(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 589 606**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2009** **PCT/DE2009/001044**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011** **WO11012098**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2009** **E 09776017 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016** **EP 2459588**

(54) Título: **Procedimiento para la detección y para la identificación de una cepa de C. difficile variante en una muestra**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2016

(73) Titular/es:

BIODICS GMBH (100.0%)
Bingerweg 15
55444 Schweppenhausen, DE

(72) Inventor/es:

VON EICHELSTREIBER, CHRISTOPH;
MOOS, MICHAEL;
GISCH, KARINA y
BRAUN, VEIT

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 589 606 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

Procedimiento para la detección y para la identificación de una cepa de *C. difficile* variante en una muestra

Clostridium difficile es una bacteria en forma de bastoncillo Gram positiva, obligatoriamente anaeróbica con una longitud de 3-6 µm y una anchura de aproximadamente 0,5 µm. El género *Clostridium* pertenece a la familia de los *Bacillaceae.* El descubrimiento de *C. difficile* como un germen patógeno importante de la colitis asociada a antibióticos tuvo lugar a finales de los años 70. El nombre C. *difficile* tiene su origen en el crecimiento lento en el cultivo y el difícil aislamiento de la bacteria. Sobre placas de agar sangre complementadas crecen grandes colonias, traslúcidas de color gris sin hemólisis. Como todos los clostridios, *C. difficile* tiene la capacidad de formación de esporas. De esta manera, las bacterias pueden sobrevivir también en condiciones medioambientales extremas.

Los adultos sanos portan hasta el 2-7 % de *C. difficile* en el tracto gastrointestinal. Durante una terapia con antibióticos se altera el efecto protector de la flora fisiológica y puede producirse un crecimiento excesivo de C. *difficile* en el intestino. La enfermedad asociada con Clostridium-difficile (CDAD) resultante de esto varía en cuanto a su grado de gravedad en función de la virulencia de la cepa de C. *difficile* presente. El cuadro clínico va desde una ligera diarrea hasta una colitis pseudomenbranosa grave con fiebre y dolores de tripa de tipo calambre y el riesgo de complicaciones graves tales como perforación de colon, septicemia y megacolon tóxico. Como factores de virulencia sirven en primer lugar una enterotoxina (toxina A) y una zitotoxina (toxina B). Las toxinas pertenecen a la familia de las toxinas clostridiales grandes (LCT, *Large clostridial toxins*) y tienen una actividad glicosiltransferasa. Además, algunas cepas tienen los genes para la toxina binaria CDT (ADP-ribosiltransferasa), que se discute como factor de virulencia adicional.

En el caso de las cepas de *C. difficile* se diferencia entre las denominadas cepas convencionales y sus variantes. Como cepas de *C. difficile* convencionales se denominan por regla general cepas del toxinotipo 0. Entre ellas figuran cepas con diferentes ribotipos, por ejemplo 001, 003 y 012. Las cepas del toxinotipo 0 se caracterizan por la presencia de los genes para las dos toxinas A y B, por el contrario faltan los genes para la toxina binaria.

En los últimos años se mostró que además de las cepas de *C. difficile* convencionales también existe una pluralidad de diferentes cepas de *C. difficile* variantes, que tienen una significancia clínica creciente y también se detectaron en animales domésticos (en particular perros, gatos) y animales útiles (en particular terneros y cerdos).

De este modo, desde 2003 en Canadá, Los EE.UU., Gran Bretaña y muchos otros países de Europa, se observaron infecciones endémicas, a menudo clínicamente graves con cepas de *C. difficile* variantes.

Las cepas de *C. difficile* variantes aisladas en relación con estas infecciones clínicamente graves tienen tanto los genes para las toxinas A (*tcdA*) y B (*tcdB*) como los genes para la CDT y presentan deleciones parciales en su regulador *tcdC*.

Estas cepas de *C. difficile* de alta virulencia del ribotipo PCR 027, toxinotipo III, REA-B1 y PFGE NAP1 tienen en el regulador *tcdC* una deleción de 18 pb y un desplazamiento del marco en la posición 117, lo que se supone como causa para su producción de toxinas aumentada detectada *in vitro* y como un motivo para su virulencia elevada. Estas cepas se caracterizan además por que, en comparación con el resto de las cepas de *C. difficile* presentan proteínas de superficie modificadas y una adherencia elevada a las células epiteliales intestinales humanas. Además, estas cepas son resistentes frente a antibióticos de la clase de principios activos fluoroquinolonas y frente al antibiótico eritromicina, presuntamente debido a mutaciones en los genes para gyrA/ B y el 23sRNA.

En adelante, estas cepas de *C. difficile* de alta virulencia se denominan con la abreviatura *"C.d.-027-hv"*.

Hasta la fecha, la mayoría de los pacientes afectados por una infección con *C. difficile* eran mayores de 60 años, C.d.-027-hv se detecta también en pacientes más jóvenes y también fuera de hospitales en pacientes con un riesgo hasta ahora bajo. Su letalidad está elevada por quintuplicado con respecto a las cepas de *C. difficile* detectadas hasta la fecha.

Otro grupo de cepas de *C. difficile* variantes, clínicamente relevantes, se clasifica como ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F. Estas cepas se caracterizan esencialmente por que presentan una deleción de 1,7 kB de tamaño en el gen *tcdA* y no expresan ninguna toxina A debido a un codón de parada prematuro. Las cepas presentan una resistencia a antibióticos contra clindamicina y fluoroquinolonas, faltan los genes para la toxina binaria CDT, y además el regulador *tcdC* no presenta ninguna deleción. Una aparición frecuente de tales cepas se informa, entre otros, desde Los EE.UU., Japón, Israel, Irlanda y Los Países Bajos. La mortalidad en pacientes con infecciones de este tipo se encuentra con un 14-66 % por encima de la de las cepas convencionales.

En adelante estas cepas de *C. difficile* de alta virulencia se conocen con la abreviatura *"C.d.-017-hv"*.

La detección diagnóstica de *C. difficile* tiene lugar habitualmente a través de la detección de la toxina A, en algunos casos también a través de la detección combinada de toxina A y B. Una detección de cepas de *C. difficile* variantes

no es posible con este procedimiento. Las cepas variantes o bien no se detectan en absoluto (cepas negativas para toxina A) o bien no se detectan por separado.

Para la identificación y caracterización de cepas de *C. difficile* variantes es necesario tipificarlas. Los procedimientos para la tipificación de *C. difficile* son conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo la toxinotipificación, la serotipificación, la ribotipificación o las tipificaciones por medio de PFGE o REA. Sin embargo, todos estos procedimientos requieren mucho trabajo y tiempo, pueden llevarse a cabo solo por laboratorios especializados y requieren por adelantado el aislamiento costoso de las cepas de *C. difficile* en cuestión.

Para la identificación exacta de cepas de *C. difficile* específicas se requieren además, en la mayoría de los casos, también ensayos adicionales, tales como por ejemplo en el caso de *C.d.-027-hv* la detección de la resistencia a antibióticos y la deleción en el gen *tcdC*.

En la práctica de laboratorio se procede, por lo tanto, por ejemplo en un ensayo con respecto a una presencia de C.d.-027-hv tal como sigue:

1. detección de *C. difficile* en general mediante detección de las toxinas A y/o B, en las heces de los pacientes por medio de inmunoensayo,
2. cuando es positiva: cultivo de las bacterias *C. difficile* a partir del material de ensayo,
3. en el caso de un aislamiento satisfactorio de las bacterias: someter a ensayo la presencia de la eritromicina y la resistencia a moxifloxacina en la prueba E,
4. en el caso de una detección de resistencia positiva: someter a ensayo la presencia del ribotipo 027 por medio de preparación de ADN y amplificación por PCR del gen de ARN ribosómico (ribotipificación) [Figura 1],
5. en el caso de una detección positiva del ribotipo 027: genotipificación parcial para la detección de los genes de toxina *tcdA* y *tcdB,* de los genes *cdtA*/*B* para la toxina binaria CDT y las deleciones en el regulador *tcdC,*
6. en el caso de la presencia de ambas resistencias a antibióticos sometidos a ensayo y todas las características del patrón genotípico característico: Diagnóstico de una cepa de *C. difficile* hipervirulenta ribotipo 027 (*C.d-027-hv*).

Una desventaja de esta práctica de laboratorio hasta el momento, que tiene igual complejidad para otras cepas de *C. difficile* variantes y de alta virulencia, consiste sobre todo en que requiere mucho tiempo: para el aislamiento y el cultivo del germen, la determinación de la resistencia a antibióticos y la ribotipificación existe un tiempo requerido de 7-10 días.

Para una óptima vigilancia de infección con el objetivo de impedir infecciones nosocomiales (infecciones hospitalarias) y controlar brotes infecciosos, ambos tanto para la protección de los pacientes y del personal como por motivos de ahorro de costes, en cambio, los procedimientos de identificación deben ser sobre todo rápidos y lo más precisos posibles.

La presente invención se basa por lo tanto en el objetivo de proporcionar un procedimiento para la detección y la identificación rápidas y seguras de cepas de *C. difficile* variantes en una muestra, en particular una muestra de un paciente (de un paciente humano o animal).

Los problemas a resolver en el transcurso de este objetivo consisten en particular en que, (i) las toxinas de las distintas cepas de *C. difficile* no se diferencia por una única región, (ii) no es trivial generar anticuerpos específicos frente a las LCT de una determinada cepa de *C. difficile* (la UE financia por ejemplo un programa de investigación especial n.º 37870, acrónimo "EACCAD", que se ocupa de la investigación de las cepas C.d.-027-hv y tiene como objetivo, entre otros, la generación de anticuerpos de este tipo frente a las LCT de C.d.-027-hv), (iii) la toxina binaria CDT también se forma por otras cepas de C. *difficile*, y (iv) no pueden detectarse mutaciones en determinados genes, tales como por ejemplo tcdC, por regla general inmunológicamente en muestras de heces.

Una solución para este objetivo consiste en la provisión de un procedimiento que se caracteriza por las siguientes etapas:

(a) obtener una muestra de excreción o secreción corporal y/o de tejido corporal de un paciente humano o animal
(b) poner en contacto la muestra con en cada caso al menos un anticuerpo de al menos tres de los grupos de anticuerpos grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV, grupo V y grupo VI, en el que

el grupo I comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos anti pan-TcdB,
el grupo II comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos que reaccionan con las toxinas TcdB-10463 y TcdB-017, pero no con las toxinas TcdB-8864 y TcdB-027,
el grupo III comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos que reaccionan con TcdB-10463, pero no con las toxinas TcdB-8864, TcdB-017 y TcdB-027,
el grupo IV comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos que reaccionan con las toxinas TcdB-8864, TcdB-017 y TcdB-027, pero no con la toxina TcdB-10463,
el grupo V comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos que reaccionan con las toxinas TcdB-8864 y

TcdB-027, pero no con las toxinas TcdB-10463 y TcdB-017,
el grupo VI comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos anti pan-TcdA

(c) detectar la reacción de anticuerpo y crear el patrón de reacción, en el que a cada anticuerpo utilizado en (b) de cada grupo de anticuerpos I a VI se asocia un símbolo positivo (por ejemplo "+") para una reacción de anticuerpo positiva detectada y un símbolo negativo (por ejemplo "-") para una reacción de anticuerpo negativa detectada, y
(d) comparar el patrón de reacción obtenido en (c) con patrones de referencia, que se obtienen por que de las cepas de C. *difficile* Rx_1, Rx_2, Rx_i conocidas en el estado de la técnica y que se examinan en la prueba de detección para determinar su presencia al menos una de las o de sus toxinas clostridiales grandes respectivas LCT-Rx_1, LCT-Rx_2, LCT-Rx_i se utiliza en una prueba de reacción con los anticuerpos seleccionados en la etapa (b) de los al menos tres de los grupos de anticuerpos I a VI, y por que los resultados de reacción obtenidos para cada LCT y los al menos tres de los grupos de anticuerpos I a VI se detectan a modo de patrón o se registran o se representan, de tal manera que a cada grupo de anticuerpos se asocia o bien un símbolo positivo (por ejemplo "+") en el caso de una reacción de anticuerpo positiva detectada o bien un símbolo negativo (por ejemplo "-") en el caso de una reacción de anticuerpo negativa detectada,
(e) evaluar una coincidencia entre el patrón de reacción obtenido en (c) con un patrón de referencia como indicio de que en la muestra está presente la cepa de *C. difficile* del patrón de referencia en cuestión.

