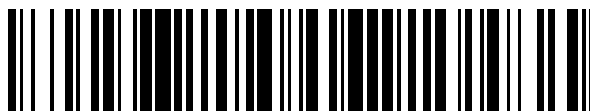


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 468**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/689** (2008.01)

**C12Q 1/6844** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2014 PCT/EP2014/058257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14173963**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2014 E 14722601 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2989212**

54 Título: **Método de amplificación de ADN basado en invasión de cadena**

30 Prioridad:

**25.04.2013 EP 13275100**

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

**25.10.2018**

73 Titular/es:

**ORION DIAGNOSTICA OY (100.0%)**

**PO Box 83  
02101 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**FILÉN, SANNA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 687 468 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

Método de amplificación de ADN basado en invasión de cadena

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para detectar *Clostridium difficile* (*C. difficile*) toxígeno mediante amplificación de ADN basada en invasión de cadena. La invención también se refiere a oligonucleótidos, composiciones y kits adecuados para su uso en este método, y su uso para detección de *C. difficile* toxígeno.

10

**Antecedentes de la invención**

Los clostridios son bacterias anaerobias, grampositivas, formadoras de esporas. Las especies patógenas de clostridios producen toxinas proteicas de las que el grupo de citotoxinas clostridiales grandes (LCT) consiste en toxinas muy grandes con alta toxicidad *in vivo* así como alta homología estructural y de secuencia (von Eichel-Streiber *et al.*, 1996). Las toxinas A y B de *C. difficile* son la causa principal de patogenia de *C. difficile*. Durante mucho tiempo la toxina A se ha considerado el principal factor de virulencia, pero cada vez más pruebas muestran que de hecho la toxina B desempeña un papel principal en infecciones por *C. difficile* (Lyras *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2012).

15

20

Las toxinas A y B de *C. difficile* están codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente, y los genes están localizados en un locus de patogenia de ~19,6 kb (PaLoc). El PaLoc contiene también dos genes reguladores, concretamente *tcdC* y *tcdR*, que actúan como reguladores negativos y positivos, respectivamente, de expresión de toxina. *tcdE*, también incluido en el PaLoc, codifica una proteína de tipo holina necesaria para secreción de toxina A y B. En cepas no toxígenas el PaLoc se reemplaza con una secuencia de 115 pb (Braun *et al.*, 1996). Se ha usado amplificación de ADN para la detección de cepas de *C. difficile* toxígenas (Wren *et al.*, 1990; McMillin *et al.*, 1991; McMillin *et al.*, 1992).

25

30

Un proceso de amplificación de ADN isotérmico que se basa en un cebador cadena arriba, un cebador cadena abajo y un sistema de invasión de cadena se describe en el documento WO 2009/150467.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a la detección de una secuencia de ácido nucleico de *C. difficile* toxígeno, para permitir determinar la presencia de *C. difficile* toxígeno en una muestra. Los métodos de la invención usan un cebador cadena arriba, un cebador cadena abajo y un oligonucleótido de invasión de cadena, comprendiendo cada uno una región complementaria de dicha secuencia de ácido nucleico diana. En combinación, los cebadores y oligonucleótido de invasión de cadena posibilitan la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana. El oligonucleótido de invasión de cadena hace al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión del cebador cadena arriba y cebador cadena abajo, permitiendo de este modo la amplificación de ADN. Normalmente, la amplificación se realiza en condiciones isotérmicas, sin una necesidad de desnaturalización térmica de ADN bicatenario.

35

40

Si se detecta amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, esto es indicativo de que una cepa toxígena del patógeno diana *C. difficile* está presente en la muestra, y no una cepa no toxígena, no patógena de *C. difficile*, u otra especie de clostridio. Los inventores han mostrado que el método de la invención permite la detección altamente específica y sensible de diferentes secuencias de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxígeno.

45

La invención proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxígeno en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con al menos un cebador cadena arriba, al menos un cebador cadena abajo y al menos un oligonucleótido de invasión de cadena en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana, en el que cada uno de dicho cebador y dicho oligonucleótido comprende una región complementaria de dicha secuencia de ácido nucleico diana; en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena hace al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión de dicho cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo, y en el que dicho cebador cadena arriba es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, en el que dicho cebador cadena abajo es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, y en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena es un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud, en el que dicho oligonucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o es una variante que comprende una región complementaria de diana que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4, o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4, y en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.

50

55

60

65

La invención proporciona además un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxígeno en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con al menos un cebador cadena arriba, al menos un cebador cadena abajo y al menos un oligonucleótido de invasión de cadena en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana,

5 en el que cada uno de dicho cebador y dicho oligonucleótido de invasión de cadena comprende una región complementaria de dicha secuencia de ácido nucleico diana;

en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena hace al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión de dicho cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo; y

10 en el que dicho cebador cadena arriba es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 7, en el que dicho cebador cadena abajo es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 8, y en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena es un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud, en el que dicho oligonucleótido

15 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o es una variante que comprende una región complementaria de diana que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9, o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9, y en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.

