o más representen no más de aproximadamente el 5 % de las partículas, y preferentemente, 1 % o menos, para maximizar la administración en los pulmones del sujeto.

La composición farmacéutica en forma de un polvo puede producirse, por ejemplo, utilizando el método de micronización con secado, el método de secado por pulverización y la metodología farmacéutica normalizada bien conocidos en la técnica.

De acuerdo con el método de secado por pulverización, la composición farmacéutica en forma de un polvo puede prepararse secando una solución acuosa (o dispersión acuosa) que contiene el(los) compuesto(s) isotópicamente marcado(s) y los excipientes que proporcionan la liberación inmediata en el tejido pulmonar y la microparticulación del producto seco. indicado más específicamente, tras disolver (o dispersar) un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable en un medio acuoso, los compuestos marcados isotópicamente, en cantidades eficaces, se añaden y disuelven (o dispersan) mediante agitación, usando un homogeneizador, etc. para dar una solución acuosa (o dispersión acuosa). El medio acuoso puede ser agua sola o una mezcla de agua y un alcohol inferior. Los ejemplos de alcoholes inferiores utilizables incluyen metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol y alcoholes similares miscibles en agua. Es particularmente preferible el etanol. Después, la solución acuosa obtenida (o dispersión acuosa) se seca mediante un soplante, liofilización, etc., el producto resultante se pulveriza o microparticula en partículas finas usando molinos de chorro, molinos de bolas o dispositivos similares para dar un polvo que tiene el diámetro de partículas promedio anterior. En caso necesario, los aditivos, como se menciona anteriormente, pueden añadirse en cualquiera de las etapas anteriores.

De acuerdo con el método de secado por pulverización, la composición farmacéutica en forma de un polvo puede prepararse, por ejemplo, secando por pulverización una solución acuosa (o dispersión acuosa) que contiene el(los) compuesto(s) marcado(s) isotópicamente y los excipientes, aditivos o transportadores para la microparticulación. La solución acuosa (o dispersión acuosa) puede prepararse siguiendo el procedimiento del anterior método de micronización por secado. Se puede llevar a cabo el proceso de secado por pulverización utilizando un método conocido, proporcionando por tanto una composición farmacéutica en polvo en forma de partículas globulares con el diámetro de partículas promedio anteriormente mencionado.

Las suspensiones inhalantes, soluciones inhalantes, inhalantes encapsulados, etc. pueden prepararse también usando la composición farmacéutica en forma de un polvo producido mediante el método de micronización por secado, el método de secado por pulverización, o utilizado un transportador, aditivo o excipiente y compuestos marcados isotópicamente que se pueden administrar mediante los pulmones, de acuerdo con métodos de preparación conocidos.

Además, el inhalante que comprende la composición farmacéutica se puede usar como un aerosol. el aerosol puede prepararse, por ejemplo, introduciendo la composición farmacéutica y un propulsor en el recipiente de aerosol. En caso necesario, se pueden añadir dispersantes, disolventes y similares. Los aerosoles pueden prepararse como sistemas de 2 fases, sistemas de 3 fases y sistemas de diafragmas (recipientes dobles). El aerosol se puede utilizar en cualquier forma de un polvo, suspensión, solución o similar.

Ejemplos de propulsores utilizables incluyen propulsores de gas licuado, gases comprimidos y similares. Los propulsores de gas licuado utilizables incluyen, por ejemplo, hidrocarburos fluorados (por ejemplo, sustitutos de CFC tales como HCFC-22, HCFC-123, HFC-134a, HFC-227 y similares), petróleo licuado, dimetil éter y similares. Los gases comprimidos utilizables incluyen, por ejemplo, gases solubles (por ejemplo, dióxido de carbono, óxido nítrico), gases insolubles (por ejemplo, nitrógeno) y similares.

El dispersante y el disolvente pueden seleccionarse adecuadamente entre los aditivos mencionados anteriormente. el aerosol puede prepararse, por ejemplo, mediante un método en 2 etapas conocido que comprende la etapa de preparar la composición y la etapa de introducir y cerrar herméticamente la composición y el propulsor en el recipiente de aerosol.

Como una realización preferida del aerosol de acuerdo con el presente documento, puede mencionarse el siguiente aerosol: como propulsores, son preferibles hidrocarburos fluorados tales como HFC-134a, HFC-227 y sustitutos de CFC similares. Los ejemplos de disolventes utilizables incluyen agua, etanol, 2-propanol y similares. Son particularmente preferibles agua y etanol. En particular, se puede usar una relación en peso de agua a etanol en el intervalo de aproximadamente 0:1 a 10:1.