En este sentido y en lo sucesivo significan:

- LCT: Large Clostridial Toxin (toxina clostridial grande), en concreto toxina A y/o toxina B de C. *difficile*
- TcdB-10463: toxina B de la cepa de *C. difficile* VPI-10463 (= "toxina convencional")
- TcdB-8864: toxina B de la cepa de *C. difficile* 8864
- TcdB-1470: toxina B de la cepa de *C. difficile* 1470
- TcdB-7002/8: toxina B de la cepa de *C. difficile* 7002/8
- TcdB-017: toxina B de cepas de *C. difficile* con el ribotipo 017
- TcdB-027: toxina B de cepas de *C. difficile* con el ribotipo 027
- anticuerpo anti pan TcdA: anticuerpo que reconoce las proteínas TcdA de todas las cepas patógenas de *C. difficile* (por ejemplo TTC8)
- anticuerpo anti pan TcdB: anticuerpo que reconoce las proteínas TcdB de todas las cepas patógenas de *C. difficile* (por ejemplo 2CV, TGC35)

La enseñanza del procedimiento de acuerdo con la invención se basa en el conocimiento sorprendente de que

(1.) los anticuerpos dirigidos frente a las LCT de *C. difficile,* en concreto frente a la toxina A o toxina B pueden dividirse en seis grupos, que se caracterizan tal como sigue:

grupo I = anticuerpos anti pan-TcdB TGC35 (DSM ACC 2918) y 2CV (DSM ACC 2321) y anticuerpos que tienen igual función y efecto que TGC35 y/o 2CV;
grupo II = anticuerpos que reaccionan con la toxina convencional TcdB-10463 y la TcdB-017 variante, pero que no reaccionan con las toxinas variantes TcdB-8864 y TcdB-027, en particular anticuerpos TGC23 (DSM ACC2917) y con ello anticuerpos de igual función y efecto;
grupo III = anticuerpos que reaccionan con la toxina convencional TcdB-10463, pero no con las toxinas variantes TcdB-8864, TcdB-017 y TcdB-027, en particular anticuerpos TGC41 (DSM ACC2919) y con ello anticuerpos de igual función y efecto;
grupo IV = anticuerpos que reaccionan con las toxinas variantes TcdB-8864 y TcdB-017 y TcdB-027, pero no con la toxina convencional TcdB-10463, en particular anticuerpos TGC16 (DSM ACC2915) y con ello anticuerpos de igual función y efecto;
grupo V = anticuerpos que reaccionan con las toxinas variantes TcdB-8864 y TcdB-027, pero no con la toxina convencional TcdB-10463 y la TcdB-017 variante, en particular anticuerpos TGC19 (DSM ACC2916) y con ello anticuerpos de igual función y efecto;
grupo VI = anticuerpos anti pan-TcdA que reaccionan con las proteínas TcdA de todas las cepas patógenas de *C. difficile*, en particular anticuerpos TTC8 (DSM ACC 2322) y con ello anticuerpos de igual función y efecto (tal como el anticuerpo PCG4 descrito en el documento US 4879218);

y

(2.) las cepas de *C. difficile* variantes virulentas conocidas hasta el momento o sus LCT muestran en cada caso un patrón de reacción característico con los anticuerpos de estos seis grupos - y en particular su toxina B con los anticuerpos de los cinco grupos I a V, que se diferencia de los patrones de reacción de las toxinas de otras cepas de *C. difficile* variantes (altamente) virulentas y de los patrones de reacción de las toxinas de cepas convencionales de *C. difficile*.

Por ejemplo, la cepa de *C. difficile* variante de alta virulencia *C.d.-027-hv* se caracteriza por el patrón de reacción "+--++ +" en el orden de los grupos I, II, III, IV, V, VI, mientras que la cepa de *C. difficile* así mismo de alta virulencia

C.d.-017-hv se caracteriza por el patrón de reacción "++-+--" (así mismo en el orden de los grupos I, II, III, IV, V, VI). Para la identificación y detección de las distintas cepas de *C. difficile* variantes virulentas conocidas hasta el momento y relevantes desde el punto de vista diagnóstico son necesarios y suficientes por regla general en cada caso al menos un anticuerpos de al menos tres grupos de anticuerpos distintos. Por ejemplo, para la diferenciación de la cepa de *C. difficile C.d.-027-hv* de las cepas de *C. difficile* variantes relevantes restantes y de las cepas convencionales de *C. difficile* es suficiente el patrón de reacción de los tres grupos II, IV y VI, en concreto "-++" (en el orden de los grupos II, IV, VI), para la diferenciación o identificación de la cepa de *C. difficile C.d.-017-hv* es suficiente el patrón de reacción de los tres grupos II, IV y VI, en concreto "+ +-" (así mismo en el orden de los grupos II, IV, VI).

El procedimiento de acuerdo con la invención va acompañado en particular de las siguientes ventajas:

directamente por medio de la muestra de heces mediante una prueba que puede llevarse a cabo de manera sencilla y en el plazo de algunas horas puede establecerse si está presente o no una cepa de *C. difficile* variante de alta virulencia determinada: se examina para determinar por ejemplo la presencia de *C.d.-027-hv* y se obtiene un patrón de reacción de anticuerpo-antígeno, que para un anticuerpo de al menos uno de los grupos de anticuerpos I, IV, V y/o VI no muestra ninguna reacción positiva, puede diagnosticarse de manera fiable que no está presente ninguna cepa del tipo *C.d.-027-hv*. Si, por el contrario el patrón de reacción de anticuerpo-antígeno muestra una reacción positiva para los cuatro grupos de anticuerpos I, IV, V y VI, existe, con muy alta probabilidad, una infección con una cepa *C.d.-027-hv*. Para confirmar el diagnóstico sospechado pueden/deben entonces llevarse a cabo análisis especiales que requieren mucho tiempo y costes resistencia a antibióticos, ribotipificación y/o análisis génicos (en particular detección de los genes de toxina tcdA, tcdB y tcd A/B y del gen regulador tcdC con las deleciones características y desplazamientos del marco).

En otras palabras: El procedimiento de acuerdo con la invención sustituye en el procedimiento de ensayo convencional las primeras tres etapas (detección de toxinas, cultivo de bacterias, prueba de resistencia a antibióticos) y permite, en un tiempo esencialmente más corto, en concreto algunas horas con respecto a convencionalmente, varios días, por lo menos un diagnóstico por exclusión fiable en los casos en los que no existe ninguna infección con la cepa de *C. difficile* variante que va a someterse a ensayo por ejemplo *C.d.-027-hv*. Las etapas adicionales que requieren mucho tiempo y costes (4, 5 y 6) en el procedimiento de ensayo convencional necesitan en primer lugar y solo llevarse a cabo cuando el procedimiento de acuerdo con la invención indica la presencia de la cepa de *C. difficile* variante que va a someterse a ensayo, por ejemplo *C.d.-027-hv* o *C.d.-017-hv*.

También pueden utilizarse entonces de manera dirigida medidas preventivas tales como por ejemplo aislamiento, cuarentena, condiciones de higiene rigurosas, cuando se considera realmente alto el riesgo de una infección por *C.d.-027-hv* o infección por *C.d.-017-hv* debido al resultado de la prueba de detección de acuerdo con la invención.

En el caso de los anticuerpos de los grupos I a VI se trata preferentemente de anticuerpos monoclonales. En principio se tienen en cuenta como anticuerpos para el procedimiento de acuerdo con la invención también todas las alternativas de anticuerpos naturales, producidas mediante biotecnología o producidas mediante ingeniería genética, conocidas por el experto, por ejemplo anticuerpos de camello (*nanobodies*), Affibodies, Anticaline, mini-proteínas con nudos de cisteína.

En una forma de realización del procedimiento, que ha dado muy buen resultado en la práctica, el al menos un anticuerpo procedente del grupo I es el anticuerpo monoclonal 2CV (DSM ACC 2321) o el anticuerpo monoclonal TGC 35 (DSM ACC2918), y/o el al menos un anticuerpo procedente del grupo II es el anticuerpo monoclonal TGC23 (DSM ACC2917), y/o el al menos un anticuerpo procedente del grupo III es el anticuerpo monoclonal TGC41 (DSM ACC2919), y/o el al menos un anticuerpo procedente del grupo IV es el anticuerpo monoclonal TGC 16 (DSM ACC2915), y/o el al menos un anticuerpo procedente del grupo V es el anticuerpo monoclonal TGC 19 (DSM ACC2916) y/o el al menos un anticuerpo procedente del grupo VI es el anticuerpo monoclonal TTC8 (DSM ACC 2322).

En el caso de la muestra de excreción o secreción corporal se trata en la práctica preferentemente de una muestra de heces, y en el caso de la muestra de tejido corporal se trata preferentemente de una muestra de sangre.

Una forma de realización del procedimiento adicional, que es de alta relevancia para la práctica, porque permite una detección rápida y fiable de cepas de *C. difficile* variantes, se caracteriza por que en la etapa (b) la muestra se pone en contacto con en cada caso un anticuerpo de cada uno de los grupos I, IV y VI, y por que en la etapa (c) una reacción positiva de los anticuerpos de los grupos I, IV y VI indica la presencia de una cepa de C. *difficile* variante, de alta virulencia.

Una forma de realización del procedimiento de alta relevancia para la práctica, que permite una detección rápida y fiable de la cepa de *C. difficile* de alta virulencia ribotipo 027, PFGE-NAP1, REA-B1 y toxinotipo III y con ello el examen de casos sospechosos de C.d.-027-hv, se caracteriza por que en la etapa (b) la muestra se pone en contacto con en cada caso al menos un anticuerpo de cada uno de los grupos de anticuerpos grupo II, grupo IV y grupo VI, y por que en la etapa (c) una reacción positiva de los anticuerpos del grupo IV y grupo VI y una reacción

negativa del/de los anticuerpo(s) del grupo II indica la presencia de una cepa de *C. difficile* variante de alta virulencia del tipo de ribotipo 027, PFGE-NAP1, REA-B1, toxinotipo III.