20 La invención proporciona además una composición y un kit, comprendiendo cada uno un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 4, o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4 y que comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.

25 La invención proporciona además una composición y un kit comprendiendo cada uno un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 7, un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 y un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9 y que comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.

30 La invención proporciona además una composición y un kit comprendiendo cada uno un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 7, un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 y un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9 y que comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.

35 La invención proporciona además uso de un cebador cadena arriba, un cebador cadena abajo y un oligonucleótido de invasión de cadena, cada uno como se define en un método de la invención descrito anteriormente, en un método para detección de *C. difficile*.

40 La invención proporciona adicionalmente un método para diagnóstico de una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprende llevar a cabo un método para detectar una secuencia de ácido nucleico de *C. difficile* toxígeno según la invención en una muestra de dicho sujeto.

45 La invención proporciona adicionalmente un método para diagnóstico de una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprende llevar a cabo un método para detectar una secuencia de ácido nucleico de *C. difficile* toxígeno según la invención en una muestra de dicho sujeto.

### Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 muestra: (A) una representación de amplificación de ensayo de *tcdB*. Se usó SybrGreen I para detección y se midió la fluorescencia con instrumento de PCR en tiempo real. Eje X: tiempo (minutos), eje Y: fluorescencia de SybrGreen I (intensidad de fluorescencia, unidades arbitrarias). Traza superior: 10 000 copias genómicas (cp) de ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* BAA-1382 (630) usado como molde en ensayo de SIBA de *tcdB*. Traza inferior = El control sin molde (NTC) no se amplificó. (B) Análisis de curva de fusión de reacción de *tcdB*. Eje X: Temperatura (grados centígrados), eje Y: (-d(fluorescencia)/d(temperatura), unidades arbitrarias). El análisis de curva de fusión postamplificación con SybrGreen I mostró amplificación de un único amplicón específico en reacción de *tcdB* con ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* BAA-1382 (630) como molde. El control sin molde (NTC) no muestra ninguna amplificación. (C) Electroferograma de reacción de *tcdB* positiva y negativa. Eje X: índice de migración (%), donde el marcador inferior es 0 % y el marcador superior es 100 %, eje Y (intensidad de fluorescencia, unidades arbitrarias). Traza inferior = 10 000 cp de ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* BAA-1382 (630) usado como molde en ensayo de *tcdB*. Traza superior = sin molde de control (NTC). Las reacciones de *tcdB* se analizaron con sistema de electroforesis de microchip MultiNA. Solamente se detectaron oligonucleótidos de reacción (cebadores inv y dir y oligo invasor) de reacción de NTC mientras que un producto de amplificación específico se detectó de reacción de *tcdB* en la que se usaron 10 000 cp de ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* como molde.

55 La Figura 2 muestra: (A) Especificidad de ensayo de *tcdB*. Eje X: tiempo (minutos), eje Y: fluorescencia de

60

65

La Figura 2 muestra: (A) Especificidad de ensayo de *tcdB*. Eje X: tiempo (minutos), eje Y: fluorescencia de

60

65

La Figura 2 muestra: (A) Especificidad de ensayo de *tcdB*. Eje X: tiempo (minutos), eje Y: fluorescencia de

60

65

SybrGreen I (intensidad de fluorescencia, milivoltios, mV). Se usaron 10 000 cp de ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* BAA-1382 (630) y 10 000 cp de ADN<sub>g</sub> de *C. sordellii* ATCC 9714 como moldes para reacción de *tcdB*. Solamente se amplificó y detectó ADN<sub>g</sub> de *C. difficile*. El control sin molde (NTC) no muestra ninguna amplificación. (B) Sensibilidad de ensayo de *tcdB*. Eje X: tiempo (minutos), eje Y: fluorescencia de SybrGreen I (intensidad de fluorescencia, unidades arbitrarias). Se determinó la sensibilidad de ensayo de *tcdB* usando una serie de diluciones de ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* BAA-1382 (630) como molde. 10 - 10 000 cp de ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* mostraron amplificación medida por aumento de la fluorescencia de SybrGreen I mientras que reacciones de control sin molde (NTC) y de control negativo no se amplificaron. Todas las reacciones se realizaron en presencia de 0,5 ng/μl de ADN de esperma de arenque.

