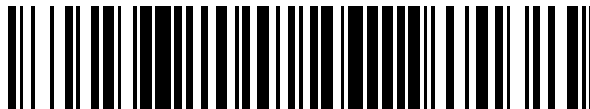


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 137**

21 Número de solicitud: 201330990

51 Int. Cl.:

C12Q 1/32 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.07.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.01.2015

71 Solicitantes:

CERTEST BIOTEC, S.L. (100.0%)
Pol. Ind. Río Gállego II Calle J nº 1
50840 San Mateo de Gallego (Zaragoza) ES

72 Inventor/es:

GENZOR ASÍN, Carlos Gustavo;
LANDETA ELORZ, Óscar;
VELASCO MICHELENA, Beatriz y
CARTAGENA LIROLA, Hugo

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Dispositivo para el diagnóstico de infección por Clostridium difficile**

57 Resumen:

Dispositivo para el diagnóstico de infección por Clostridium difficile.

La presente invención pertenece al campo de la detección de Clostridium difficile. En concreto, se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico para la detección de Clostridium difficile mediante la detección simultánea y diferenciada de glutamato deshidrogenasa, de Toxina A y Toxina B de Clostridium difficile.

ES 2 526 137 A1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para el diagnóstico de infección por *Clostridium difficile*

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico de infección por *Clostridium difficile*. En concreto, se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico para la detección simultánea y diferenciada de la glutamato deshidrogenasa, Toxina A y Toxina B de *Clostridium difficile*.

Antecedentes de la invención

Clostridium difficile, un bacilo anaerobio grampositivo, es el principal agente causante de diarrea, colitis y colitis pseudomembranosa asociada a la toma de antibióticos y es uno de los patógenos entéricos más frecuentemente identificado en pacientes hospitalizados.

Los antibióticos pueden predisponer al animal huésped a la colitis pseudomembranosa y otras enfermedades relacionadas con *C. difficile*, debido a que alteran la microflora intestinal, la cual normalmente inhibe el crecimiento de *C. difficile*, generando las condiciones para que *C. difficile* germine, colonice la superficie colónica y secrete toxinas.

La alta frecuencia de infecciones por *C. difficile*, unida a la mala evolución clínica de los casos no tratados con prontitud, hacen necesaria la existencia de tests tanto para detectar de manera rápida, sencilla y precisa la infección por *C. difficile* como para determinar si el *C. difficile* presente es toxigénico o no y para evaluar la efectividad de un tratamiento contra *C. difficile*.

Existen cepas de *C. difficile* toxigénicas (que producen toxinas) y no toxigénicas (que no producen toxinas). Las dos toxinas principales producidas por *C. difficile* son la Toxina A (TcdA) y la Toxina B (TcdB). Únicamente las cepas toxigénicas, ya sean $TcdA^+ TcdB^-$, $TcdA^- TcdB^+$ o $TcdA^+ TcdB^+$, causan las enfermedades relacionadas con *C. difficile*, es decir, son cepas patogénicas. Las cepas no toxigénicas de *C. difficile* son generalmente consideradas clínicamente insignificante, mientras que las cepas toxigénicas pueden ser letales. Aunque

la distinción entre cepas de *C. difficile* toxigénicas y no toxigénicas es, pues, de vital importancia, ninguno de los ensayos hasta ahora utilizados supone un método ideal para el diagnóstico de una enfermedad asociada a *Clostridium difficile*. Los métodos comunmente utilizados para diagnosticar una infección causada por *Clostridium difficile* son, además de un cuadro clínico compatible, los siguientes:

- 5 - Cultivo y aislamiento a partir de muestras de heces. Este método requiere condiciones anaerobias y es muy lento y costoso. Además, es un método que no tiene una alta sensibilidad, aunque permite hacer test de susceptibilidad a antibióticos de cara a un posible tratamiento.
- 10 - Citotoxicidad en cultivo celular. Este método es considerado el método de referencia. Presenta una especificidad y sensibilidad cercanas al 100 %. Sin embargo, es una técnica lenta (más de dos días), costosa (cultivo celular) y requiere personal muy especializado.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es un método específico y sensible que además permite distinguir distintas variantes. Sin embargo, es caro, necesita de personal 15 especializado y equipamiento sofisticado.
- Enzimoimmunoensayos en placa (ELISA). Detectan la presencia de las Toxinas A y B juntas o por separado. La detección de toxinas mediante métodos inmunológicos adolece de falta de sensibilidad por la a menudo baja concentración de toxinas en las muestras fecales. Para superar el problema de la baja sensibilidad se ha propuesto su utilización combinada 20 con la detección de la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* (GDH), que presenta una buena sensibilidad y especificidad aunque no es capaz de distinguir en un único ensayo entre cepas patógenas (toxigénicas) y no patógenas (no toxigénicas) (EP 1019724 B1). Los enzimoimmunoensayos en placa a pesar de ser más baratos que los ensayos por PCR son largos y complejos de llevar a cabo y necesitan equipamiento y personal especializado para su ejecución.
- 25 - Enzimoimmunoensayos en membrana. Presentan la ventaja, respecto a los inmunoensayos en placa, de ser más sencillos y no necesitar equipamiento adicional para su ejecución. Un ejemplo es el C. DIFF QUIK CHEK (Techlab, Inc., Blacksburg, VA USA) que, además, combina la detección de GDH con las Toxinas A y B, pero no es capaz de distinguir entre 30 ellas, es decir, no diferencia si es positivo o negativo para TcdA o para TcdB por separado.
- Inmunocromatografía. Los test inmunocromatográficos (IC) son rápidos, baratos y fáciles de llevar a cabo. En comparación con los enzimoimmunoensayos en membrana son mucho más fáciles de ejecutar puesto que no llevan reactivos asociados, son más rápidos (10 min frente a 30 min.) y no necesitan conservarse en refrigeración. Existen en el mercado varios tipos

de test IC: los que detectan las toxinas A y/o B, como *DUO Toxin A and B* (de Vedalab) y *STICK 2A-BDIFF / SIMPLE 2A-BDIFF* (de Operon), que adolecen de la misma falta de sensibilidad que el ELISA por la, a menudo, extremadamente baja concentración fecal de Toxinas A y/o B. Existen también IC que detectan la GDH como el *ImmunoQuick C. difficile*
5 *GDH* (de Biosynex). Los test que detectan solo GDH presentan una gran sensibilidad pero no dan información acerca de la presencia de toxinas.

En los métodos descritos anteriormente, se realiza un determinado ensayo para GDH y otro para TcdA y TcdB, lo que supone la preparación de muestras distintas y la realización de
10 ensayos distintos. Esto, además de requerir más tiempo, implica un mayor número de manipulaciones con el inherente riesgo de error de que los resultados obtenidos para los dos parámetros no se correlacionen directamente puesto que provienen de dos muestras o técnicas diferentes.

15 Teniendo en cuenta todo lo anterior, los autores de la presente invención, han desarrollado un dispositivo inmunocromatográfico para la detección de *C. difficile* que, sorprendentemente, permite diferenciar entre cepas de *C. difficile* patogénicas y no, y dentro de las primeras entre cepas *TcdA⁺ TcdB⁻*, *TcdA⁻ TcdB⁺* o *TcdA⁺ TcdB⁺*. Además, permite la detección simultánea de GDH, TcdA y TcdB mediante la preparación de una única muestra
20 lo que disminuye el número de manipulaciones y el riesgo de error en los resultados. La presente invención, proporciona así un método de diagnóstico de infección causada por *C. difficile*, basado en la utilización de dicho dispositivo inmunocromatográfico, rápido, sencillo y de fácil interpretación.