Esta forma de realización puede ampliarse también por que en la etapa (b) la muestra se pone en contacto adicionalmente con en cada caso al menos un anticuerpo del grupo de anticuerpos I y/o del grupo de anticuerpos III y/o del grupo de anticuerpos V, y por que en la etapa (c) adicionalmente una reacción positiva del/de los anticuerpo(s) del grupo I y grupo V y una reacción negativa del/de los anticuerpo(s) del grupo III indica la presencia de una cepa de *C. difficile* variante de alta virulencia del tipo de ribotipo 027, PFGE-NAP1, REA-B1, toxinotipo III.

Una forma de realización adicional del procedimiento, así mismo de alta relevancia para la práctica, que permite una detección rápida y fiable de la cepa de *C. difficile* de alta virulencia ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F y con ello el examen de casos sospechosos de *C.d.-017-hv*, se caracteriza por que en la etapa (b) la muestra se pone en contacto con en cada caso al menos un anticuerpo de cada uno de los grupos de anticuerpos grupo II, grupo IV y grupo VI, y por que en la etapa (c) una reacción positiva de los anticuerpos del grupo II y grupo IV y una reacción negativa del/de los anticuerpo(s) del grupo VI indica la presencia de una cepa de C. *difficile* variante de alta virulencia del tipo de ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F.

Esta forma de realización puede ampliarse aún porque en la etapa (b) la muestra se pone en contacto adicionalmente con en cada caso al menos un anticuerpo del grupo de anticuerpos I y/o del grupo de anticuerpos III y/o del grupo de anticuerpos V, y por que en la etapa (c) adicionalmente una reacción positiva del/de los anticuerpo(s) del grupo I y una reacción negativa de los anticuerpos del grupo III y grupo V indica la presencia de una cepa de *C. difficile* variante de alta virulencia del tipo de ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F.

El objetivo en el que se basa la presente invención se consigue también con la provisión del anticuerpo monoclonal que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, desde el 05 de junio de 2008 con el número DSM ACC2916 (TGC 19), y que es adecuado y está previsto para su uso en el procedimiento de acuerdo con la invención para la detección y para la identificación de cepas de *C. difficile* variantes, en particular en la variante de procedimiento para la detección y para la identificación de la cepa de *C. difficile* ribotipo 027, PFGE-NAP1, REA-B1 y toxinotipo III.

El objetivo mencionado se consigue además con la provisión del anticuerpo monoclonal que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la DSMZ, Braunschweig, Alemania desde el 05 de junio de 2008 con el número DSM ACC2917 (TGC 23), y que es adecuado y está previsto para su uso en el procedimiento de acuerdo con la invención para la detección y para la identificación de cepas de *C. difficile* variantes, en particular en la variante de procedimiento para la detección y para la identificación de la cepa de *C. difficile* ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F.

El objetivo mencionado se consigue además con la provisión del anticuerpo monoclonal que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la DSMZ, Braunschweig, Alemania con el número DSM ACC2915 (TGC 16), y que es adecuado y está previsto para su uso en el procedimiento para la detección y para la identificación de una cepa de *C. difficile* variante en una muestra, en particular, en particular en las variantes de procedimiento para la detección y para la identificación de cepas de *C. difficile* con el ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F y/o de cepas de *C. difficile* con el ribotipo 027, PFGE-NAP1, REA-B1 y toxinotipo III.

El objetivo mencionado se consigue por último también mediante la provisión del anticuerpo monoclonal que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la DSMZ, Braunschweig, Alemania con el número DSM ACC2918 (TGC 35), y que es adecuado y está previsto para su uso en el procedimiento para la detección y para la identificación de una cepa de *C. difficile* variante en una muestra, en particular, en particular en las variantes de procedimiento para la detección y para la identificación de cepas de *C. difficile* con el ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F y/o de cepas de *C. difficile* con el ribotipo 027, PFGE-NAP1, REA-B1 y toxinotipo III.

La invención se explica en detalle a continuación por medio de ejemplos de realización:

Las figuras mencionadas en los Ejemplos muestran:

La Figura 1: **la ribotipificación de las cepas usadas.** Las cepas se ribotipificaron según las instrucciones de Stubbs et al. y a través de comparación con cepas de referencia as asociaron a los diferentes ribotipos. A este respecto se asoció la cepa VPI-10463 y la cepa 8864 a ribotipos desconocidos hasta el momento y la cepa 1470 al ribotipo 017 y la cepa 7002/8 al ribotipo 027. Las bandas de marcador discurren en 600 pb, 500 pb, 400 pb y 300 pb (desde arriba).

La Figura 2: **variantes de toxina B purificadas.** Distintas variantes de toxina B están representadas en SDS-PAGE con tinción con Coomassie. De las toxinas individuales se aplicaron entre 250-400 ng por carril

La Figura 3: **la detección de la especificidad de anticuerpos monoclonales anti-toxina B.** Distintas variantes de toxina B se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nailon y a continuación se revelaron con los anticuerpos correspondientes. Se muestran las

especificidades de los anticuerpos monoclonales TGC35 (Figura 3 **A**), TGC16 (Figura 3 **B**), TGC41 (Figura 3 **C**), TGC23 (Figura 3 **D**) y TGC19 (Figura 3 **E**).

La Figura 4: **las regiones de unión de los anticuerpos monoclonales.** La Figura 4 **A** es una representación esquemática de la estructura de la toxina B. La Figura 4 **B** representa la región de unión de los anticuerpos dentro de la toxina B. La Figura 4C muestra las reactividades de los anticuerpos monoclonales.

La Figura 5: **patrón de referencia de cepas de C. difficile.** La expresión de toxina A y toxina B en el sobrenadante de cultivo de cuatro cepas de C. difficile distintas se sometió a prueba por medio de ELISA de tipo sándwich con el uso de anticuerpos de captura de los grupos de anticuerpos I, II, IV y VI. Como anticuerpos de captura se utilizaron del grupo I: TGC35, del grupo II: TGC23, del grupo IV: TGC16, grupo VI: TTC8. Se muestran los patrones de reconocimiento de las cepas de C. difficile VPI-10463 (Figura 5 **A**), 8864 (Figura 5 **B**), 1470 ribotipo 017 (Figura 5 **C**) y 7002/8 ribotipo 027 (Figura 5 **D**)

La Figura 6: **patrón de reacción de distintas cepas de *C. difficile* en el ELISA de captura.** Como anticuerpo de identificación se usó del grupo I el TGC35, del grupo II el TGC23, del grupo IV el TGC16 y del grupo VI el TTC8. En la Figura 6A están representados los resultados de 17 cepas distintas de *C. difficile* y en la Figura 6B los resultados de otras cepas de *C. difficile*.

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos monoclonales que reaccionan de manera específica con toxina B de *C. difficile*

(A) Obtención de toxina B de *C. difficile* purificada de distintas cepas de *C. difficile*

Se usaron las cepas de C. *difficile*: VPI-10463 (ATCC43255), 8864 (CCUG20309), 1470 (ATCC43598) y 7002/8 (aislado humano de una muestra de un paciente).

Las cepas se ribotipificaron de acuerdo con el procedimiento de ribotipificación según Stubbs et al. 1999. Los resultados obtenidos a este respecto están representados en la Figura Fig. 1. Se mostró que la cepa 1470 corresponde al ribotipo 017 y la cepa 7002/8 al ribotipo 027, mientras que las cepas VPI-10463 y 8864 pueden asociarse a ribotipos hasta el momento no conocidos oficialmente.

La toxina B (TcdB-10463) expresada por la cepa VPI-10463 se denomina en general en el estado de la técnica como toxina convencional.

La cepa 8864 produce una variante de esta toxina B (TcdB-8864), que se diferencia de la toxina convencional sobre todo en el dominio de unión a receptor C-terminal (Soehn et al. 1998).

La cepa 1470 expresa una toxina B (TcdB-1470), que se diferencia de la toxina B convencional en particular en el dominio enzimático N-terminal (de Eichel-Streiber et al. 1995).

Se desconoce la secuencia de la toxina B de la cepa 7002/8 ribotipo 027. Por el contrario se determinaron las secuencias de la TcdB-027 en dos cepas *C.d.-027-hv* distintas (cepa QCD-32g58, n.º de registro de Genbank NZ_AML00000000, cepa R20291, www.sanger.ac.uk). Una comparación de estas secuencias de TcdB-027 con la toxina B convencional y otras toxinas TcdB variantes da como resultado que TcdB-027 se asemeja en el dominio enzimático, N-terminal, a la toxina convencional TcdB-10463, pero en el dominio C-terminal a la toxina TcdB-8864 variante.

Para la purificación de las toxinas se cultivaron de manera anaeróbica las bacterias en medios de cultivo Brain Heart Infusion (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). A continuación se purificaron las toxinas A y B a partir del sobrenadante de estos cultivos, tal como se describe en Moos et al. (2000). La pureza de las toxinas se examino en el gel de Coomassie (véase la Figura 2).

La TcdB aislada y purificada de las cepas de *C. difficile* VPI-10463, 8864 y 1470 se inactivaron con los procedimientos habituales y conocidos en el estado de la técnica y se examinó el éxito de la inactivación en la prueba de citotoxicidad.

(B) Obtención de anticuerpos monoclonales frente a las variantes de toxina-B de (A)

En una serie de preparaciones, en primer lugar se sometieron a inmunización de base en cada caso varios ratones con las variantes de toxina B inactivadas TcdB-8864 y TcdB-1470 y la toxina convencional TcdB 10163 y a continuación se sometieron a dos inmunizaciones de refuerzo.

Se determinó el título de los animales frente al inmunogén y se extrajo el bazo, en caso de que se hubiera desarrollado un título significativo. Las células de bazo aisladas se fusionaron con los procedimientos habituales y conocidos en el estado de la técnica con la línea celular de mieloma de ratón X63Ag8.653 (ATCC CRL1580) y las células de fusión se seleccionaron y clonaron a continuación. Los clones de hibridoma obtenidos a este respecto se

seleccionaron de manera inmunológica en cuanto a la producción de anticuerpos monoclonales específicos frente a la toxina B usada para la inmunización.

En total se llevaron a cabo 15 fusiones y por último se aislaron 21 líneas celulares de hibridoma distintas que expresan los anticuerpos específicos de toxina B.

Para los otros ensayos se purificaron los anticuerpos del sobrenadante del cultivo celular. Para ello se cultivaron las líneas celulares de hibridoma en medio libre de suero ISF-1 (Biochrom, Berlín, Alemania) y a continuación se cultivaron en un volumen de 250 ml en un sistema Spinner (Bellco, Vineland, EE.UU.) a 50 rpm, hasta que la vitalidad del cultivo cayó hasta menos del 30 %. El sobrenadante del cultivo se purificó por medio de una columna de proteína A (HiTrap MabSelect SuRe, GE Healthcare, Freiburg, Alemania). La concentración de los anticuerpos purificados se encontraba en 1-2 mg/ml, la pureza se examinó en el gel de Coomassie.

Ejemplo 2: Caracterización de los anticuerpos anti-toxina B

Para la caracterización de los anticuerpos purificados en el Ejemplo 1 se examinaron estos en la inmunotransferencia de tipo Western.

Para ello se separaron en primer lugar en cada caso 250-400 ng de la toxina B convencional 10463 y las variantes de toxina B TcdB-8864, TcdB-017 y TcdB-027 en el SDS-PAGE y a continuación se transfirieron en el procedimiento de transferencia semiseco a membranas de nailon. El revelado tuvo lugar de acuerdo con los procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

Para la detección de las toxinas se utilizaron los anticuerpos monoclonales generados en el Ejemplo 1.