La Figura 3 muestra: (A) Inclusividad de ensayo de *tcdB*. Eje X: tiempo (minutos), eje Y: fluorescencia de SybrGreen I (intensidad de fluorescencia, unidades arbitrarias)]. Se usaron 2 ng de ADN<sub>g</sub> aislado de cultivos puros de *C. difficile* de toxinotipos 0, III, VIII y X como molde para ensayo de *tcdB*. NTC (Control sin molde). Todos los toxinotipos ensayados proporcionaron un resultado de amplificación positivo. (B) Inclusividad de ensayo de *tcdB* para un panel de toxinotipos, detalles como en (A) anterior, pero usando 2 ng de ADN<sub>g</sub> aislado de cultivos puros de *C. difficile* de toxinotipos 0, I, II, IIIa, IIIb, IIIc, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XIa, XIb, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII; XIX, XX, XXI; XXII; XXIII; XXIV, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII y XXXIII. Solamente dos toxinotipos, concretamente XIa y XIb, proporcionaron un resultado de amplificación negativo. (C) Análisis de curva de fusión de reacciones de *tcdB* con molde de ADN<sub>g</sub> aislado de diferentes toxinotipos de *C. difficile* como en (A). Eje X: Temperatura (grados centígrados), eje Y: (-d(fluorescencia)/d(temperatura)), unidades arbitrarias. Todos los toxinotipos de *C. difficile* mostraron amplificación de un único amplicón. El control sin molde (NTC) no muestra ninguna amplificación. (D) Análisis de curva de fusión, detalles como en (C) anterior, para el panel de toxinotipos de (B). El análisis de curva de fusión también mostró ausencia de amplificación para toxinotipos XIa y XIb.

La Figura 4 muestra: (A) Representación de amplificación de ensayo de *tcdA*. Se usó SybrGreen I para detección y se midió la fluorescencia con instrumento de PCR en tiempo real. Eje X: tiempo (minutos), eje Y: fluorescencia de SybrGreen I (intensidad de fluorescencia, unidades arbitrarias). Se observó amplificación con 100 - 10 000 cp/reacción de ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* BAA-1382 (630) y ausencia de amplificación observada en presencia de 0-10 cp/reacción de ADN<sub>g</sub> de *C. difficile* y con control sin molde (NTC). (B) Análisis de curva de fusión de ensayo de *tcdA*. Eje X: Temperatura (grados centígrados), eje Y: (-d(fluorescencia)/d(temperatura)), unidades arbitrarias). El análisis de curva de fusión muestra amplificación de un único amplicón específico. El control sin molde (NTC) no muestra ninguna amplificación.

### **Descripción de las secuencias**

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de una región diana de *tcdB*.  
 SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo de *tcdB*.  
 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de *tcdB*.  
 SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido invasor de cadena de *tcdB*.  
 SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido invasor de cadena de *tcdB* modificado.  
 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos de una región diana de *tcdA*.  
 SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo de *tcdA*.  
 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de *tcdA*.  
 SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido invasor de cadena de *tcdA*.  
 SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido invasor de cadena de *tcdA* modificado.

### **Descripción detallada de la invención**

Debe entenderse que diferentes solicitudes de los métodos desvelados pueden adaptarse a las necesidades específicas en la técnica. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares de la invención, y no se pretende que sea limitante.

### **Método de detección de *C. difficile* toxígeno en una muestra**

#### *Muestra*

Habitualmente, la muestra es una muestra clínica, por ejemplo una muestra obtenida de un paciente que se sospecha que tiene, o que tiene una infección por *C. difficile*. Sin embargo, se puede usar cualquier muestra, siempre que pueda obtenerse o extraerse ácido nucleico de la muestra. Por lo tanto, pueden usarse muestras de referencia de cepas de *C. difficile* particulares, o pueden usarse muestras ambientales en la presente invención. Los tipos adecuados de muestra clínica varían según el tipo particular de infección que está presente, o se sospecha que está presente, en un sujeto. La muestra puede ser sangre, plasma, suero, orina o una muestra de heces. En una realización preferida, la muestra es una muestra de heces. La muestra de heces puede tomarse de un sujeto que tiene una infección del tracto gastrointestinal. La infección puede estar presente en un paciente que tiene diarrea.

En realizaciones preferidas, las muestras se toman de sujetos animales, tales como sujetos mamíferos. Las muestras se tomarán habitualmente de sujetos humanos, pero la presente invención también es aplicable en general

a animales domésticos, ganado, aves y peces. Por ejemplo, la invención puede aplicarse en una situación veterinaria o agrícola.

La muestra comprende ácido nucleico que puede ser ADN o ARN. Si el ácido nucleico está presente en la muestra en una forma adecuada que permite la detección según la invención, la muestra puede usarse directamente. Sin embargo, normalmente, el ácido nucleico procede, se obtiene o se extrae de la muestra. Se conocen bien en la técnica métodos para procesar muestras que contienen ácidos nucleicos, extraer ácidos nucleicos y/o purificar ácidos nucleicos para su uso en métodos de detección. Puede aislarse ácido nucleico total o puede aislarse ADN o ARN por separado.

Normalmente, una muestra se procesa de una manera apropiada de modo que se proporcione ácido nucleico en una forma conveniente para poner en contacto con los cebadores y el oligonucleótido de invasión de cadena. Cuando el ácido nucleico es ADN, el ADN se proporciona normalmente en forma bicatenaria. Cuando el ácido nucleico es un RNA, este se convierte normalmente a ADNc usando transcriptasa inversa o una polimerasa con actividad transcriptasa inversa. El ARN puede ser útil para detección bacteriana, debido al número muy grande de ribosomas presentes en células bacterianas que amplifican eficazmente la concentración de secuencias diana.