25 **Objeto de la invención**

Un aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar *C. difficile* (dispositivo de la invención) caracterizado por que comprende tres tiras inmunocromatográficas:

30 A) una tira (8') para detectar la glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-GDH (2') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-GDH (4') inmovilizado, y
- un segundo material absorbente (6);

B) una tira (8'') para detectar la Toxina A de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:

- 5
- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-toxina A (2'') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-toxina A (4'') inmovilizado, y

- 10
- un segundo material absorbente (6);

C) una tira (8''') para detectar la Toxina B de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:

- 15
- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-toxina B (2''') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-toxina B (4''') inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6).

20 En otro aspecto, se refiere al uso del dispositivo de la invención para el diagnóstico de infección por *C. difficile*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de infección por *C. difficile* (método de diagnóstico de la invención) que comprende las siguientes etapas:

- 25
- a) tomar una muestra biológica,
 - b) dispersar la muestra biológica tomada en la etapa a) en un diluyente,
 - c) aplicar la dispersión obtenida en la etapa b) en la zona de aplicación de la muestra (1) de las tiras del dispositivo inmunocromatográfico de la invención, y
 - d) esperar a la aparición de inmunocomplejos en la membrana porosa (3).

30

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico de infección por *C. difficile* que comprende el dispositivo de la invención.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1:** Vistas del dispositivo de diagnóstico. **A:** Vista en perspectiva de una tira inmunocromatográfica (8), que comprende, en el sentido del flujo, los siguientes elementos:
- 5 un lugar de aplicación de la muestra (1), un lugar en el que se han depositado micropartículas conjugadas con un anticuerpo específico para el marcador de interés a detectar (2), una membrana porosa (3) con una línea de test para la detección del marcador de interés (4) y con una línea control (5), y un material absorbente (6), y está situada sobre un soporte plástico (7). **B:** Vista en planta superior del dispositivo de diagnóstico con tres
- 10 tiras inmunocromatográficas (8', 8'', 8'''). **C:** Vista en planta superior del dispositivo de diagnóstico de la Fig. 1B introducido en una carcasa (11) que tiene una ventana de aplicación de la muestra (9) y una ventana de resultados (10) para cada tira inmunocromatográfica.
- 15 **Figura 2:** Representación gráfica de las etapas del método de diagnóstico desde la toma de muestra hasta la aplicación de la muestra en el dispositivo inmunocromatográfico de diagnóstico.

Descripción detallada de la invención

- 20 Un aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar *C. difficile* (dispositivo de la invención) caracterizado por que comprende tres tiras inmunocromatográficas:
- A) una tira (8') para detectar la glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile* que
- 25 comprende, en el sentido del flujo:
- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-GDH (2') depositadas sobre dicho primer material absorbente,
 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-GDH (4') inmovilizado, y
 - 30 - un segundo material absorbente (6);
- B) una tira (8'') para detectar la Toxina A de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:
- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-toxina

A (2'') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-toxina A (4'')

inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6);

5 C) una tira (8''') para detectar la Toxina B de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-toxina B (2''') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

10 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-toxina B (4''') inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6).

Los materiales absorbentes primero y segundo (1, 6) y la membrana porosa (3) utilizados en
15 las tiras inmunocromatográficas son los generalmente utilizados en los ensayos inmunocromatográficos y son conocidos por el experto en la materia. En una realización particular, el primer material absorbente (*sample pad*) se selecciona del grupo formado por fibra de vidrio, celulosa y poliéster. En otra realización particular, la membrana porosa (3) es nitrocelulosa. En otra realización particular, el segundo material absorbente (*absorbent pad*)
20 es celulosa.

Los anticuerpos anti-GDH, anti-Toxina A y anti-Toxina B pueden ser comerciales o producirse mediante técnicas del ADN recombinante conocidas por el experto en la materia. Así, por ejemplo, métodos de producción de anticuerpos anti-GDH, anti-TcdA y anti-TcdB
25 aparecen descritos en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 2 de la presente solicitud. Métodos para la producción de anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B se describen también en, por ejemplo, Lyerly *et al.* (Lyerly DM, Phelps CJ, Toth J y Wilkins TD, *Characterization of toxins A and B of C. difficile with monoclonal antibodies*, Infection and Immunity 1986, 54(1):70).

30 Para la detección de GDH, el primer y segundo anticuerpo pueden ser el mismo o diferentes y pueden ser policlonales o monoclonales. En una realización particular del dispositivo de la invención, para la detección de GDH el anticuerpo primero y el anticuerpo segundo son el mismo anticuerpo policlonal o monoclonal, siendo en una realización más particular el mismo anticuerpo monoclonal.

Para la detección de las toxinas, el primer y segundo anticuerpo pueden ser el mismo o diferentes. Si son el mismo anticuerpo es un anticuerpo policlonal y si son diferentes son monoclonales cooperantes o un primer anticuerpo policlonal y un segundo anticuerpo monoclonal. En los términos de la presente invención se entiende por anticuerpos monoclonales cooperantes aquellos anticuerpos monoclonales que pueden unirse simultáneamente al mismo antígeno, ya que reconocen epítomos diferentes (separados) de dicho antígeno. En una realización particular los anticuerpos anti-toxina primero y segundo son un mismo anticuerpo policlonal o dos distintos monoclonales cooperantes. En una realización más particular, el primer y segundo anticuerpo anti-toxina A son distintos y son anticuerpos monoclonales cooperantes y el primer y segundo anticuerpo anti-toxina B son distintos y son anticuerpos monoclonales cooperantes.

En una realización particular del dispositivo de la invención, los anticuerpos utilizados son el anticuerpo monoclonal GD10 para la detección de GDH (Ejemplo 1), los anticuerpos monoclonales cooperantes TA1 y TA2 para la detección de TcdA (Ejemplo 2) y los anticuerpos monoclonales cooperantes TB3 y TB6 para la detección de TcdB (Ejemplo 2).

Con los anticuerpos específicos anti-GDH, anti-Toxina A y anti-Toxina B, se preparan, por separado, conjugados con micropartículas mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Las micropartículas utilizables para la realización de inmunoensayos cromatográficos son conocidas por el experto en la materia. En una realización particular la micropartícula se selecciona del grupo formado por micropartículas de poliestireno, micropartículas de carbono, oro coloidal, selenio coloidal. En una realización más particular, las micropartículas son de poliestireno.

Las micropartículas conjugadas con los distintos anticuerpos (anti-GDH, anti-TcdA, anti-TcdB) actúan como fase móvil (Fig. 1A, (2)). Los anticuerpos inmovilizados sobre la membrana porosa (3) actúan como fase fija (Fig. 1A, (4)), donde se produce la captura inmunológica por separado de GDH, de TcdA y de TcdB de *C. difficile* (tiras 8', 8'', 8''', respectivamente, Fig.1B).