Los resultados para los anticuerpos con el nombre de laboratorio TGC 16, TGC 19, TGC 23, TGC 35 y TGC 41 están resumidos en la Figura 3:

Los resultados muestran que la mayoría de los anticuerpos generados reconocen un subgrupo de distintas variantes de toxina B y no de manera monoespecífica solo una variante de toxina determinada.

Se identificaron en total 11 anticuerpos distintos que se unen a la toxina B convencional y a todas las variantes de toxina B. Un representante característico de dichos anticuerpos anti pan-TcdB es el anticuerpo TGC 35. La línea celular de hibridoma que produce estos TGC 35, está depositada en la DSMZ (*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen* (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Braunschweig, Alemania) desde el 05 de junio de 2008 con el número DSM ACC2918.

Algunos anticuerpos reaccionan tanto con la toxina convencional como con la toxina TcdB-017. Un representante característico de este grupo de anticuerpos es el anticuerpo TGC 23. La línea celular de hibridoma, que produce estos TGC 23, está depositada en la DSMZ desde el 05 de junio de 2008 con el número DSM ACC2917.

Algunos anticuerpos reaccionan de manera específica con la toxina convencional TcdB-10463. Un representante característico de este grupo de anticuerpos es el anticuerpo TGC 41. La línea celular de hibridoma, que produce estos TGC 41, está depositada en la DSMZ desde el 05 de junio de 2008 con el número DSM ACC2919.

Sorprendentemente pudieron generarse también dos anticuerpos que reaccionan con una o varias de las variantes de toxina B, pero no con la toxina convencional B.

El anticuerpo TGC 16 no se une a la toxina B convencional, pero sí a las toxinas variantes TcdB-8864, TcdB-017 y TcdB-027. La línea celular de hibridoma, que produce estos TGC 16, está depositada en la DSMZ desde el 05 de junio de 2008 con el número DSM ACC2915.

El anticuerpo TGC 19 no se une a la toxina B convencional o la variante toxina TcdB-017, pero sí a las toxinas variantes TcdB-8864 y TcdB-027. La línea celular de hibridoma, que produce estos TGC 19, está depositada en la DSMZ desde el 05 de junio de 2008 con el número DSM ACC2916.

Los anticuerpos se examinaron en un ELISA de captura con respecto a su límite de detección de antígeno. Para ello se incubaron placas de ELISA por pocillo con 50 µl tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 50 mM, $NaHCO_3$ 50 mM, pH 9,6) y 250 ng del anticuerpo respectivo durante 3 h a temperatura ambiente y a este respecto se añadió el anticuerpo a la placa de ELISA. Sitios de unión no específicos se bloquearon mediante posterior incubación con 200 µl 5x WAPU (12,5 ml de TritonX100, 62,5 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,5, 62,5 ml de una solución de gelatina al 20 %, hasta 500 ml con H_2O) durante la duración de 30 minutos. A continuación se aplicaron diferentes concentraciones de los antígenos, en concreto en el caso de TGC16 y TGC 19 del antígeno TcdB-027 y en el caso de TGC 23 y TGC 35 del antígeno TcdB-017. La detección tuvo lugar con suero policlonal (266 ng/ml). Los resultados de reacción (en este caso no representados) muestran que para los anticuerpos TGC 16 y TGC 23 el límite de detección para la toxina B respectiva se encuentra en < 300 pg/ml, para el anticuerpo TGC 35 se encuentra en menos de 1 ng/ml y para el

anticuerpo TGC 19 se encuentra en 1 ng/ml.
Los anticuerpos TGC 16, TGC 19, TGC 23, TGC 35 y TGC 41 se examinaron en cuanto a sus sitios de unión a la toxina B. Mediante digestión proteolítica de la toxina B o mediante la clonación y expresión de fracciones parciales de toxina B recombinante en E. coli se produjeron fragmentos de proteína de la toxina B. Estos fragmentos parciales de toxina B se separaron en experimentos de inmunotransferencia de tipo Western y se incubaron las transferencias a continuación con los anticuerpos TGC 16, TGC 19, TGC 23, TGC 35 y TGC 41. Los resultados de estos ensayos están resumidos esquemáticamente en la Figura 4 y muestran que los anticuerpos individuales reconocen o se unen a diferentes regiones de la molécula de toxina B:

Todos las indicaciones de posiciones de aminoácidos están indicadas en referencia a las posiciones correspondientes en la toxina convencional TcdB-10463.

TGC 16 se une a TcdB-8864, TcdB-017 y Tcd-027 en cada caso dentro del dominio de glicosiltransferasa y allí en la zona de las posiciones de aminoácido 122 a 261. TGC 19 se une a TcdB-8864 y Tcd-027 en cada caso en la zona al otro lado del dominio de glicosiltransferasa entre las posiciones de aminoácido 543 y 2366.

TGC 23 se une a la toxina convencional y TcdB-017 en cada caso el dominio de ligando con separación del extremo C-terminal entre las posiciones de aminoácido 1692 y 2113. TGC 35 se une a la toxina convencional, TcdB-8864, TcdB-017 y Tcd-027 en cada caso dentro del dominio de traslocación entre el dominio de glicosiltransferasa en el extremo N-terminal de la toxina y el dominio de ligando en el extremo C-terminal entre las posiciones de aminoácido 543 y 1692.

TGC 41 se une a la toxina convencional de manera análoga al TGC 16, es decir, dentro del dominio de glicosiltransferasa y allí en la zona de las posiciones de aminoácido 122 a 261. TGC 16 y TGC 41 se unen en la misma región de toxina B, en concreto en el dominio de glicosiltransferasa, pero de distintas variantes de toxina B, en concreto de toxina convencional por un lado (TGC 41) y de TcdB-8864, TcdB-017 y Tcd-027 por otro lado (TGC 16). Con ello se ha identificado por primera vez una región en la toxina B que permite una diferenciación específica entre la toxina B convencional TcdB-10463 y las toxinas variantes TcdB-8864, TcdB-017 y Tcd-027. Sorprendentemente en el caso de esta región se trata precisamente del dominio de glicosiltransferasa, que media la actividad enzimática de la toxina B. La actividad enzimática es en principio la misma en todas las toxinas B.

Con los anticuerpos recién generados en el transcurso de la presente invención pueden establecerse distintos grupos (clases) de anticuerpos (grupos de anticuerpos/clases de anticuerpos), que se diferencian entre sí en cuanto a su reactividad con la toxina convencional B y con las distintas variantes de toxina B:

el grupo de los anticuerpos anti-pan-TcdB se denomina en adelante grupo I. Representantes típicos de este grupo son los anticuerpos monoclonales TGC 35 y 2CV (conocidos por el documento EP 0994904).

El grupo de aquellos anticuerpos que reaccionan tanto con la toxina convencional como con la toxina TcdB-017, pero no con las toxinas variantes TcdB-027 y TcdB-8864 se denomina en adelante grupo II. Un representante típico de este grupo es el anticuerpo monoclonal TGC 23.

El grupo de aquellos anticuerpos que reaccionan con la toxina convencional TcdB-10463, pero no con las toxinas variantes TcdB-027, TcdB-8864 y TcdB-1470, se denomina en adelante grupo III. Un representante típico de este grupo es el anticuerpo monoclonal TGC 41.

El grupo de aquellos anticuerpos, que no interreaccionan con la toxina convencional B, pero sí con las toxinas TcdB-8864, TcdB-017 y TcdB-027, se denomina en adelante grupo IV. Un representante típico de este grupo es el anticuerpo monoclonal TGC 16.

El grupo de aquellos anticuerpos que no reacciona con la toxina convencional B o la toxina TcdB-017, pero sí con las toxinas TcdB-8864 y TcdB-027, se denomina en adelante grupo V. Un representante típico de este grupo es el anticuerpo monoclonal TGC 19.

De la bibliografía se conoce además el grupo de los anticuerpos específicos de pan-TcdA, que se denomina en adelante grupo VI. Un representante típico de este grupo es el anticuerpo monoclonal TTC8 (conocido por el documento EP 0994904).

Ejemplo 3: Detección de LCT en el ELISA de captura – Creación de patrones de referencia de antígeno-anticuerpo para cepas de *C. difficile* variantes conocidas con el uso de los grupos de anticuerpos I, II, IV y VI

En principio se lleva a cabo la creación de patrones de referencia de antígeno-anticuerpo de la siguiente manera: De las cepas de *C. difficile* Rx_1, Rx_2, Rx_i conocidas en el estado de la técnica y que van a examinarse para determinar su presencia en la prueba de detección se obtiene en cada caso al menos la toxina B, preferentemente ambas toxinas clostridiales grandes (LCT) (en forma del sobrenadante de cultivo o de las toxinas purificadas). Con estas toxinas conocidas $LCTRx_1$, $LCT\text{-}Rx_2$, $LCT\text{-}Rx_i$ se lleva a cabo una prueba de reacción con en cada caso al menos un

anticuerpo de preferentemente cada uno de los grupos de anticuerpos I a VI. Los resultados de reacción obtenidos para cada LCT (LCT-Rx_1, LCT-Rx_2, LCT-Rx_i) y los grupos de anticuerpos utilizados se registran a modo de patrón de tal manera que a cada grupo de anticuerpos se asocia o bien un símbolo positivo (por ejemplo "+") en el caso de una reacción de anticuerpo positiva detectada o bien un símbolo negativo (por ejemplo "-") en el caso de una reacción de anticuerpo negativa detectada.

En el ejemplo presentado se procedió en concreto tal como sigue:

placas de ELISA se equiparon con los anticuerpos TGC35 (grupo I), TGC23 (grupo II), TGC16 (grupo IV) y TTC8 (grupo VI) purificados descritos en el Ejemplo 2 tal como sigue: Por pocillo se incubaron 50 µl de tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 50 mM, $NaHCO_3$ 50 mM, pH 9,6) con un contenido de 250 ng del anticuerpo respectivo durante 3 h a temperatura ambiente y a este respecto se añadió el anticuerpo a las placas de ELISA. A continuación se bloquearon sitios de unión no específicos mediante incubación con 200 µl 5x WAPU (12,5 ml de TritonX100, 62,5 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,5, 62,5 ml de una solución de gelatina al 20 %, hasta 500 ml con H_2O) durante la duración de 30 minutos.

Las cepas de C. *difficile* 10463, 8864, 1470 y 7002/8 se cultivaron tal como se describe en el Ejemplo 1, y se añadieron alícuotas de 50 µl del sobrenadante de cultivo sobre las placas de microtítulo recubiertas con los anticuerpos. Proteínas unidas de manera no específica se retiraron mediante un lavado por triplicado con TBST (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, Tween20 al 0,05 %, pH 8,0). A continuación se detectaron las toxinas unidas opcionalmente por el anticuerpo respectivo con 50 µl de suero policlonal anti-toxina-B (266 ng/ml) en el ELISA de captura. El revelado tuvo lugar a través de fosfatasa alcalina con procedimientos convencionales.

Los resultados de este ELISA están representados gráficamente en la Figura 5. En la Figura 5 puede apreciarse que cada una de las cuatro cepas de *C. difficile* distintas con los cuatro anticuerpos utilizados, muestra un patrón de reacción característico para ella, que se diferencia de los patrones de reacción de las otras cepas: El sobrenadante de la cepa VPI-10463 reacciona positivamente con los anticuerpos TGC 35/grupo I, TGC 23/grupo II y TTC8/grupo VI y negativamente con TGC 16/grupo IV (véase la Figura 5A).