#### *Secuencia de ácido nucleico diana*

La secuencia de ácido nucleico diana es una región del genoma de *C. difficile* (o amplicón) adecuado para su uso en detección específica de *C. difficile* toxígeno. Esto permite una determinación inequívoca, altamente cualitativa, de la presencia de *C. difficile* toxígeno en la muestra, incluso si existen organismos estrechamente relacionados. La selección de secuencias de ácido nucleico diana específicas en cepas toxígenas de un patógeno específico y el diseño posterior de cebador y oligonucleótidos de invasión de cadena para detección de esas secuencias es una consideración importante. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de secuencias apropiadas.

Normalmente, la secuencia de ácido nucleico diana será única del genoma de *C. difficile*. La secuencia de ácido nucleico diana diferirá por lo tanto normalmente de cualquier secuencia de ácido nucleico homóloga en una especie relacionada, por ejemplo en una especie de *Clostridium* homóloga. Normalmente, la secuencia de ácido nucleico diana comprenderá varios desapareamientos con una secuencia de ácido nucleico homóloga en una especie relacionada. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en una especie de clostridio distinta de *C. difficile* que alberga genes para toxinas clostridiales grandes. La secuencia de ácido nucleico diana preferentemente no está presente en *C. sordellii* y/o *C. novyi*. La secuencia de ácido nucleico diana normalmente permite la detección específica de *C. difficile* de una muestra que contiene *C. difficile* y *C. sordellii* y/o *C. novyi*.

La secuencia de ácido nucleico diana normalmente tiene buena inclusividad para diferentes toxinotipos de *C. difficile* y por lo tanto está normalmente presente y puede detectarse en más de un toxinotipo de *C. difficile*. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico diana es inclusiva para al menos tres, más preferentemente al menos cinco, al menos siete, al menos diez, al menos quince, al menos veinte, al menos veinticinco, al menos treinta, al menos treinta y cinco, de forma más óptima para todos los toxinotipos de *C. difficile*. Los toxinotipos de *C. difficile* incluyen toxinotipos 0, I, II, IIIa, IIIb, IIIc, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XIa, XIb, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII; XIX, XX, XXI; XXII; XXIII; XXIV, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII y XXXIII, y cualquier otro toxinotipo descrito en la técnica o existente en la naturaleza. Normalmente, la secuencia de ácido nucleico diana es inclusiva para toxinotipos de *C. difficile* que se ha descubierto que son clínicamente relevantes en trastornos asociados con infección por *C. difficile*.

La secuencia de ácido nucleico diana normalmente tiene un mayor contenido de GC que el contenido promedio de GC del genoma de *C. difficile*, que es de 29,1 % para la cepa de referencia de *C. difficile* 630. La secuencia de ácido nucleico diana puede tener un contenido de GC de al menos 30 %, más preferentemente al menos 31 %, al menos 32 % o al menos 33 %. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en el gen *tcdA* o *tcdB*, el contenido promedio de GC de estos genes es de 27 % y por lo tanto los contenidos de GC preferidos anteriores también son mayores en comparación con el promedio para estos genes. El contenido de GC de la secuencia de ácido nucleico diana también se selecciona con respecto a la necesidad de unión de cebadores y fusión de la secuencia diana en las condiciones de temperatura isotérmica usadas.

La secuencia de ácido nucleico diana o amplicón es de una longitud suficiente para posibilitar la detección específica de *C. difficile* toxígeno y para hibridación de los cebadores cadena arriba y cadena abajo y el oligonucleótido de invasión de cadena de una manera adecuada para diferentes partes de la secuencia diana. Preferentemente, el amplicón es de al menos 45 nucleótidos de longitud, más preferentemente de al menos 50, al menos 55 o al menos 60 nucleótidos de longitud, como se mide del sitio 5' de unión del cebador cadena arriba al sitio 5' de unión del cebador cadena abajo.

La secuencia de ácido nucleico diana puede estar presente en cualquier región del genoma de *C. difficile*, siempre que tenga las características necesarias para detección específica de *C. difficile* como se ha analizado anteriormente. La secuencia de ácido nucleico diana puede estar presente en una región de ADN no codificante específica de *C. difficile* toxígeno o una región codificante específica de *C. difficile* toxígeno. La secuencia nucleica

diana puede estar presente en el locus de patogenia de *C. difficile*. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico diana está presente en el gen *tcdA* o el gen *tcdB* de *C. difficile*. Otros genes diana adecuados pueden incluir los genes *tcdC*, *tcdE*, *tcdR* en PaLoc o genes de toxina binarios de *C. difficile*. Están disponibles secuencias en los números de referencia enumerados para el genoma completo de *Clostridium difficile* 630 (GenBank: AM180355.1),  
 5 gen *tcdA* (AM180355.1: 795843-803975, gen *tcdB* (AM180355.1: 787393-794493).