Para que la visualización del resultado obtenido con el dispositivo de la invención, es decir, de los inmunocomplejos (complejos antígeno-anticuerpo) obtenidos tras la captura inmunológica sobre la membrana porosa (3), sea fácil y sencilla, las micropartículas de la

presente invención están marcadas de manera que su visualización no requiera reactivos adicionales (no sea, por ejemplo, un inmunoensayo ligado a enzima). Así, en una realización particular, las micropartículas son micropartículas coloreadas, en particular micropartículas de poliestireno coloreadas. Se puede utilizar el mismo color para GDH, TcdA y TcdB ya que se detectan en tiras inmunocromatográficas distintas.

Para tener certeza de que el dispositivo de la invención ha funcionado correctamente es preferible incluir un control interno positivo de la formación de inmunocomplejos sobre la membrana porosa (3). Cualquier combinación antígeno-anticuerpo específica, conocida por el experto en la materia, es adecuada como control interno positivo. Así, en una realización particular, se incluye un control positivo en cada tira inmunocromatográfica del dispositivo de la invención, para ello, junto con las micropartículas conjugadas con los distintos anticuerpos (anti-GDH, anti-TcdA, anti-TcdB) se depositan micropartículas conjugadas con una proteína específica (proteína control) y en la membrana porosa (3) se inmovilizan los anticuerpos anti-proteína específica (5) por separado de los anticuerpos anti-GDH, anti-TcdA o anti-TcdB. Al igual que las micropartículas conjugadas con anticuerpos específicos para los marcadores GDH, TcdA y TcdB, las micropartículas utilizables para formar las micropartículas conjugadas con la proteína control son conocidas por el experto en la materia, seleccionándose, en una realización particular, del grupo formado por micropartículas de poliestireno, micropartículas de carbono, oro coloidal, selenio coloidal. En una realización más particular, las micropartículas son de poliestireno. En una realización particular, las micropartículas son micropartículas marcadas, en particular, micropartículas coloreadas, que pueden ser de colores diferente o del mismo color que las micropartículas específicas de GDH, TcdA y TcdB, ya que los anticuerpos específicos anti-GDH (4'), anti-TcdA (4'') y anti-TcdB (4''') se inmovilizan en la membrana porosa (3), cada uno en su tira inmunocromatográfica, separadamente de los anticuerpos anti-proteína control (5). En una realización particular, para facilitar la interpretación del resultado, las micropartículas de la línea control tienen un color distinto a las micropartículas de la línea de test.

En una realización particular, la proteína control es estreptavidina, así, las micropartículas tienen estreptavidina en la superficie y los anticuerpos inmovilizados son anticuerpos anti-estreptavidina.

En una realización particular, los anticuerpos anti-GDH, anti-TcdA, anti-TcdB y los

anticuerpos anti-proteína control que se inmovilizan en la membrana porosa (3) se inmovilizan en forma de línea (línea control (5), línea de test (4', 4'', 4''')). En una realización particular, cada conjunto de elementos 1-6 para la detección de GDH, TcdA o TcdB es dispuesto sobre un soporte plástico (7) en forma de tira.

5

Con el dispositivo inmucromatográfico de la presente invención se determina de manera simultánea y diferenciada la presencia de GDH, TcdA y TcdB, consiguiéndose así reducir el tiempo de ensayo y el número de manipulaciones, reduciéndose así el riesgo de error. Además, se obtiene información más detallada (tipo de toxina expresada) de la cepa de *C.*

10 *difficile* causante de la infección.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de infección por *C. difficile* (método de diagnóstico de la invención) que comprende las siguientes etapas:

- a) tomar una muestra biológica,
- 15 b) dispersar la muestra biológica tomada en la etapa a) en un diluyente,
- c) aplicar la dispersión obtenida en la etapa b) en la zona de aplicación de la muestra (1) de las tiras del dispositivo inmunocromatográfico de la invención, y
- d) esperar a la aparición de inmunocomplejos en la membrana porosa (3).

20 En una realización particular de la invención, en la etapa a) la muestra biológica es una muestra fecal, en particular la muestra fecal se selecciona del grupo formado por heces y cultivos o coprocultivos en medios de enriquecimiento ya sean selectivos o no y se realicen en medio líquido o semisólido (agar). En una realización más particular, la muestra fecal son heces. En una realización particular el cultivo o coprocultivo de las heces se realiza en
25 medios selectivos como el agar fructosa-cicloserina-cefoxitina (CCFA) o el agar yema de huevo-cicloserina-cefoxitina (CCEY). En otra realización particular, el cultivo o coprocultivo de las heces se realiza en medios no selectivos, como el agar sangre para anaerobios, con un pretratamiento de las heces con alcohol absoluto durante 30-60 minutos o mediante choque térmico a 80°C durante 10 minutos. Tras 24-48 horas de incubación en anaerobiosis,
30 se procede a dispersar una o varias colonias en el diluyente antes de añadirlo al dispositivo inmunocromatográfico de la invención. En este caso el procedimiento deber realizarse en un laboratorio con las medidas de seguridad y la experiencia adecuadas.

En una realización particular de la invención, en la etapa a) se utiliza un vial de toma de

muestra en el que se introduce la muestra con la ayuda de un vástago (etapa a), figura 2A y 2B) tras lo que se cierra el vial con el tapón a rosca y se agita vigorosamente (etapa b), figura 2C) para, posteriormente romper la parte superior del tapón (figura 2D) y añadir 4-5 gotas en la zona de aplicación de la muestra del dispositivo inmunocromatográfico (etapa c), figura 2E). De esta manera la manipulación de la muestra resulta un procedimiento sencillo, rápido e higiénico.

Para la realización del ensayo inmunocromatográfico de la invención, se toma y prepara una única muestra biológica para todas las tiras inmunocromatográficas del dispositivo, lo que supone la importante ventaja de reducir la variabilidad en el resultado y el riesgo de errores asociados a un mayor número de manipulaciones de la muestra.

El diluyente utilizado en la etapa b) es cualquier diluyente válido para llevar a cabo un ensayo inmunocromatográfico, y es por tanto fácilmente determinable por el experto en la materia. En una realización particular, el diluyente es una solución acuosa de TRIS 175 mM, NaCl 75 mM, EDTA 3 mM, Taurodeoxicolato de Na 0,025 %, Albúmina bovina 0,8 %, Azida de Na 0,1% (% en peso/volumen). En una realización particular, en la etapa b) la muestra biológica se resuspende en el diluyente de dispersión en una proporción aproximada 1/10, por ejemplo, 100 µL de muestra líquida o 100 mg de muestra sólida en 1 mL del diluyente.

La etapa d) del método de la invención supone una espera de al menos 5 minutos, de manera más particular al menos 10 minutos, y de manera preferente entre 5 y 10 minutos, para visualizar los distintos inmunocomplejos formados en la zona de membrana porosa (3) e interpretar el resultado.

Interpretación analítica de los resultados de la prueba.

El test se considera negativo si, asumiendo que los anticuerpos inmovilizados en la zona de membrana porosa se disponen en forma de línea, solo aparecen las líneas de control (5) en las ventanas de resultados (10). Se considera positivo para GDH si además de la línea de control aparece una línea (4') en la tira para GDH (8'). Se considera positivo para TcdA si en la tira correspondiente (8'') además de la línea de control (5) aparece una línea (4'') para la TcdA; y positivo para TcdB si en su tira (8''') además de la línea de control (5) aparece una línea (4''') para TcdB.