El sobrenadante de la cepa 8864 reacciona positivamente con los anticuerpos TGC 35/grupo I y TGC 16/grupo IV y negativamente con TGC 23/grupo II y TTC8/grupo VI (véase la Figura 5B).

El sobrenadante de la cepa 1470 (ribotipo 017) reacciona positivamente con los anticuerpos TGC 35/grupo I, TGC 23/grupo II y TGC 16/grupo IV y negativamente con TTC8/grupo VI (véase la Figura 5C).

El sobrenadante de la cepa 7002/8 (ribotipo 027) reacciona positivamente con los anticuerpos TGC 35/grupo I, TGC 16/grupo IV y TTC8/grupo VI y negativamente con TGC 23/grupo II (véase la Figura 5D).

Un examen de estos resultados en ensayos paralelos con toxina B de cepas de C. *difficile* del ribotipo 027 y distintas combinaciones de anticuerpos de los grupos de anticuerpos I a VI confirma que TcdB-027 con anticuerpos de los grupos I, IV, V y VI reacciona siempre positivamente y con anticuerpos de los grupos II y III siempre negativamente.

En otras palabras: El patrón de reacción "+-- +++" de la toxina B de una cepa de *C. difficile* desconocida con los anticuerpos de los seis grupos de anticuerpos en el orden grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV, grupo V, grupo VI permite la conclusión de que en el caso de la cepa de *C. difficile* desconocida se trata del o de un ribotipo 027, al que pertenecen también las cepas de alta virulencia *C.d.-027-hv*.

Un examen de estos resultados en ensayos paralelos con toxina B de cepas de *C. difficile* del ribotipo 017 y distintas combinaciones de anticuerpos de los grupos de anticuerpos I a VI confirma que TcdB-017 reacciona con anticuerpos de los grupos I, II y IV siempre positivamente y con anticuerpos de los grupos III, V y VI siempre negativamente.

En otras palabras: El patrón de reacción "++- +--" de toxina B de una cepa de *C. difficile* desconocida con los anticuerpos de los seis grupos de anticuerpos en el orden grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV, grupo V, grupo VI permite la conclusión de que en el caso de la cepa de *C. difficile* desconocida se trata del o de un ribotipo 017, al que pertenecen también las cepas de alta virulencia *C.d.-017-hv*.

Ejemplo 4: Identificación de ribotipos de *C. difficile* por medio de patrones de referencia de patrón antígeno-anticuerpo

Para la creación del patrón de referencia de reacción antígeno-anticuerpo se procede tal como se describe en el Ejemplo 3.

Para la creación del patrón de reacción específico de una muestra se procede tal como sigue: La cepa de *C. difficile* que va a examinarse se cultiva con procedimientos conocidos y se somete a prueba el sobrenadante o las toxinas purificadas. Para ello se aplica sobre una superficie adecuada, por ejemplo una membrana, en cada caso al menos un anticuerpo de al menos dos, preferentemente tres o cuatro de los grupos I, II, III, IV, V y VI, por ejemplo los

anticuerpos TGC 16, TGC 19, TGC 23, TGC 41, TGC 35 y TTC8 con procedimientos habituales y conocidos por el experto.

A continuación se pone en contacto la muestra con estos anticuerpos, denominados en adelante anticuerpos de identificación. Procedimientos adecuados para ello son conocidos por el experto, por ejemplo ELISA o el denominado procedimiento "*lateral flow*" (de flujo lateral) tal como se describe en el documento EP 1143248.

Al final del tiempo de reacción específico de procedimiento cada preparación se libera (se lava) o está libre de material de muestra no unido.

Para detectar qué anticuerpo de identificación muestra una reacción antígeno-anticuerpo con la muestra y cuál no ha reaccionado, se utiliza un anticuerpo de detección. Como anticuerpos de detección pueden usarse sueros policlonales frente a toxina A y toxina B (de manera monoespecífica o con reactividad cruzada), o también anticuerpos de uno o varios de los grupos I, II, III, IV, V o VI. En el caso de la elección de los anticuerpos de detección ha de tenerse en cuenta que su epítopo objetivo se diferencia de los epítopos objetivo de los anticuerpos de identificación o está presente en principio varias veces en cada toxina, para que el anticuerpo de detección pueda unir la toxina en interconexión con el anticuerpo de identificación. Los anticuerpos de detección están marcados con marcadores adecuados tales como por ejemplo oro coloidal, partículas de carbón o de látex o marcadores enzimáticos tales como HRP (*Horse Radish Peroxidase* (peroxidasa del rábano picante)) o fosfatasa alcalina.

El anticuerpo de detección se añade a la preparación o bien antes de la aplicación de la muestra o bien junto con la muestra o después de transcurrir el tiempo de reacción específico del procedimiento entre anticuerpos de identificación y muestra.

Dado que al final del tiempo de reacción específico de procedimiento la toxina de muestra, que no está unida a los anticuerpos de identificación, y proteínas contaminantes eventualmente presentes en la muestra se retiran (se separan por lavado), aparece una señal de marcador (señal positiva "+") solo cuando se ha formado una interconexión (complejo) de anticuerpo de identificación, toxina de muestra y anticuerpo de detección.

Las señales de marcador obtenidas para cada anticuerpo de identificación "+" o "-" se reúnen en el patrón de reacción. Un patrón de reacción de este tipo puede tener el aspecto por ejemplo de la Figura 5A. La comparación con los patrones de referencia lleva en este caso a la conclusión (o al diagnóstico sospechado), de que está presente la cepa de C. *difficile* VPI-10463.

Cuando el patrón de reacción tiene por ejemplo el aspecto de la Figura 5B, la comparación con los patrones de referencia lleva a la conclusión (el diagnóstico sospechado), de que está presente la cepa de *C. difficile* 8864. Cuando el patrón de reacción tiene por ejemplo el aspecto de la Figura 5C, la comparación con los patrones de referencia lleva a la conclusión (el diagnóstico sospechado), de que está presente la cepa de *C. difficile* 1470 o una cepa de *C. difficile* del ribotipo 017. Cuando el patrón de reacción tiene por ejemplo el aspecto de la Figura 5D, la comparación con los patrones de referencia lleva a la conclusión (el diagnóstico sospechado), de que está presente la cepa de *C. difficile* 7002/8 o una cepa de *C. difficile* del ribotipo 027.

Ejemplo 5: Análisis de distintas cepas de *C. difficile* con anticuerpos de los grupos I, II, IV, VI

En el siguiente experimento se llevó a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención para la identificación y detección de cepas de *C. difficile* variantes por medio de una serie de cepas con ribotipo conocido, en concreto 19 cepas del ribotipo 027 (Lumc-1, Lumc-2, Lumc-3, Lumc-4, Lumc-5, Lumc-6, Lumc-8, Lumc-9, Lumc-10, Lumc-11, Lumc-12, Lumc-13 ,Lumc-14, Lumc-16, Lumc-17, Lumc-19, Lumc-20, Lumc-21, 7002-42), 4 cepas del ribotipo 017 (Lumc-22, Lumc-23, Lumc-40, Lumc-41), 2 cepas del ribotipo 001 (7002-29, 7002-43) y una cepa del ribotipo 014 (Lumc-31). Como cepas de referencia se usaron las cepas VPI-10463, 8864 y 7002/8. Se usaron anticuerpos de los grupos I, II, IV y VI en un ELISA de captura y se comparó el patrón de reacción resultante con los patrones de referencia creados (véase el Ejemplo 3).

Las distintas cepas de *C. difficile* se cultivaron tal como se describe en el Ejemplo 1 y el sobrenadante se usó en los experimentos subsiguientes. Como anticuerpos de identificación se añadieron a las placas de ELISA los anticuerpos TGC 35 (grupo I), TGC 23 (grupo II), TGC 16 (grupo IV) y TTC8 (grupo VI) tal como se describe en el Ejemplo 3. A este respecto usaron en cada caso 250 ng/pocillo TGC 23, 128 ng/pocillo de TGC 16 y TGC 35, así como 1 µlg/pocillo de TTC8 y se lavaron las placas a continuación en PBS.

Para llevar a cabo el ELISA se bloquearon los sitios de unión no específicos de las placas en primer lugar mediante incubación de 1 h a 37°C en PBS+BSA al 3 %. A continuación se aplicaron 50 µl/pocillo del sobrenadante de los cultivos de *C. difficile* y se incubaron las placas de nuevo durante 1 h a 37°C. Se retiraron las proteínas no unidas mediante lavado de tres veces con PBS+BSA al 3 %. Como anticuerpo de detección se usó en el caso de TGC 35, TGC 16 y TGC 23 suero anti-toxina B policlonal marcado con biotina (0,32 µg/ml). En el caso de la detección de toxina A se usó el anticuerpo TTC8 en forma biotinilada también como anticuerpo de detección. Después de un nuevo lavado con PBS+BSA al 3 % se añadieron 50 µl de estreptavidina-HRP (0,1 µg/ml, Pierce, Rockford, EE.UU.)

por pocillo y las placas se incubaron durante 1 h a 37°C. A continuación se lavaron las placas con PBS y se usaron para el desarrollo 50 µl/pocillo de TMB (1-Step Ultra TMB, Pierce, Rockford, EE.UU.). Las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad y la reacción se detiene a continuación con 100 µl/pocillo de H_2SO_4 2M. La evaluación tuvo lugar a DO450 frente a un valor vacío. Como valor *cut-off* se estableció 0,5.

Los resultados de este ensayo están representados gráficamente en la Figura 6A y la Figura 6B:

- en 19 cepas distintas se detectó el patrón de reacción "+ - + +" en el orden de los grupos I, II, IV y VI.
- en 4 cepas C.d.-017-hv distintas se detectó el patrón de reacción "+++-" en el orden de los grupos I, II, IV y VI. El análisis de las cepas 017 muestra que las cepas producen *in vitro* en total relativamente poca toxina (también la señal de TGC 35 es relativamente débil). En cambio es evidente que solo en el caso de estas cepas tiene lugar una reacción específica entre el anticuerpo TGC 23 (DSM ACC 2917) y la toxina B-017. Mientras que en todos los otros sobrenadantes (es decir todas las cepas C.d.-027-hv, así como todas las cepas de ribotipo 001 sometidas a prueba) los valores en el caso del uso del anticuerpo de detección TGC 23 no se encuentra por encima de 0,4, en el caso de las cepas C.d.-017-hv la absorción se encontraba en cada caso claramente por encima del valor cut-off de 0,5.

Los resultados confirman que el patrón de reacción antígeno-anticuerpo "+ - + +" en el orden de los grupos I, II, IV y VI permite la conclusión de que en el caso de la cepa examinada se trata de una cepa C.d.-027-hv, y que en el caso de un patrón de reacción "+ + + -" en el orden de los grupos I, II, IV y VI se concluye que está presente una cepa C.d.-017-hv.

Lista de las citas bibliográficas mencionadas:

Moos et al. (2000) "Purification and evaluation of large clostridial cytotoxins that inhibit small GTPases of Rho and Ras subfamilies" Meth Enzymol. 325: 114-125.

Soehn et al. (1998) "Genetic rearrangement in the pathogenicity locus of Clostridium difficile strain 8864 - implications for transcription, expression and enyzmatic activity of toxin A and B" Mol Gen Genet 258: 222-232.