La secuencia de ácido nucleico diana comprende preferentemente la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma (para detección de *tcdA*) o la SEQ ID NO: 6 o una variante de la misma (para detección de *tcdB*). Debería entenderse que la secuencia de ácido nucleico diana es una doble cadena que comprende una cadena con sentido  
 10 que representa la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma o la SEQ ID NO: 6 o una variante de la misma y una cadena antisentido complementaria. Los cebadores cadena arriba y cadena abajo usados para amplificar la secuencia de ácido nucleico diana se unen con cadenas opuestas de esta doble cadena.

La secuencia de ácido nucleico diana puede comprender una secuencia variante de origen natural de la SEQ ID NO:  
 15 1 o la SEQ ID NO: 6 que está presente en un toxinotipo diferente para la cepa de referencia de *C. difficile* 630. Se encuentran variantes de origen natural de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6 en las secuencias conocidas de toxinotipos de *C. difficile* diferentes y, por ejemplo, la secuencia correspondiente en algunos toxinotipos conocidos comprende 1, 2 o 3 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Los toxinotipos aún no secuenciados también pueden comprender desapareamientos con respecto a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6. Los inventores  
 20 han mostrado sorprendentemente que el método de la invención es inclusivo para la detección de una amplia serie de toxinotipos incluso en la existencia de dichos desapareamientos.

Variantes de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6 pueden comprender una región que es parcial o completamente complementaria de al menos 35 nucleótidos contiguos, más normalmente al menos 40, preferentemente al menos  
 25 45 o al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6. Las variantes pueden comprender una región que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más desapareamientos (sustituciones) con respecto a una región de la secuencia diana original correspondiente de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6. Por lo tanto, por ejemplo las variantes pueden comprender una región de al menos 35 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o  
 30 6 desapareamientos, tal como de 1-3 o 1-5 desapareamientos, con una región correspondiente de al menos 35 nucleótidos contiguos de la secuencia diana original correspondiente. Las variantes pueden comprender una región de al menos 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, tal como 1-5 o 1-8 desapareamientos con una región correspondiente de una longitud equivalente en la secuencia diana original correspondiente. Cualquier desapareamiento en la secuencia variante puede ser a al menos 2, al menos 4, al menos  
 35 5 o al menos 10 nucleótidos de distancia.

Como alternativa, Las variantes pueden comprender una región de al menos 35, 40 o 45 nucleótidos de longitud que es completamente complementaria de la secuencia diana original.

Más preferentemente, la secuencia de ácido nucleico diana comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6 o  
 40 consiste en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6 y una cadena antisentido complementaria.

Puede detectarse más de una secuencia de ácido nucleico diana en un método de la invención, proporcionando dos o más conjuntos de cebador cadena arriba, cebador cadena abajo y oligonucleótido de invasión de cadena, cada conjunto adaptado para detección de una secuencia de ácido nucleico diana diferente. Por ejemplo, un método de la  
 45 invención puede detectar tanto *tcdB* como *tcdA*.

#### *Cebadores cadena arriba y cadena abajo*

Los cebadores cadena arriba y cadena abajo adecuados se seleccionan basándose en la secuencia de ácido  
 50 nucleico diana de interés y teniendo en cuenta el sitio de unión del oligonucleótido de invasión de cadena que hace al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión del cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo.

Los cebadores cadena arriba y cadena abajo comprenden una secuencia que es parcial o completamente complementaria de la diana y opcionalmente una secuencia no complementaria 5' y/o 3' flanqueante. Como  
 55 alternativa, los cebadores cadena arriba y cadena abajo pueden consistir totalmente en secuencia parcial o completamente complementaria de la diana. La longitud de la secuencia de cebador que es complementaria de la diana es suficiente para proporcionar hibridación específica con la secuencia de ácido nucleico diana. La longitud de secuencia complementaria es normalmente al menos 10 nucleótidos, más preferentemente al menos 15, al menos  
 60 16 o al menos 17 nucleótidos. La longitud de secuencia complementaria puede ser 10-25, 15-25, 10-30 o 15-30 nucleótidos.

Debería entenderse que las longitudes de secuencia anteriores se refieren a partes de los cebadores que pueden ser parcial o completamente complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana. Pueden estar presentes  
 65 desapareamientos entre los cebadores y la secuencia diana en posiciones particulares permitiendo aún al mismo tiempo la amplificación y detección específica de la secuencia diana, en particular teniendo en cuenta el uso

combinado de cebadores cadena arriba y cadena abajo y un oligonucleótido de invasión de cadena para conseguir la amplificación. Puede haber 1, 2, 3, 4 o 5 desapareamientos entre la región complementaria del cebador y la región correspondiente de la secuencia diana.

- 5 Preferentemente, el cebador se diseña para permitir la detección específica de *C. difficile* toxígeno. Por lo tanto, el cebador normalmente hibrida de forma específica o selectiva con una secuencia complementaria hallada solamente en *C. difficile* toxígeno. Sin embargo, el cebador también puede hibridar con otras secuencias, tales como secuencias halladas en otras especies de clostridio, siempre que cuando se usen en combinación con el segundo cebador y oligonucleótido de invasión de cadena, se obtenga amplificación específica de una secuencia hallada  
10 solamente en *C. difficile* toxígeno.