Interpretación diagnóstica de los resultados de la prueba.

Un resultado negativo para GDH, TcdA y TcdB indica que no hay infección por *Clostridium difficile*. Positivo para GDH y negativo para TcdA y TcdB indica que hay colonización de *Clostridium difficile* pero de una cepa no patógena (no toxigénica). Por último, un resultado positivo para GDH y positivo para TcdA o TcdB indica infección por un cepa *C. difficile* TcdA⁺ TcdB⁻ o TcdA⁻ TcdB⁺, respectivamente, y un resultado positivo para GDH, TcdA y TcdB indica infección por un cepa *C. difficile* TcdA⁺ TcdB⁺.

Como se ha mencionado anteriormente el tiempo de desarrollo de la prueba es, preferentemente, de 5 a 10 minutos, además el tiempo de preparación de la muestra es de unos 2 minutos, por ello, el tiempo requerido para llevar a cabo el método de la invención es entre 10 y 20 veces menor que los ensayos ELISA o PCR, que son además mucho más complejos de llevar a cabo y necesitan de instrumentación de laboratorio. El método de la presente invención, se lleva a cabo con un dispositivo de un solo uso y sin necesidad de ningún tipo de instrumentación, por lo que por su sencillez, puede llevarse a cabo en la consulta del médico, e incluso, con las instrucciones adecuadas, por el propio paciente, quien puede además interpretar fácilmente el resultado.

Por último, destacar que el dispositivo inmunocromatográfico de la invención tiene una eficacia real como prueba diagnóstica superior al 99%. Mostrando además una sensibilidad y especificidad superiores al 99%. Así, los autores de la presente invención han desarrollado un dispositivo para el diagnóstico rápido, sencillo y eficaz de infección por *C. difficile*.

Como ayuda al diagnóstico de las enfermedades causadas por *Clostridium difficile* se incluye la detección de la lactoferrina fecal, por ello, en una realización particular, el dispositivo de la invención descrito anteriormente comprende una tira inmunocromatográfica adicional para la detección de lactoferrina fecal humana con los mismos componentes que las tiras descritas anteriormente pero con anticuerpos específicos anti-lactoferrina. Dicha tira comprende, en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-lactoferrina depositadas sobre dicho primer material absorbente,
 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-lactoferrina inmovilizado,
- y

- un segundo material absorbente (6).

5 Para la detección de lactoferrina, el primer y segundo anticuerpo es el mismo si el anticuerpo es policlonal o son distintos en el caso de ser ambos monoclonales cooperantes o el primero policlonal y el segundo monoclonal. En una realización particular el primer anticuerpo anti-lactoferrina es policlonal y el segundo monoclonal.

10 En cuanto al método de la invención, cuando se utiliza un dispositivo que incluye la detección de lactoferrina, en la etapa a) se toman dos muestras, una como se ha indicado anteriormente para la detección de GDH, TcdA y TcdB y otra para la lactoferrina, ya que ésta debe detectarse de manera cuantitativa. Así, el vial utilizado para la toma de muestra para la detección de lactoferrina es un vial calibrado. Este vial calibrado posee un vástago unido al tapón del vial que posee unas hendiduras tales que, al pasar por el anillo reductor incorporado en el cuerpo del vial (ver figura 1 de la solicitud de patente P201230180),
15 introduce solamente una cantidad conocida de muestra. Así, en una realización particular, la toma de muestra de la etapa a) para la detección de lactoferrina se realiza con el vial cuantitativo y en la etapa b) dicha muestra biológica se resuspende en el diluyente de dispersión en una proporción aproximada de 1/100.

20 En cuanto a la interpretación de los resultados del método de diagnóstico, cuando el dispositivo utilizado comprende también la tira inmunocromatográfica para la detección de lactoferrina, la muestra se considerará positiva para lactoferrina si en la tira correspondiente además de la línea de control (5) aparece una línea para la lactoferrina y un resultado positivo para GDH, TcdA, TcdB y lactoferrina indica infección por un cepa *C. difficile* TcdA⁺
25 TcdB⁺ y presencia de procesos inflamatorios.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los dispositivos de la invención descritos anteriormente para el diagnóstico de infección por *C. difficile*.

30 Para una mayor facilidad y conveniencia, el dispositivo de diagnóstico puede introducirse en una carcasa (11) y agruparse con un vial para la toma de la muestra, y opcionalmente el diluyente para la dispersión de la muestra, junto las instrucciones de uso, en forma de kit. Así, en otro aspecto la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico de infección por *C. difficile* que comprende el dispositivo inmunocromatográfico de la invención para la

detección de GDH, TcdA y TcdB. En otra realización particular, el kit de diagnóstico comprende además un vial para la toma de muestras, conteniendo el vial, en otra realización particular, el diluyente para la dispersión de la muestra. En una realización particular, el kit comprende el dispositivo de la invención para la detección de GDH, TcdA, TcdB y lactoferrina, en cuyo caso, de comprender también el vial, tendría 2 viales, optativamente con el diluyente para la dispersión de la muestra, siendo uno de los viales un vial calibrado. En otra realización particular, el kit comprende el dispositivo de la invención introducido en una carcasa de plástico (11, figura 1C). Dicha carcasa de plástico, donde se introduce el dispositivo de la invención con 3 ó 4 tiras inmunocromatográficas según se detecten GDH, TcdA y TcdB o adicionalmente lactoferrina, tiene dos ventanas por cada tira inmunocromatográfica, una para la aplicación de la muestra (9) y otra para la visualización de los resultados (10) donde C y T indican la posición de la línea control (5) y la línea de test (4), respectivamente (Fig. 1C).

15 **Ejemplos**

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

20 **EJEMPLO 1.- Preparación de una tira inmunocromatográfica para la detección de GDH** Clonación del gen *gluD* de *Clostridium difficile*

El gen *gluD* (Glutamato Dehidrogenasa, Número de Acceso de GenBank M65250) de *Clostridium difficile* se clonó en los sitios *NcoI/XhoI* del plásmido pET-30b(+) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) empleando como molde para la amplificación mediante PCR de dicho gen ADN genómico de la cepa toxigénica estándar VP1 10463 (número de acceso ATCC 43255).

La extracción de ADN genómico de la cepa VP1 10463 se llevó a cabo mediante el kit QIAamp DNA Minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El gen *gluD* (1.282 pb) se amplificó usando la ADN Polimerasa TaKaRa LA Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y los cebadores *gluD1* de secuencia SEQ ID NO 1 (AGGACCATGGCTTCAGGAAAAGATGTAAATGTC) y *gluD2* de secuencia SEQ ID NO 2

(CAGCCTCGAGTTAGTACCATCCTCTTAATTTTCATAGC), tal y como se describe en el ejemplo 1 de la solicitud de patente P201230180.

5 El producto de PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El fragmento de ADN resultante se aisló y purificó mediante columnas Ultra Clean PCR Clean-Up (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EEUU) y se clonó en el plásmido pET-30b(+). Con el plásmido resultante se transformaron células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EEUU). Los clones positivos se seleccionaron en placas de LB + 50 μ g/mL Kanamicina.

10

La expresión y purificación de la proteína GDH en *E. coli*, la preparación y purificación de anticuerpos monoclonales anti-GDH, la preparación de micropartículas conjugadas con el anticuerpo anti-GDH y la preparación de la tira de detección de GDH se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos en la solicitud de patente P201230180 (ver ejemplos 1 a 4).