Stubbs et al (1999) "PCR targeted to the 16-23rRNA gene intergenic space region of Clostridium difficile and construction of a library of 116 different PCR ribotypes" J Clin Microbiol 37: 461-463.

von Eichel-Streiber et al. (1995) "Closing in on the toxic domain through analysis of a variant Clostridium difficile cytotoxin B" Mol Microbiol 17: 313-321.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para la detección y para la identificación de una cepa de *C. difficile* variante, productora de LCT, virulenta en una muestra, **caracterizado por** las siguientes etapas de procedimiento:

(a) poner en contacto una muestra de excreción o secreción corporal y/o de tejido corporal con en cada caso al menos un anticuerpo de al menos tres de los grupos de anticuerpos grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV, grupo V y grupo VI, en el que

el grupo I comprende los siguientes anticuerpos:
anticuerpo monoclonal 2CV (DSM ACC 2321), anticuerpo monoclonal TGC 35 (DSM ACC2918) y anticuerpos pan-TcdB,
el grupo II comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales TGC23 (DSM ACC2917) y anticuerpos que reaccionan con las toxinas TcdB-10463 y TcdB-017, pero no con las toxinas TcdB-8864 y TcdB-027,
el grupo III comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales TGC41 (DSM ACC2919) y anticuerpos que reaccionan con TcdB-10463, pero no con las toxinas TcdB-8864, TcdB-017 y TcdB-027,
el grupo IV comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales TGC 16 (DSM ACC2915) y anticuerpos que reaccionan con las toxinas TcdB-8864, TcdB-017 y TcdB-027, pero no con la toxina TcdB-10463,
el grupo V comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales TGC 19 (DSM ACC2916) y anticuerpos que reaccionan con las toxinas TcdB-8864 y TcdB-027, pero no con las toxinas TcdB-10463 y TcdB-017,
el grupo VI comprende los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales TTC8 (DSM ACC 2322) y anticuerpos pan-TcdA;

y en el que se cumple que:

TcdB-10463 representa la toxina B de la cepa de *C. difficile* VPI-10463,
TcdB-8864 representa la toxina B de la cepa de *C. difficile* 8864,
TcdB-017 representa la toxina B de cepas de *C. difficile* con el ribotipo 017, en particular para la toxina B de la cepa de *C. difficile* 1470,
TcdB-027 representa la toxina B de cepas de *C. difficile* con el ribotipo 027, en particular para la toxina B de la cepa de *C. difficile* 7002/8

(b) detectar la reacción de anticuerpo y crear el patrón de reacción, en el que a cada anticuerpo utilizado en (a) de cada grupo de anticuerpos I a VI se asocia un símbolo positivo (por ejemplo "+") para una reacción de anticuerpo positiva detectada y un símbolo negativo (por ejemplo "-") para una reacción de anticuerpo negativa detectada, y
(c) comparar el patrón de reacción obtenido en (b) con patrones de referencia de modo que de las cepas de *C. difficile* Rx_1, Rx_2, Rx_i conocidas en el estado de la técnica y que se examinan en la prueba de detección para determinar su presencia se utiliza al menos una de sus toxinas clostridiales grandes respectivas (LCT) LCT-Rx_1, LCT-Rx_2, LCT-Rx_i en una prueba de reacción con los anticuerpos seleccionados en la etapa (a) de los al menos tres de los grupos de anticuerpos I a VI, y de modo que los resultados de reacción obtenidos para cada LCT y los al menos tres de los grupos de anticuerpos I a IV se registran a modo de patrón de tal manera que a cada grupo de anticuerpos se asocia o bien un símbolo positivo (por ejemplo "+") en el caso de una reacción de anticuerpo positiva detectada o un símbolo negativo (por ejemplo "-") en el caso de una reacción de anticuerpo negativa detectada,
(d) evaluar una coincidencia entre el patrón de reacción obtenido en (b) con un patrón de referencia como indicio de que en la muestra está presente la cepa de *C. difficile* del patrón de referencia en cuestión.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el al menos un anticuerpo procedente del grupo IV es el anticuerpo monoclonal TGC 16 (DSM ACC2915).

4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el al menos un anticuerpo procedente del grupo V es el anticuerpo monoclonal TGC 19 (DSM ACC2916).

5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el al menos un anticuerpo procedente del grupo VI es el anticuerpo monoclonal TTC8 (DSM ACC 2322).

6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** el al menos un anticuerpo procedente del grupo I es el anticuerpo monoclonal 2CV (DSM ACC 2321) o el anticuerpo monoclonal TGC 35 (DSM ACC2918).

7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** el al menos un anticuerpo procedente del grupo II es el anticuerpo monoclonal TGC23 (DSM ACC2917).

8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** el al menos un anticuerpo procedente del grupo III es el anticuerpo monoclonal TGC41 (DSM ACC2919).

9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** en la etapa (a) la muestra se pone en contacto con en cada caso un anticuerpo de cada uno de los grupos I, IV y VI, y por que en la etapa (b) una reacción positiva de los anticuerpos de los grupos I, IV y VI indica la presencia de una cepa de *C. difficile* variante, de alta virulencia.

10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** en la etapa (a) la muestra se pone en contacto con en cada caso al menos un anticuerpo de cada uno de los grupos de anticuerpos grupo II, grupo IV y grupo VI, y por que en la etapa (b) una reacción positiva de los anticuerpos del grupo IV y del grupo VI y una reacción negativa del/de los anticuerpo(s) del grupo II indican la presencia de la cepa de *C. difficile* de alta virulencia de ribotipo 027, PFGE-NAP1, REA-B1 y toxinotipo III.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** en la etapa (a) la muestra se pone en contacto adicionalmente con en cada caso al menos un anticuerpo del grupo de anticuerpos I y/o del grupo de anticuerpos III y/o del grupo de anticuerpos V, y por que en la etapa (b) adicionalmente una reacción positiva del/de los anticuerpo(s) del grupo I y del grupo V y una reacción negativa del/de los anticuerpo(s) del grupo III indican la presencia de la cepa de *C. difficile* de alta virulencia de ribotipo 027, PFGE-NAP1, REAB1 y toxinotipo III.

12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado por que** en la etapa (a) la muestra se pone en contacto con en cada caso al menos un anticuerpo de cada uno de los grupos de anticuerpos grupo II, grupo IV y grupo VI, y por que en la etapa (b) una reacción positiva de los anticuerpos del grupo II y del grupo IV y una reacción negativa del/de los anticuerpo(s) del grupo VI indican la presencia de la cepa de *C. difficile* de alta virulencia ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F.

13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado por que** en la etapa (a) la muestra se pone en contacto adicionalmente con en cada caso al menos un anticuerpo del grupo de anticuerpos I y/o del grupo de anticuerpos III y/o del grupo de anticuerpos V, y por que en la etapa (b) adicionalmente una reacción positiva del/de los anticuerpo(s) del grupo I y una reacción negativa de los anticuerpos del grupo III y del grupo V indican la presencia de la cepa de *C. difficile* de alta virulencia ribotipo 017, toxinotipo VIII y serotipo F.

14. Uso del anticuerpo monoclonal, que se produce a partir de la línea celular de hibridoma depositada en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número DSM ACC2916 (TGC 19), en un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Uso del anticuerpo monoclonal, que se produce a partir de la línea celular de hibridoma depositada en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número DSM ACC2917 (TGC 23), en un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Uso del anticuerpo monoclonal, que se produce a partir de la línea celular de hibridoma depositada en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número DSM ACC2915 (TGC 16), en un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13, en particular de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 13.

17. Uso del anticuerpo monoclonal, que se produce a partir de la línea celular de hibridoma depositada en la DSMZ, Braunschweig, Alemania, con el número DSM ACC2918 (TGC 35), en un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13.