El aerosol contiene excipiente en una cantidad que varía desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10<sup>4</sup> % en peso (preferentemente aproximadamente 0,1 a 10<sup>3</sup> % en peso), propulsor en una cantidad de aproximadamente 10<sup>2</sup> a 10<sup>7</sup> % en peso (preferentemente aproximadamente 10<sup>3</sup> a 10<sup>6</sup> % en peso), disolvente en una cantidad de aproximadamente 0 a 10<sup>6</sup> % en peso (preferentemente aproximadamente 10 a 10<sup>5</sup> % en peso), y dispersante en una

cantidad de 0 a 10<sup>3</sup> % en peso (preferentemente aproximadamente 0,01 a 10<sup>2</sup> % en peso), con respecto al peso del(de los) compuesto(s) marcado(s) isotópicamente que está incluido en la composición final.

5 Las composiciones farmacéuticas son seguras y eficaces. Aunque la dosificación de la composición puede variar dependiendo del tipo de sustancia activa administrada así como la naturaleza (tamaño, peso, etc.) del paciente que se va a diagnosticar, la composición se administra en una cantidad eficaz para permitir que se escinda la sustancia farmacológicamente activa para escindir los productos que se van a medir. Por ejemplo, la composición se administra preferentemente de tal manera que el principio activo puede administrarse a un adulto humano en una dosis de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10 25 mg, aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 15 mg, aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg, y administrarse en una dosis única

15 La forma de la composición farmacéutica tal como un polvo, solución, suspensión etc. puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con el tipo de sustancia que se va a administrar y la acción de una enzima diana sobre la tirosina y/o el ácido p-hidroxifenilacético.

20 Como una ruta de administración, es usualmente preferible la inhalación directa mediante la boca usando un inhalador. Debido a que la composición farmacéutica permite la administración local directa en las vías aéreas y en particular, directamente al tejido pulmonar, la sustancia activa contenida en el anterior produce efectos inmediatos. Además, la composición se formula como un producto de liberación inmediata de tal manera que la escisión y el análisis pueden comenzar tan pronto como sea posible tras la administración.

25 Las composiciones pueden también administrarse por vía intravenosa. El extracto aislado exento de células de *C. difficile* contiene 12 mU por mg de proteína de la enzima de activación pHPA decarboxilasa. Esto se correlaciona con la producción de 2. 7 ml de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> por minuto en una infección en la que están presentes 10 mg de proteína bacteriana cuando un paciente se trata con un compuesto citado, por ejemplo, <sup>13</sup>C-hidroxifenilacetato. A menudo, un paciente se infecta con mucho más de 10 mg de proteína bacteriana con una infección por *C. difficile*.

30 Suponiendo que se respira 15 litros de aire por minuto, y con 4 % CO<sub>2</sub> exhalado, un paciente exhalará aproximadamente 600 ml de CO<sub>2</sub> por minuto, de los cuales aproximadamente 6,6 ml serán de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>. la excreción eficaz de *C. difficile* derivó 2,7 ml de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> en esta muestra aumentará significativamente el <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> del aliento, permitiendo la detección. Por lo tanto, es importante la administración eficaz de un compuesto marcado isotópicamente. Preferentemente, se administra al paciente una forma farmacéutica intravenosa, que conduce a un rápido aumento en los niveles intestinales, y que permite el ensayo del aliento de 10 a 120 minutos tras una dosificación. Dichas formas farmacéuticas son estériles y exentas de partículas. Se conocen en la técnica los métodos de preparación de dichas formas farmacéuticas.

40 Se apreciará que los compuestos descritos en el presente documento pueden ser adecuados para su uso también para otros tipos de infecciones o enfermedades. Por ejemplo, la importancia de p-cresol como una toxina urémica cuando se deriva de la degradación de hidroxifenilacetato en la enfermedad renal, indica que el p-hidroxifenilacetato marcado con <sup>13</sup>C puede ser también una herramienta diagnóstica viable para la enfermedad renal. De Smet, R. et al. Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis Clin Chem 49, 470-8 (2003).

45 Los métodos y procesos descritos ilustrativamente en el presente documento pueden practicarse de forma adecuada en diferentes órdenes de etapas, y que no están restringidos necesariamente a los órdenes de etapas indicados en el presente documento o en las reivindicaciones.