15

EJEMPLO 2.- Preparación de una tira inmunocromatográfica para la detección de TcdA y otra tira para la detección de TcdB

Clonación de los genes *tcdA* y *tcdB* de *Clostridium difficile*

20 Los genes *tcdA* (Toxina A, Número de Acceso de GenBank M30307) y *tcdB* (Toxina B, Número de Acceso de GenBank X53138) de *Clostridium difficile* se clonaron en los sitios *NcoI/XhoI* del plásmido pET-30b(+) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) empleando como molde para la amplificación mediante PCR de ambos genes ADN genómico de la cepa toxigénica estándar VP1 10463 (Número de Acceso ATCC 43255).

25

La extracción de ADN genómico de la cepa VP1 10463 se llevó a cabo mediante el kit QIAamp DNA Minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

30 Los genes *tcdA* (8.407 pb) y *tcdB* (7.692 pb) se amplificaron usando la ADN Polimerasa TaKaRa LA Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y los cebadores de la tabla 1, siguiendo las instrucciones del distribuidor.

Tabla 1: cebadores para la amplificación de los genes *tcdA* y *tcdB*

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')
tcdA 1 Forward	SEQ ID NO 3	CGGCCCATGGCTTCTTTAATATCTAAAGAAGAGT
tcdA 2 Reverse	SEQ ID NO 4	ATTACTCGAGTTAGCCATATATCCCAGGGGCTT
tcdB 1 Forward	SEQ ID NO 5	CGGCCCATGGCTAGTTTAGTTAATAGAAAACAG
tcdB 2 Reverse	SEQ ID NO 6	CGGCCTCGAGTTATTCACATACTAATTGAGC

El producto de PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El fragmento de ADN resultante se aisló y purificó mediante columnas Ultra Clean PCR Clean-Up (Mo BioLaboratories, Inc., Carlsbad, CA, EEUU) y se clonó en el plásmido pET-30b(+). Con el plásmido resultante se transformaron células competentes DH5α de *Escherichia coli* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EEUU). Los clones positivos se seleccionaron en placas de LB + 50µg/mL Kanamicina.

10 Expresión y purificación de las Toxinas A y B en *E. coli*

La expresión de las Toxinas A y B se llevó a cabo en células competentes BL21 (DE3) pLysS de *E. coli* (Promega, Southampton, Reino Unido). Estas células se transformaron con el plásmido pET-30b(+) + *tcdA* y pET-30b(+) + *tcdB* respectivamente y los clones positivos se seleccionaron en placas de LB + 50 µg/ml Kanamicina + 25 µg/ml Cloranfenicol.

15

Para inducir la expresión de la Toxina A, una de estas colonias se inoculó en 80 ml de LB + 50 µg/ml Kanamicina + 25 µg/ml Cloranfenicol y se cultivó durante toda la noche a 30°C en agitación (225 rpm). Al día siguiente el cultivo se diluyó 20 veces en un volumen final de 1.200 ml de LB + 50 µg/ml Kanamicina + 25 µg/ml Cloranfenicol y se incubó manteniendo las mismas condiciones de temperatura y agitación hasta que éste alcanzó una D.O. _{600 nm} de ~ 0,5. A continuación se añadió IPTG a una concentración 1mM y se cultivaron las células durante 18 horas a 30°C y una agitación de 225 rpm para inducir la expresión de dicha Toxina. La expresión de la Toxina B se llevó a cabo repitiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la Toxina A, variando la temperatura de crecimiento de 30°C a 25 35°C. Transcurrido este tiempo las células se recogieron mediante centrifugación a 11.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El peso en seco de células obtenido después de este proceso fue de unos 8 gr.

Para la obtención del extracto proteico el pellet de células se resuspendió en un volumen de

5 ml de Buffer de Lisis (0,2 mg/ml *Lysozyme from chicken egg White* (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania), 20 µg/ml *Deoxyribonuclease I from bovine pancreas* (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania), 20 µg/ml *RNAse A* (Applichem GmbH, Darmstadt, Alemania), 1 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania), 1mM PMSF (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania), 1 pastilla de Complete ULTRA Tablets Mini EDTA-free, EASYpack (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) Binding Buffer (20 mM sodio fosfato, 0,5 M NaCl, 50 mM imidazol, pH 7,4) por cada gramo de células y se incubó durante una hora a 4°C.

10 Transcurrido este tiempo las muestras se sonicaron 5 veces durante 30 segundos con intervalos de 1 minuto en hielo a una intensidad de 7 en un equipo Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, EEUU) y se centrifugaron a 11.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró con una membrana de 0,2 µm (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, EEUU).

15 La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) utilizando una columna HisTrap HP (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) de 5ml y un equipo Äkta Prime Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Previamente la columna fue pre-equilibrada con 10 volúmenes de Binding Buffer (20 mM sodio fosfato, 0,5 M NaCl, 50 mM imidazol, pH 7,4) y después se aplicó el extracto proteico filtrado a la columna a un flujo de 5 ml/minuto. A continuación se lavó la columna con 10 volúmenes de Binding Buffer manteniendo el flujo de 5 ml/minuto. La proteína recombinante unida a la columna se eluyó a un flujo de 2,5 ml/minuto con Elution Buffer (20 mM sodio fosfato, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazol, pH 7,4) y se recogieron fracciones de 4 ml.

Para eliminar la cola de Histidinas de las proteínas recombinantes se dializaron las fracciones purificadas en 20mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, amM CaCl₂, pH 8.0 y se digirieron con Enterokinasa (4µl /mg de proteína, New England Biolabs, Ipswich, MA, Reino Unido) durante 16 horas a 23°C.

Las muestras de Toxina A y B digeridas con Enterokinasa se dializaron en Binding Buffer (20 mM sodio fosfato, 0,5 M NaCl, 50 mM imidazol, pH 7,4) y se cargaron de nuevo en una columna HisTrap HP, de tal manera que las colas de Histidina resultantes de la digestión y

la fracción de proteína no digerida por Enterokinasa quedara inmovilizada en dicha columna. Seguidamente se lavó la columna con 10 volúmenes de Binding Buffer manteniendo el flujo de 5ml/minuto. La fracción obtenida del lavado de la columna, que contenía en un caso la Toxina A y en otro la Toxina B sin cola de Histidinas y la Enterokinasa, se dializó en 20 mM Tris-HCl, pH 8,4 para, a continuación, separar ambas proteínas mediante cromatografía de intercambio iónico realizando un gradiente lineal creciente de sal en una columna de DEAE Sepharosa (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) de 40 ml.

Brevemente, la columna fue pre-equilibrada con 5 volúmenes de 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, se cargó con las fracciones obtenidas del lavado de la purificación anterior de cada Toxina (flujo de 10 ml/minuto) y se lavó con otros 5 volúmenes de 20 mM Tris-HCl, pH 8,4 (flujo de 5 ml/minuto). A continuación se llevó a cabo el gradiente lineal de NaCl (de 20 mM Tris-HCl, pH 8,4 a 20 mM Tris-HCl 1M NaCl pH 8,4) y se recogieron fracciones de 4 ml (flujo de 5 ml/minuto). Finalmente, las fracciones enriquecidas con la Toxina A (308,25 KDa) o con la Toxina B (282,05 KDa) se concentraron con una columna de ultrafiltración Vivaspín 20 (Sarotius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Alemania) y se obtuvo una cantidad de 40 mg de proteína a una concentración de 1,5 mg/ml.