La hibridación específica o selectiva se refiere a la unión de un cebador solamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones dadas, cuando esa secuencia está presente en un ácido nucleico en una muestra, tal como una mezcla biológica compleja que incluya ADN o ARN total celular y ajeno. Se conocen en la técnica condiciones de hibridación apropiadas. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsche y Maniatis "Molecular Cloning: A Laboratory  
15 Manual", 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press (1989). También se proporcionan condiciones de hibridación apropiadas en los ejemplos posteriores. Como es conocido por los expertos, las condiciones de hibridación apropiadas pueden variar dependiendo de la longitud de una sonda y su composición básica. Se realiza hibridación normalmente a la misma temperatura que amplificación y, por lo tanto, también depende del perfil de actividad de las enzimas polimerasa y recombinasa empleadas.  
20

El cebador cadena arriba y cadena abajo será de menos de 30 nucleótidos de longitud en total, más preferentemente menos de 25 nucleótidos de longitud, tal como de 15 a 25 o de 15 a 23 nucleótidos de longitud. Se usan cebadores de menos de 30 nucleótidos de longitud cuando se use una recombinasa para invasión de cadena.  
25 Los cebadores no son capaces de actuar como sustratos para recombinasas.

El cebador cadena arriba (o directo) se une con la región 5' de una cadena de la secuencia de ácido nucleico diana de doble cadena, en una posición próxima o solapante con el sitio de unión 5' del oligonucleótido de invasión de cadena. El cebador cadena abajo (o inverso) se une con la región 5' de la cadena opuesta de la secuencia de ácido  
30 nucleico diana de doble cadena para el cebador cadena arriba, en una posición próxima o solapante con el sitio de unión 3' del oligonucleótido de invasión de cadena. Los sitios de unión 5' de los cebadores cadena arriba y cadena abajo están normalmente a al menos 45 nucleótidos, más preferentemente de al menos 50, al menos 55 o al menos 60 nucleótidos de distancia en la secuencia diana de doble cadena.

El cebador de cadena arriba y/o cadena abajo puede tener una región de solapamiento de secuencias con la secuencia del oligonucleótido de invasión de cadena. La región de solapamiento de secuencias es normalmente de 1-8 nucleótidos de longitud y puede ser de al menos 5 o al menos 6 nucleótidos de longitud. El cebador cadena  
40 abajo también puede tener una región de solapamiento de secuencias de 1-8 nucleótidos de longitud con la secuencia del oligonucleótido de invasión de cadena.

Como alternativa, puede no haber solapamiento de secuencias entre el cebador cadena arriba y/o cadena abajo y el oligonucleótido de invasión de cadena, con la unión de cebador en cambio en una posición que está próxima en la secuencia diana al sitio de unión del oligonucleótido de invasión de cadena.

45 Cuando un cebador se une próximo al oligonucleótido de invasión de cadena, normalmente hay 25 nucleótidos o menos, más preferentemente 20 nucleótidos o menos, 15 nucleótidos o menos o 10 nucleótidos o menos entre el sitio de unión relevante del oligonucleótido de invasión de cadena y el extremo 5' del cebador. Esto asegura que el cebador sea capaz de hibridar con la región monocatenaria creada por unión del oligonucleótido de invasión de cadena.  
50

Se proporcionan en el presente documento ejemplos específicos de cebadores cadena arriba y cadena abajo adecuados para unión de secuencias de ácido nucleico diana en los genes *tcdA* y *tcdB* de *C. difficile*. Los cebadores cadena arriba y cadena abajo para detección de la secuencia diana de *tcdB* de la SEQ ID NO: 1 son los cebadores de las SEQ ID NO: 2 y 3, o variantes de las mismas. Son cebadores cadena arriba y cadena abajo preferidos para  
55 detección de la secuencia diana de *tcdE* de la SEQ ID NO: 6 los cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 8, o variantes de las mismas.

Las variantes de las SEQ ID NO: 2, 3, 7 y 8 pueden ser oligonucleótidos de hasta 30 nucleótidos de longitud que comprenden una región que es parcial o completamente complementaria de al menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia de cebador original correspondiente de las SEQ ID NO: 2, 3, 7 u 8. Preferentemente, dichas variantes comprenderán al menos una región que es parcial o completamente complementaria de al menos 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de cebador original correspondiente de las SEQ ID NO: 2, 3, 7 u 8. Cuando la secuencia de cebador original sea mayor de 16 nucleótidos de longitud, tal como hasta 21 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 2) las variantes pueden comprender de forma correspondiente una región que es parcial o  
60 completamente complementaria de 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de la misma.  
65

Las variantes anteriores pueden comprender una región que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 desapareamientos (sustituciones) con respecto a la región correspondiente de la secuencia de cebador original (y por lo tanto la secuencia diana) y por lo tanto es parcialmente complementaria de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, las variantes pueden comprender una región de al menos 10 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2 o 3 desapareamientos, tal como 1 o 2  
 5 desapareamientos con una región correspondiente de al menos diez nucleótidos contiguos de la secuencia de cebador original correspondiente. Las variantes pueden comprender una región de al menos 13, 14 o 15 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 desapareamientos, tal como 1-3 desapareamientos con una región correspondiente de una longitud equivalente en la secuencia de cebador original correspondiente. Cualquier  
 10 desapareamiento en la secuencia de cebador variante puede ser a al menos 2, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 nucleótidos de distancia.