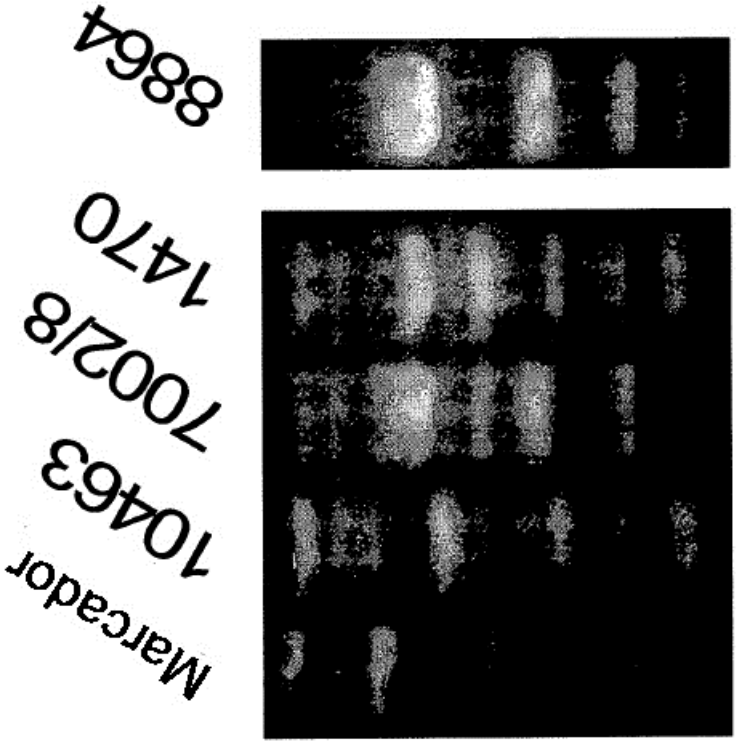

Fig. 1

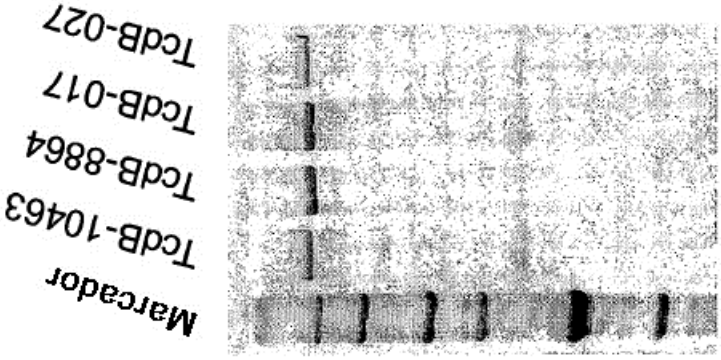

Fig. 2

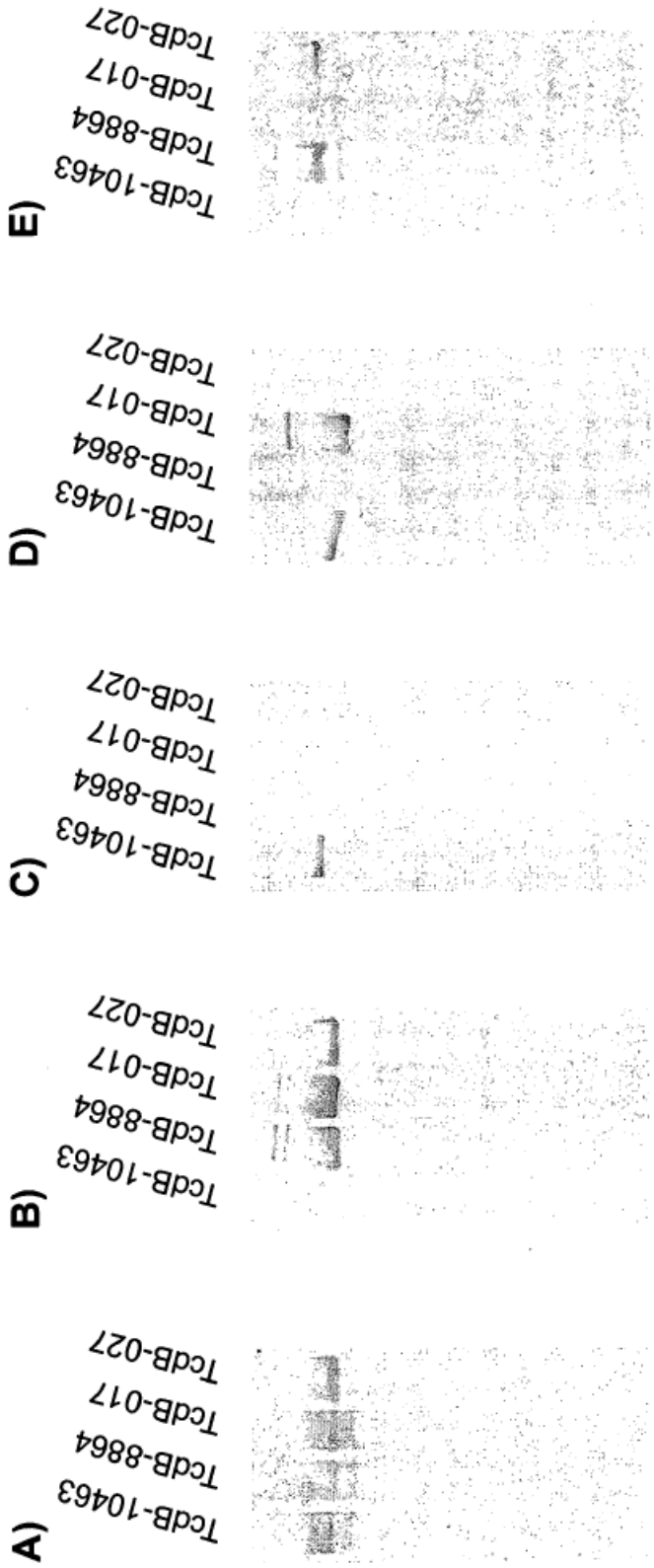
A)
TcdB-10463
TcdB-8864
TcdB-017
TcdB-027
B)
TcdB-10463
TcdB-8864
TcdB-017
TcdB-027
C)
TcdB-10463
TcdB-8864
TcdB-017
TcdB-027
D)
TcdB-10463
TcdB-8864
TcdB-017
TcdB-027
E)
TcdB-10463
TcdB-8864
TcdB-017
TcdB-027

Fig. 3

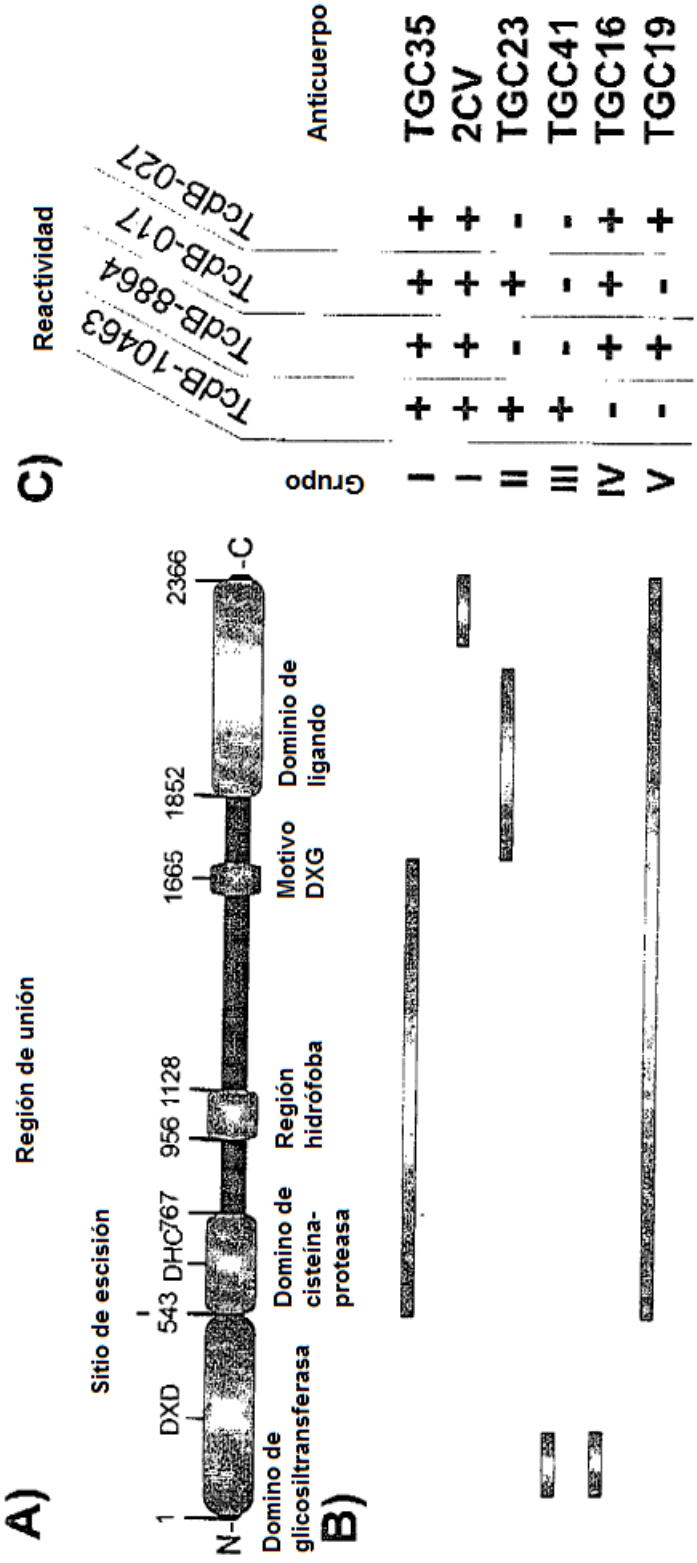
A)
Región de unión
Sitio de escisión
1
DXD
543
DHC767
956
1128
1665
1852
2366
N-
-C
Domino de glicosiltransferasa
Domino de cisteína-proteasa
Región hidrófoba
Motivo DXG
Dominio de ligando
B)
C)
Reactividad
Grupo
TcdB-10463
TcdB-8864
TcdB-017
TcdB-027
Anticuerpo
I + + + +
I + + + +
II + + - +
III + - - -
IV - + + -
V - + + +
TGC35
2CV
TGC23
TGC41
TGC16
TGC19

Fig. 4

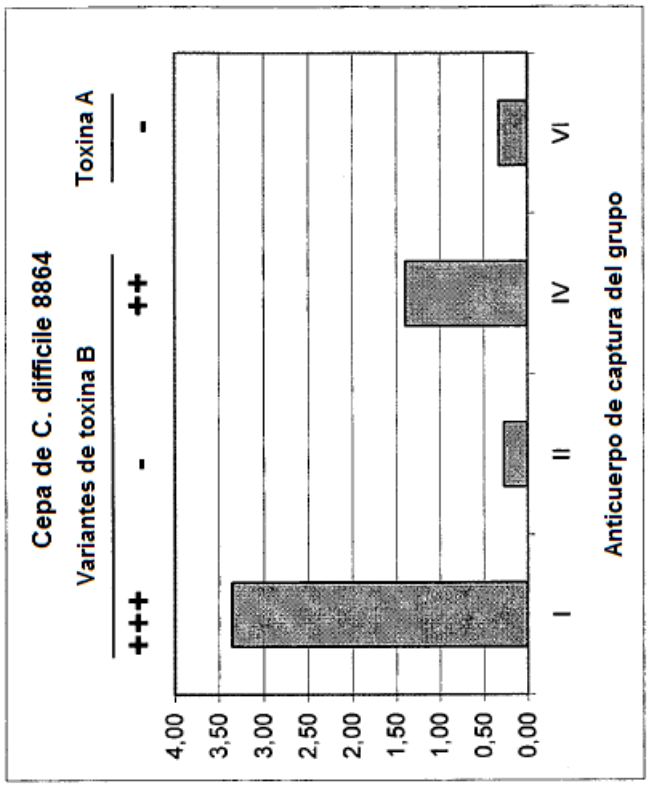
Cepa de C. difficile 8864
Variantes de toxina B
Toxina A
+++
-
++
-
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
I
II
IV
VI
Anticuerpo de captura del grupo

Fig. 5 B

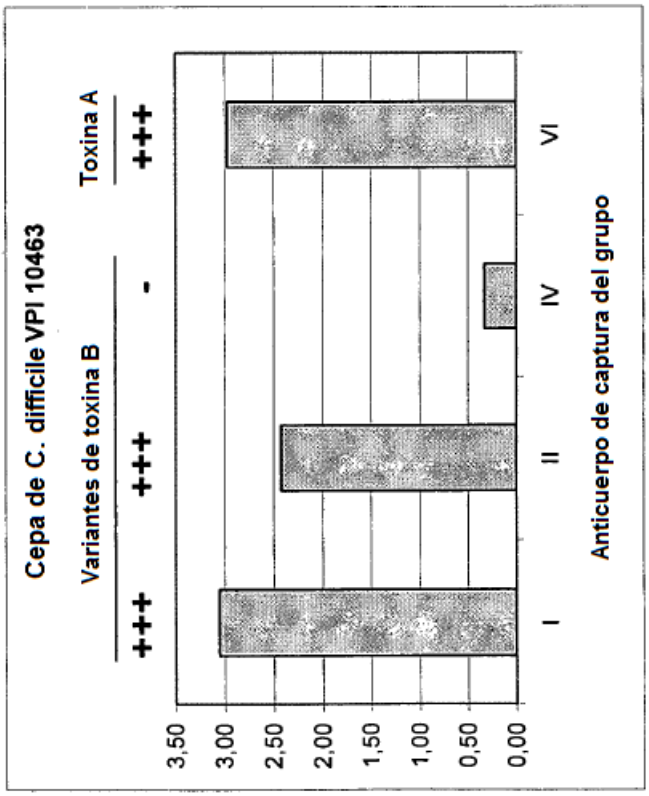
Cepa de C. difficile VPI 10463
Variantes de toxina B
Toxina A
+++
+++
-
+++
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
I
II
IV
VI
Anticuerpo de captura del grupo