Preparación y purificación de anticuerpos monoclonales anti-toxina A y anti-toxina B

Los anticuerpos monoclonales cooperantes anti-toxina A (TA1 y TA2) y anti-toxina B (TB3 y TB6) se purificaron a partir de cultivos de los hibridomas del mismo nombre. La obtención de los hibridomas productores de dichos anticuerpos se realizó mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia, como es el método de fusión celular y selección de los clones. En particular se detalla a continuación la obtención de los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales cooperantes TB3 y TB6, siendo similar el método de obtención de los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales cooperantes TA1 y TA2. Ratones del tipo BALB/c se inmunizaron con Toxina B de *Clostridium difficile* purificada. Los linfocitos de los ratones inmunizados se fusionaron con células mielómicas de la línea SP20 y los hibridomas obtenidos se seleccionaron mediante técnicas ELISA de la siguiente manera: los pocillos de una placa microtiter de 96 pocillos se tapizaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-Toxina B en tampón carbonato 100 mM de pH 9 a 37 °C durante 2 h. A estos pocillos se añadió la Toxina B purificada. Tras su lavado se añadieron las distintas muestras de cultivo de hibridomas y la presencia del anticuerpo anti-toxina B se reveló utilizando un conjugado anti-mIgG con peroxidasa y el sustrato

correspondiente. Se seleccionaron los hibridomas que mayor afinidad y mejor especificidad presentaron. Entre estos se seleccionaron los más productores y los que mejores prestaciones ofrecieron en los pruebas de estrés térmico y velocidad de reacción frente al antígeno.

5

Los hibridomas seleccionados TB3 y TB6 se cultivaron en medio RPMI-HT durante varios días a 37 °C centígrados con 5% de CO₂. A partir del medio de cultivo se purificó el anticuerpo por cromatografía de afinidad a proteína A según las instrucciones del fabricante de la columna (GE Healthcare) tras lo que se dializaron en PBS de pH 7,4.

10

Preparación de las micropartículas conjugadas con anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B

En particular se detalla a continuación la preparación de las micropartículas conjugadas con anticuerpos anti-toxina B, siendo similar el método de preparación de las micropartículas conjugadas con anticuerpos anti-toxina A. Se prepara un conjugado del anticuerpo TB3 con micropartículas de poliestireno. Se utilizan partículas coloreadas con grupos carboxilo en su superficie de 300 nm de diámetro nominal (K1 030 de la marca Estapor, Merck, Darmstadt, Alemania). 1 mL de partículas al 10% se lavan por centrifugación y resuspensión en tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) 10 mM de pH 6 y se le añade EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) hasta una concentración de 5 mM. Se incuba 1h a 37 °C y se retira el exceso de reactivo por centrifugación. Las partículas así activadas se resuspenden en MES 10 mM de pH 6 y se les añade el anticuerpo monoclonal anti-Toxina B hasta una concentración superficial de 2 mg/m² tras lo que se incuban 18 h a 4 °C y posteriormente se lavan en Tween 20 al 0,1%.

15

20

Los conjugados con partículas para la línea de control se obtienen de la misma manera pero, utilizando en lugar del anticuerpo, estreptavidina (S4762, Sigma-Aldrich) a una concentración superficial final de 1 mg/m².

25

Preparación de las tiras de detección de toxinas

Se detalla el método de preparación de la tira para la detección de toxina B, siendo similar el método de preparación de la tira para la detección de toxina A. Una mezcla de las micropartículas conjugadas con anticuerpos anti-toxina B (TB3) y con estreptavidina descritas en el apartado anterior, en concentraciones de 0,08% y 0,04% respectivamente, se diluyen en una solución que contiene sacarosa 10%, caseína bovina 2%, albúmina bovina 2%, PEG-6000 1% y Tween-20 2% en tampón TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) de pH

30

9,0. Esta solución se deposita a razón de 12 $\mu\text{L}/\text{cm}$ en un material bobinado de fibras de poliéster no entretejidas de 29 mm de ancho que se seca en corriente de aire a 45 °C tras la deposición (5 minutos) y durante 24 h en una cámara a 30 °C y 15 % de humedad relativa.

5 Los anticuerpos anti-TcdB (TB6) (para la línea de test 4''') y anti-estreptavidina (para la línea control (5)) se dializan en PBS, se llevan a una concentración de 1 mg/mL y se depositan linealmente por separado y de forma paralela sobre una membrana de nitrocelulosa laminada (3) (Hi-Flow Plus de Millipore o similar) de 25 mm de ancho y de tamaño de poro entre 10 y 30 μm a razón de 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ tras lo cual se seca en corriente de
10 aire a 45 °C tras la deposición (2 minutos) e inmediatamente después durante 24 h en una cámara a 30 °C y 15 % de humedad relativa.

El material con las micropartículas, la membrana y el material absorbente se montan conforme indica la figura 1A sobre un soporte plástico (7) con una lámina adhesiva y las tiras
15 son cortadas transversalmente a su montaje a una anchura de 4 mm.

EJEMPLO 3.- Montaje y utilización del dispositivo.

Las tres tiras IC se disponen en el interior de una carcasa de material plástico (11) que se ha diseñado de tal forma que presenta un alojamiento para cada una de las tiras, tres ventanas
20 diferentes para la adición de las muestras (9) y otras tres ventanas para la visualización de los resultados (10).

Se prepara una solución para la dispersión de las muestras de heces consistente en una disolución acuosa de NaCl 75 mM, TRIS 175 mM, EDTA 3 mM, Taurodeoxicolato de Na
25 0,025 %, Albúmina bovina 0,8 %, Azida de Na 0,1% (% en peso/volumen). Esta preparación se dispensa en viales para la toma de muestra a razón de 1 mL/vial.

Con dicho vial, se toma una muestra de heces y se resuspende aproximadamente 1/10 en el diluyente del párrafo anterior. Se agita vigorosamente y se aplican 4-5 gotas en la zona de
30 aplicación de la muestra del dispositivo inmunocromatográfico (etapa c), figura 2E).

EJEMPLO 4.- Detección de GDH, toxina A y toxina B

Se prepararon diluciones seriadas 1/2 de GDH, de toxina A y de toxina B, en el diluyente de dispersión de muestras descrito en el apartado anterior. 100 µL de estas diluciones se aplican a los dispositivos inmunocromatográficos de la invención y se deja progresar el ensayo durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C) tras lo cual se procede a interpretar el resultado mediante apreciación visual de aparición de la línea de test. Se realiza además la misma operación pero diluyendo la GDH, toxina A y toxina B en un *pool* de muestras de heces resuspendidas aproximadamente 1/10 en el mismo tampón. Los resultados para GDH se muestran en la tabla 2 y para las toxinas A y B en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 2.- Detección de GDH

ng GDH/mL	En diluyente	En heces
100	+	+
50	+	+
25	+	+
12,5	+	+
6,25	+	+
3,125	+	+
1,56	+	+
0,78	+	+
0,39	-	-
0	-	-

Tabla 3.- Detección de la toxina A

ng Toxina A/mL	En diluyente	En heces
16	+	+
4	+	+
2	+	+
1	+/-	+/-
0,5	-	-
0,25	-	-
0	-	-

Tabla 4.- Detección de la toxina B

ng Toxina B/mL	En diluyente	En heces
2,5	+	+
1,25	+	+
0,625	+	+
0,312	+/-	+/-
0,156	-	-
0,078	-	-
0	-	-

El símbolo +/- se refiere a que usuarios no experimentados podrían no apreciarlo.