Como alternativa, Las variantes pueden comprender una región de al menos 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos de longitud que es completamente complementaria de la secuencia de cebador original.

15 Las variantes de las SEQ ID NO: 2, 3, 7 y 8 también pueden ser oligonucleótidos de hasta 30 nucleótidos de longitud que tienen al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la secuencia de cebador original correspondiente, preferentemente al menos 75 %, al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % de identidad de secuencia.

20 Además, los cebadores variantes pueden comprender una secuencia de nucleótidos 5' o 3' flanqueante del gen *tcdA* o *tcdB* con respecto a la región de unión de los cebadores originales, tal como 5-10 nucleótidos de la región 5' flanqueante y/o región 3. Los cebadores variantes pueden comprender además una secuencia no relacionada con la secuencia diana.

25 Cualquier cebador cadena arriba o cadena abajo usado en la invención puede comprender uno o más nucleótidos modificados y/o un marcador detectable, por ejemplo un colorante fluorescente.

*Oligonucleótido de invasión de cadena*

30 Un oligonucleótido de invasión de cadena adecuado se selecciona basándose en la secuencia de ácido nucleico diana de interés y teniendo en cuenta el sitio de unión de los cebadores cadena arriba y cadena abajo y la necesidad de que el oligonucleótido de invasión de cadena haga la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria en las regiones relevantes para permitir la unión del cebador cadena arriba y el cebador cadena abajo.

35 El oligonucleótido de invasión de cadena comprende una secuencia que es complementaria de la diana y opcionalmente secuencia o secuencias no complementarias flanqueantes adicionales. La longitud de la secuencia que es complementaria de la diana puede ser determinada por el experto en la materia de forma empírica y es suficiente para posibilitar una invasión de cadena eficaz de la secuencia de ácido nucleico diana, opcionalmente en condiciones isotérmicas. La secuencia complementaria puede comprender pares de bases complementarios de  
 40 ARN-ADN y nucleótidos modificados. Normalmente, la longitud de secuencia complementaria es de al menos 25 o al menos 27 nucleótidos, normalmente al menos 30 nucleótidos, tal como al menos 32, al menos 33 o al menos 35 nucleótidos, más preferentemente al menos 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud o mayor. La longitud de secuencia complementaria puede ser de 30-50, 32-50, 35-50, 40-50, de 35 a 48, de 35 a 46, de 38 a 45 o de 40 a 45  
 45 nucleótidos de longitud.

Debería entenderse que las longitudes de secuencia anteriores se refieren a una parte del oligonucleótido de invasión de cadena que puede ser parcial o completamente complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana. Pueden estar presentes desapareamientos entre el oligonucleótido de invasión de cadena y la secuencia diana en posiciones particulares permitiendo aún al mismo tiempo la amplificación y detección específica de la  
 50 secuencia diana, en particular teniendo en cuenta el uso combinado de cebadores cadena arriba y cadena abajo y un oligonucleótido de invasión de cadena para conseguir la amplificación. Puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 desapareamientos entre la región complementaria del oligonucleótido de invasión de cadena y la región correspondiente de la secuencia diana, dependiendo de la longitud total de la secuencia complementaria.

55 Preferentemente, la secuencia complementaria del oligonucleótido de invasión de cadena se diseña para permitir la detección específica de *C. difficile* toxígeno. Por lo tanto, el oligonucleótido de invasión de cadena preferentemente hibrida de forma específica o selectiva con una secuencia complementaria hallada solamente en *C. difficile* toxígeno. Sin embargo, el oligonucleótido de invasión de cadena también puede hibridar con otras secuencias, tales como secuencias halladas en otras especies de clostridio, siempre que, cuando se usen en combinación con los  
 60 cebadores, se obtenga amplificación específica de una secuencia hallada solamente en *C. difficile* toxígeno.

La secuencia complementaria del oligonucleótido de invasión de cadena hibrida con una parte de la secuencia diana intermedia en las regiones de unión para los cebadores cadena arriba y cadena abajo (y normalmente solapantes con una o más de las mismas). El oligonucleótido de invasión de cadena puede tener una región de solapamiento de  
 65 1-8 nucleótidos, tal como una región de al menos 5 o al menos 6 nucleótidos de longitud, con los cebadores cadena arriba y/o cadena abajo.



La parte 5' de la secuencia complementaria del oligonucleótido de invasión de cadena normalmente se une a una distancia de 25 nucleótidos o menos, más preferentemente 20 nucleótidos o menos del límite 5' de la secuencia de nucleótidos diana de doble cadena para fundir (el amplicón).