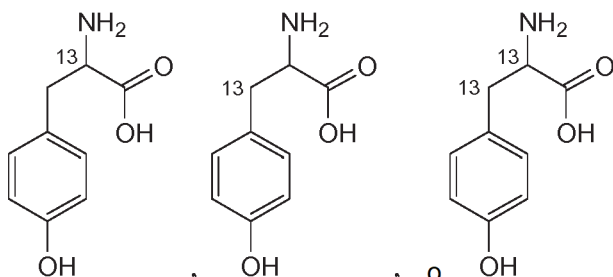
## Referencias

- 50 1. McDonald, L.C., G.E. Killgore, A. Thompson, R. C. Owens, Jr., S.V. Kazakova, S.P. Sambol, S. Johnson, y D.N. Gerding, (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*, *N Engl J Med*. 353: 2433-2441.
2. Zilberberg, M.D., A.F. Shorr, y M.H. Kollef, (2008) Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005, *Emerg Infect Dis*. 14: 929-931.
- 55 3. McGlone, S.M., R. R. Bailey, S.M. Zimmer, M.J. Popovich, Y. Tian, P. Ufberg, R. R. Muder, y B.Y. Lee, The economic burden of *Clostridium difficile*, *Clin Microbiol Infect*.
4. Carroll, K.C., Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: The next generation, *Anaerobe*. 17: 170-174.
5. Jassal, M.S., G.G. Nedelchev, J.H. Lee, S.W. Choi, V. Atudorei, Z.D. Sharp, V. Deretic, G.S. Timmins, y W.R. Bishai, <sup>13</sup>C-urea breath test as a novel point-of-care biomarker for tuberculosis treatment and diagnosis, *PLoS One*.
- 60 5: e12451.
6. Dawson, L.F., E.H. Donahue, S.T. Cartman, R.H. Barton, J. Bundy, R. McNerney, N.P. Minton, y B.W. Wren, The analysis of para-cresol production and tolerance in *Clostridium difficile* 027 and 012 strains, *BMC Microbiol*. 11: 86.
7. Dawson, L.F., R.A. Stabler, y B.W. Wren, (2008) Assessing the role of p-cresol tolerance in *Clostridium difficile*, *J Med Microbiol*. 57: 745-749.
- 65 8. Phua, T.J., T.R. Rogers, y A.P. Pallett, (1984) Prospective study of *Clostridium difficile* colonization and paracresol detection in the stools of babies on a special care unit, *J Hyg (Lond)*. 93: 17-25.

9. Peng, A-Y.; Wang, J-P.; Cheng, J.; Zie, X-M., Zhang, Z. Tetrahedron, 2010, 66, 8238.
10. De Smet, R. et al. Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis Clin Chem 49, 470-8 (2003).

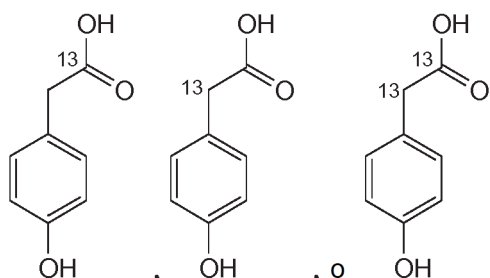
# REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia o ausencia de una infección bacteriana por *Clostridium difficile* en un paciente que comprende: determinar la cantidad de dióxido de carbono marcado isotópicamente y/o un para-cresol marcado isotópicamente en una o más muestras recogidas de un paciente a quien se ha administrado una cantidad diagnósticamente eficaz de una tirosina marcada isotópicamente y/o un ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente; indicando dicha cantidad de dióxido de carbono marcado isotópicamente y/o un para-cresol marcado isotópicamente la presencia o ausencia de la infección bacteriana por *Clostridium difficile* en el paciente.
2. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la tirosina marcada isotópicamente y/o el ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente está marcado con  $^{13}\text{C}$ .
3. El método de la reivindicación 2, en el que la tirosina marcada isotópicamente es



15

4. El método de la reivindicación 2, en el que el ácido p-hidroxifenilacético marcado isotópicamente es



20

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las muestras son muestras de aliento.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se ha administrado al paciente una tirosina marcada con  $^{13}\text{C}$  y/o ácido marcado con  $^{13}\text{C}$  y el análisis comprende determinar la cantidad de  $^{13}\text{CO}_2$  en una o más muestras de aliento del paciente.
7. Uso de tirosina marcada con  $^{13}\text{C}$  y/o ácido p-hidroxifenilacético marcado con  $^{13}\text{C}$  mediante administración oral para determinar la presencia o ausencia de una infección bacteriana por *Clostridium difficile* en una muestra de un paciente.

25