Fig. 5 A

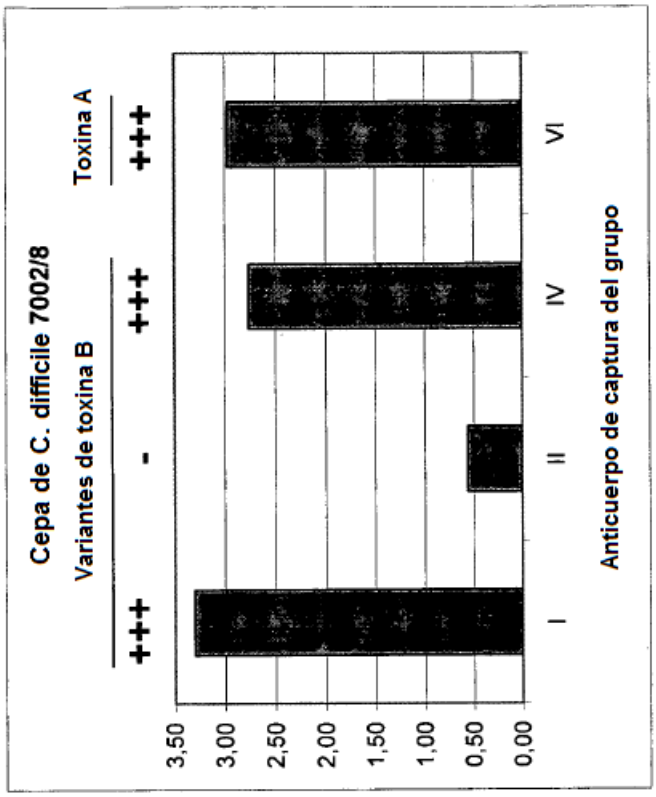
Cepa de C. difficile 7002/8
Variantes de toxina B
+++
-
+++
Toxina A
+++
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
I
II
IV
VI
Anticuerpo de captura del grupo

Fig. 5 D

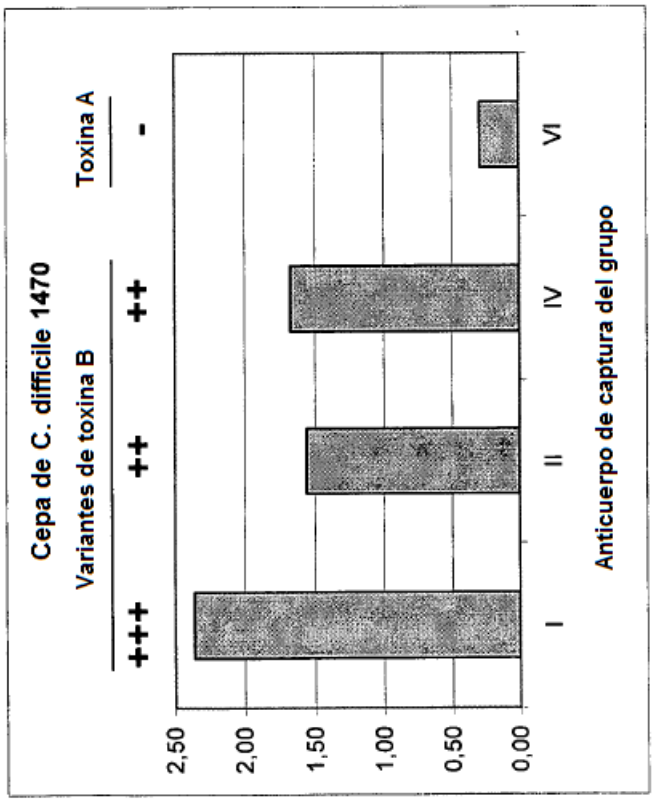
Cepa de C. difficile 1470
Variantes de toxina B
+++
++
++
Toxina A
-
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
I
II
IV
VI
Anticuerpo de captura del grupo

Fig. 5 C

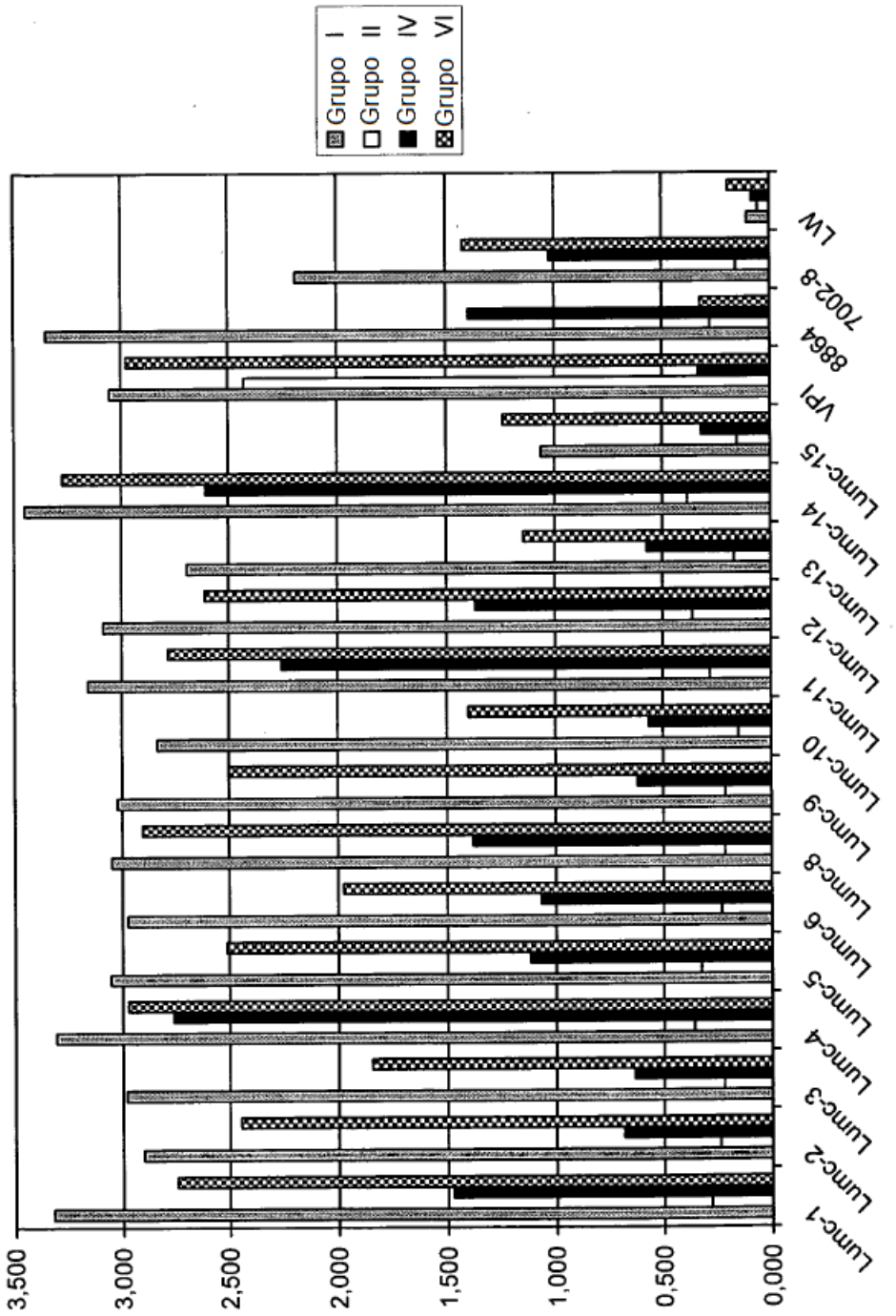
Grupo I
Grupo II
Grupo IV
Grupo VI
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
Lumc-1
Lumc-2
Lumc-3
Lumc-4
Lumc-5
Lumc-6
Lumc-8
Lumc-9
Lumc-10
Lumc-11
Lumc-12
Lumc-13
Lumc-14
Lumc-15
VPI
8864
7002-8
LV

Fig. 6 A

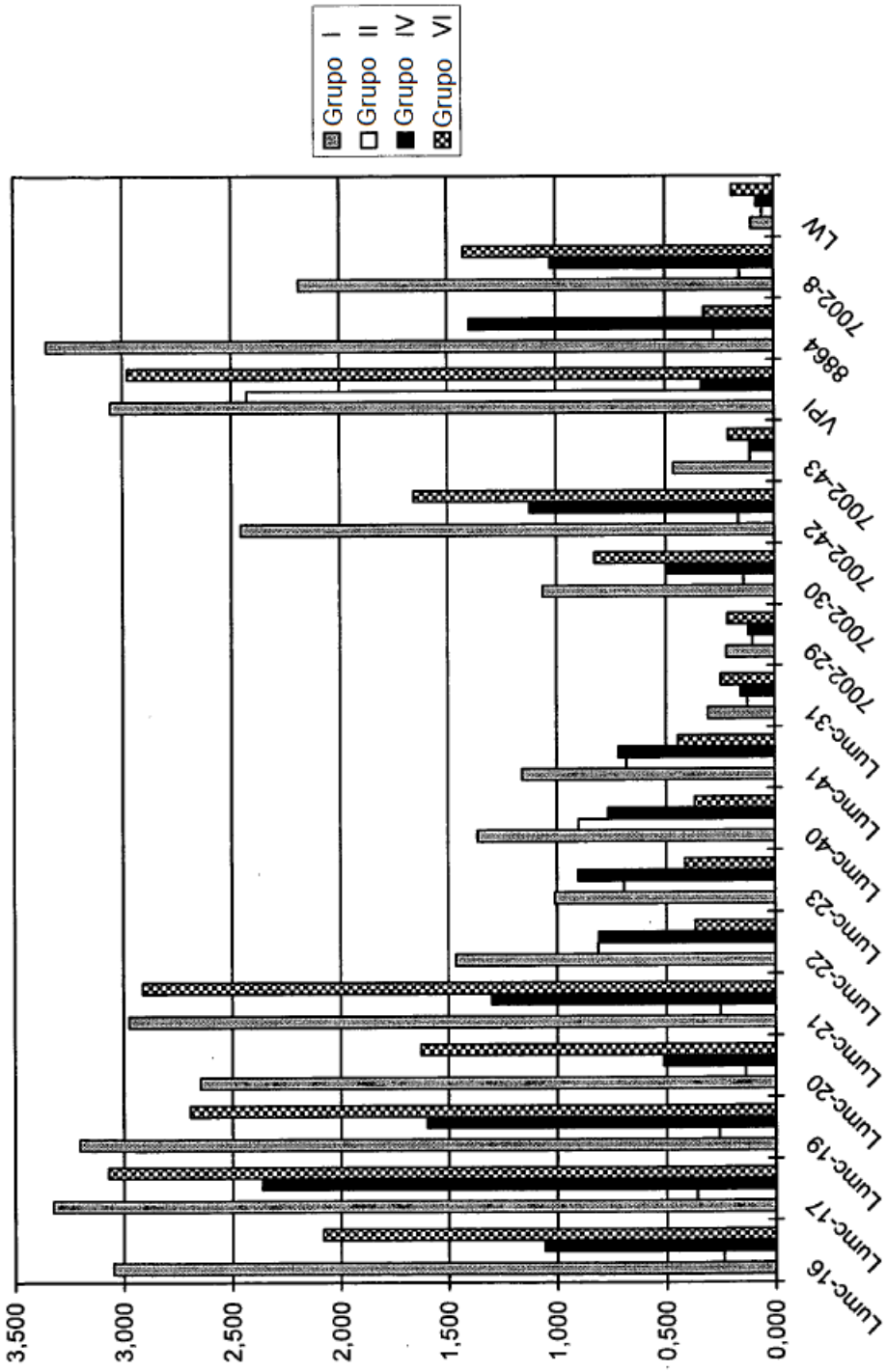
Grupo I
Grupo II
Grupo IV
Grupo VI
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
Lumc-16
Lumc-17
Lumc-19
Lumc-20
Lumc-21
Lumc-22
Lumc-23
Lumc-40
Lumc-41
Lumc-31
7002-29
7002-30
7002-42
7002-43
VPI
8864
7002-8
LV

Fig. 6 B