- 5 Una muestra de heces que contenga una concentración de GDH igual o superior a 0,78 ng/mL, una concentración de toxina A mayor o igual a 1 ng/g heces y una concentración de toxina B igual o mayor a 0,312 ng/g en heces, dan resultados positivos usando el test de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1.- Dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar *C. difficile* a partir de muestras biológicas caracterizado por que comprende tres tiras inmunocromatográficas:

5 A) una tira (8') para detectar la glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-GDH (2') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

10 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-GDH (4') inmovilizado, y
- un segundo material absorbente (6);

B) una tira (8'') para detectar la Toxina A de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:

15 - un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-toxina A (2'') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-toxina A (4'') inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6);

20 C) una tira (8''') para detectar la Toxina B de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-toxina B (2''') depositadas sobre dicho primer material absorbente,

25 - una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-toxina B (4''') inmovilizado, y

- un segundo material absorbente (6).

2.- Dispositivo según la reivindicación anterior que comprende una tira
30 inmunocromatográfica adicional para detectar la lactoferrina fecal humana de *C. difficile* que comprende, en el sentido del flujo:

- un primer material absorbente que comprende una zona de aplicación de la muestra (1) y una zona con micropartículas conjugadas con un primer anticuerpo anti-lactoferrina depositadas sobre dicho primer material absorbente,

- una membrana porosa (3) con un segundo anticuerpo anti-lactoferrina inmovilizado,
y
- un segundo material absorbente (6).

- 5 3.- Procedimiento para el diagnóstico de infección por *C. difficile* caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- a) tomar una muestra biológica,
 - b) dispersar la muestra biológica tomada en la etapa a) en un diluyente,
 - c) aplicar la dispersión obtenida en la etapa b) en la zona de aplicación de la muestra
10 (6) de un dispositivo inmunocromatográfico según la reivindicación 1 ó 2,
 - d) esperar a la aparición de inmunocomplejos en la membrana porosa (3).

- 4.- Procedimiento según la reivindicación anterior donde la muestra biológica es una muestra fecal seleccionada del grupo formado por heces y cultivo o coprocultivos.

- 15 5.- Uso de un dispositivo según la reivindicación 1 ó 2 para el diagnóstico de infección por *C. difficile*.

- 20 6.- Kit para el diagnóstico de infección por *C. difficile* que comprende un dispositivo según la reivindicación 1 ó 2.

- 7.- Kit según la reivindicación anterior, donde el dispositivo está introducido en una carcasa con dos ventanas para cada tira inmunocromatográfica, siendo una ventana para la aplicación de la muestra (9) y otra ventana para la visualización de los resultados (10).

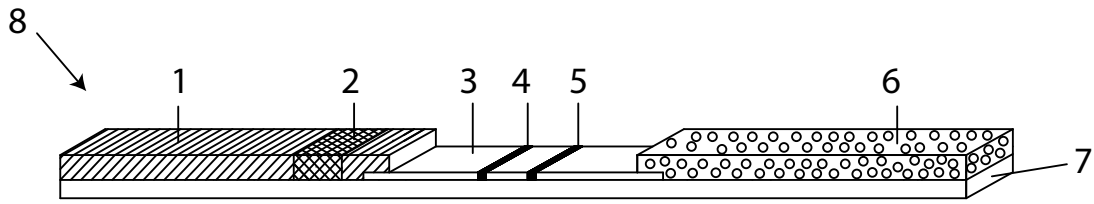


Fig. 1A

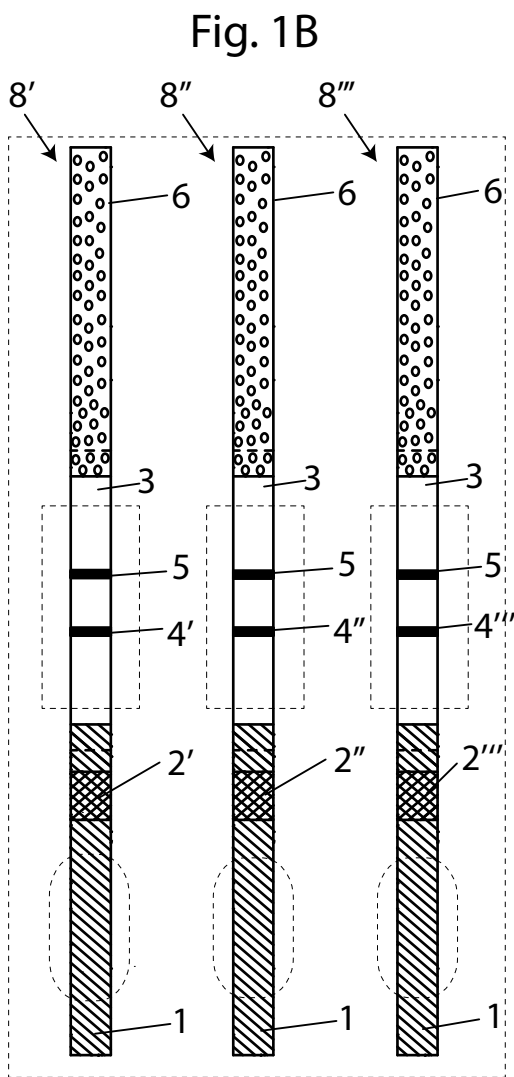


Fig. 1B

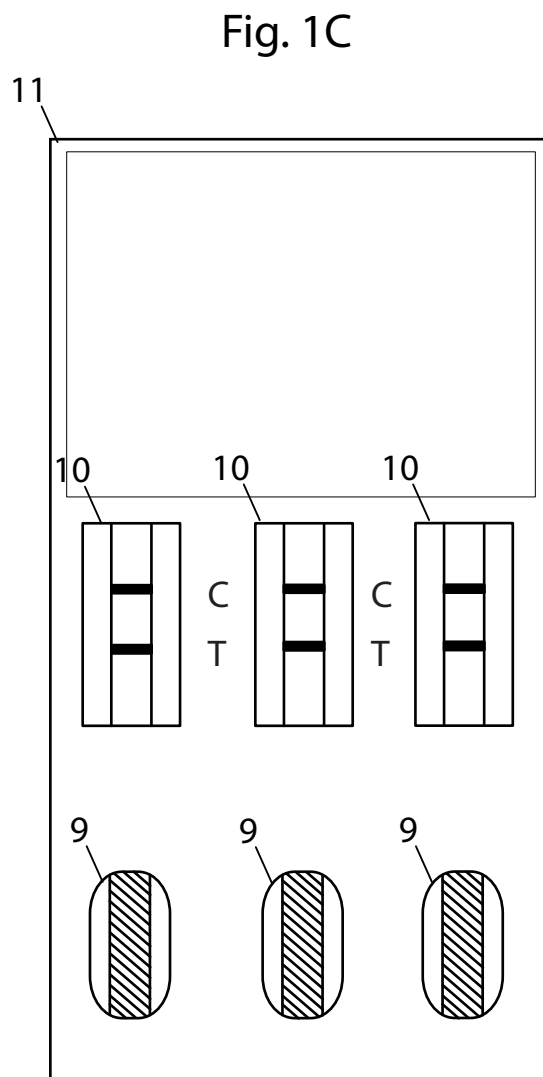


Fig. 1C

Fig. 1

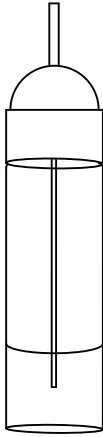


Fig. 2A

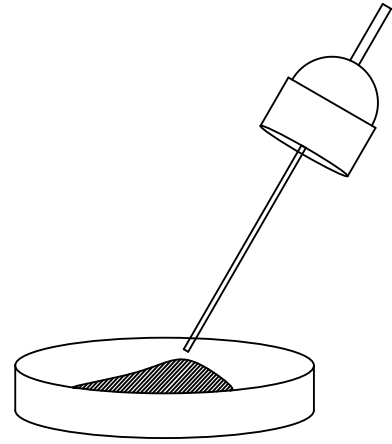


Fig. 2B

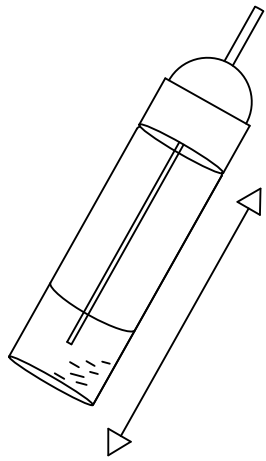


Fig. 2C

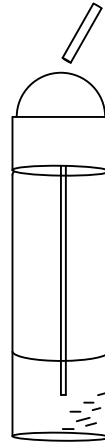


Fig. 2D

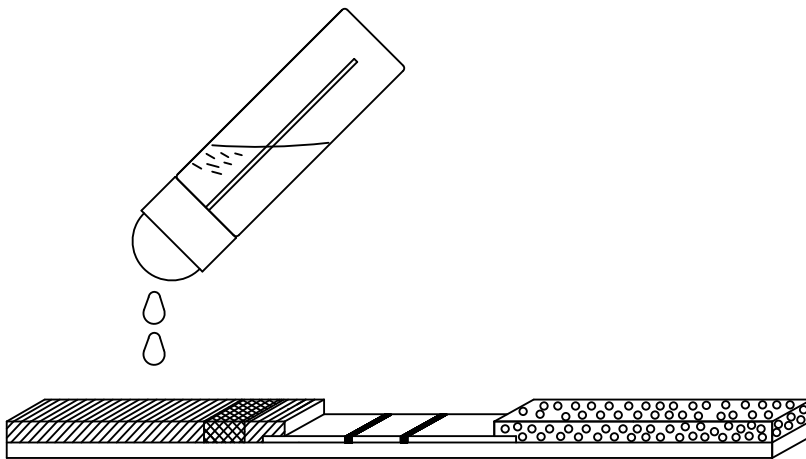


Fig. 2E

Fig. 2

ES 2 526 137 A1

Lista de Secuencias

<110> Certest Biotec S.L.
<120> Dispositivo para el diagnóstico de infección por Clostridium difficile
<130> 076/13
<160> 6
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GluD1
<400> 1
aggaccatgg cttcaggaaa agatgtaaat gtc 33

<210> 2
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GluD2
<400> 2
cagcctcag ttagtaccat cctcttaatt tcatagc 37

<210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> tcdA 1
<400> 3
cggccatgg cttctttaat atctaaagaa gagt 34

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> tcdA 2
<400> 4
attactcag ttagccatat atcccagggg ctt 33

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> tcdB 1

ES 2 526 137 A1

<400> 5
cggcccatgg ctagtttagt taatagaaaa cag 33

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> tcdB 2

<400> 6
cggcctcgag ttattcacta atcactaatt gagc 34



- ②① N.º solicitud: 201330990
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.07.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/32** (2006.01)
G01N33/569 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	CN 101363867 A (BEIJING ZHUANGDI HAOHE BIOMEDICINE SCIENCE AND TECHNOLOGY CO LTD) 11.02.2009, (resumen) WPI [bases de datos en línea] Derwent Publications LTD. [recuperado el 11.06.2014]. Recuperado de Epoque. N° de acceso: 2009-F44841.	1-7
Y	ES 2385625 A1 (CERTEST BIOTEC S L) 27.07.2012, todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
18.06.2014

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.06.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-7	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CN 101363867 A (BEIJING ZHUANGDI HAOHE BIOMEDICINE SCIENCE AND TECHNOLOGY CO LTD)	11.02.2009
D02	ES 2385625 A1 (CERTEST BIOTEC S L)	27.07.2012

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención describe un dispositivo inmunocromatográfico para el diagnóstico rápido de enfermedades causadas por Clostridium difficile que, mediante la aplicación de la muestra de heces dispersada en un diluyente, permite la detección simultánea y diferenciada de glutamato deshidrogenasa y las Toxinas A Y B de Clostridium difficile, mediante la formación de conjugados con partículas coloreadas y su captura en una membrana porosa.

1.-NOVEDAD

Las reivindicaciones 1-7 cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP 11/1986 ya que ninguno de los documentos citados en el informe de búsqueda anticipa el objeto de la invención de las mismas.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D01 describe un dispositivo inmunocromatográfico para la detección de las Toxinas A y B de Clostridium difficile.

El objeto de la reivindicación 1 difiere en que en que el dispositivo comprende una tira para detectar la glutamato deshidrogenasa de Clostridium difficile .

El efecto de tal diferencia es un dispositivo más sensible

El problema que resuelve la presente invención es por tanto cómo proporcionar un dispositivo más sensible. La solución propuesta es la adición de una tira para la detección de la glutamato deshidrogenasa.

En el estado de la técnica es conocido que la especificidad en la detección de patógenos aumenta con el número de antígenos específicos detectados. En el caso de Clostridium difficile se conocen un amplio abanico de antígenos.

Para proporcionar un dispositivo más sensible capaz de identificar cepas toxigénicas, un experto en la materia consultaría la literatura relativa a la identificación de Clostridium difficile. De este modo encontraría el documento D02 que describe un dispositivo inmunocromatográfico para el diagnóstico rápido de enfermedades causadas por Clostridium difficile que, mediante la aplicación de la muestra de heces dispersada en un diluyente, permite la detección simultánea y diferenciada de glutamato deshidrogenasa de Clostridium difficile y de lactoferrina y/o calprotectina fecales mediante la formación de conjugados con partículas coloreadas y su captura en una membrana porosa.

El dispositivo de la reivindicación 1 consiste en tres compartimentos diferentes con tres tiras para detectar la glutamato deshidrogenasa y las Toxinas A y B. El experto en la materia con el objetivo de proporcionar un dispositivo más sensible añadiría una tira específica para la detección glutamato deshidrogenasa al dispositivo ya conocido del documento 1 y resolvería el problema con unas expectativas razonables de éxito. Como resultado, el objeto de la reivindicaciones 1-6 no implican actividad inventiva de acuerdo al art. 8.1 LP 11/1986.