5 El oligonucleótido de invasión de cadena comprende opcionalmente además región o regiones de secuencia no complementaria para la diana que flanquean la región de secuencia complementaria. El oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender una región 5' no complementaria que puede ser de cualquier secuencia de nucleótidos. La región no complementaria 5' es normalmente de al menos 3 nucleótidos de longitud, más  
10 normalmente al menos 6, al menos 8, preferentemente al menos 10, al menos 12 o al menos 14 nucleótidos de longitud. La región 5' no complementaria puede ayudar a la unión de recombinasa. El oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender una región 3' no complementaria normalmente de 1-3 nucleótidos de longitud que bloquea la extensión por polimerasa tal como invdT.

15 El oligonucleótido de invasión de cadena es normalmente de al menos 30 nucleótidos de longitud cuando se use una recombinasa junto con el oligonucleótido. El oligonucleótido de invasión de cadena es preferentemente de al menos 35, al menos 40 o al menos 45 nucleótidos de longitud, más preferentemente al menos 50 y puede ser de al menos 55 nucleótidos de longitud o mayor. El oligonucleótido de invasión de cadena puede ser de 40-70, 45-70, 45-70, 50-70, 55-70, 45-65, 50-65, 50-60 o 55-65 nucleótidos de longitud.

20 El oligonucleótido de invasión de cadena tiene un extremo 3' no extensible, de modo que no puede actuar como un sustrato para amplificación de ADN y la secuencia diana se amplifica entonces solamente tras la unión posterior de los cebadores cadena arriba y cadena abajo específicos. Esto evita la formación de productos de amplificación no específicos. El oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más nucleótidos modificados en su región 3', tal como en los 10-15 o 10-20 nucleótidos del extremo 3'. El  
25 oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender una modificación 3' del nucleótido 3' terminal y puede ser un didesoxinucleótido o comprender un grupo 3'amino-alilo, un espaciador 3'carbono, 3'fosfato, 3'biotina, 3'sialilo o 3'tiol. El nucleótido 3' puede ser un nucleótido incorporado en una orientación inversa por un enlace 3'3'. Como alternativa o además, la región 3' del oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender nucleótidos con poca capacidad de sustrato para ADN polimerasas, tales como nucleótidos de PNA (ácido nucleico peptídico), LNA (ácido  
30 nucleico bloqueado), ADN con enlaces 2'-5' o 2'-O-metil ARN, o combinaciones de los mismos.

35 Cuando el oligonucleótido de invasión de cadena sea un oligómero de PNA compuesto completamente por PNA, dicho oligonucleótido puede desestabilizar e invadir ADN de doble cadena en ausencia de una enzima recombinasa. Por lo tanto, cuando se usa un oligonucleótido de PNA, los métodos de la invención pueden realizarse sin presencia de una enzima recombinasa.

Se proporcionan en el presente documento ejemplos específicos de oligonucleótidos de invasión de cadena adecuados para secuencias de nucleótidos diana en los genes *tcdA* y *tcdB* de *C. difficile*. Un oligonucleótido de invasión de cadena preferido para detección de la secuencia diana de *tcdB* de SEQ ID NO: 1 es SEQ ID NO: 4. Un  
40 oligonucleótido de invasión de cadena particularmente preferido es un derivado modificado de SEQ ID NO: 4, más preferentemente SEQ ID NO: 5. Un oligonucleótido de invasión de cadena preferido para detección de la secuencia diana de *tcdA* de SEQ ID NO: 6 es SEQ ID NO: 9. Un oligonucleótido de invasión de cadena particularmente preferido es un derivado modificado de SEQ ID NO: 9, más preferentemente SEQ ID NO: 10.

45 Como se ha analizado anteriormente, el oligonucleótido de invasión de cadena usado en la invención comprende uno o más oligonucleótidos modificados en su región 3' para bloquear su uso como un sustrato de polimerasa. Por lo tanto, un derivado modificado de SEQ ID NO: 4 o 9 puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más nucleótidos modificados en su región 3', normalmente en los 10-15 o 10-20 nucleótidos del extremo 3'. Las modificaciones pueden seleccionarse de cualquiera de las analizadas anteriormente. El derivado modificado puede  
50 ser un oligómero de PNA de secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 4 o 9.

Además de derivados modificados de SEQ ID NO: 4 y 9, pueden usarse oligonucleótidos de invasión de cadena variantes.

55 Las variantes de SEQ ID NO: 4 y 9 son típicamente oligonucleótidos de más de 30 nucleótidos, más preferentemente al menos 35, al menos 40 o al menos 45 nucleótidos de longitud, que comprenden una región que es parcial o completamente complementaria de al menos 30 nucleótidos contiguos de la secuencia complementaria de diana original correspondiente en las SEQ ID NO: 4 o 9. Preferentemente, dichas variantes comprenderán una región que es parcial o completamente complementaria de al menos 32, 35, 37, 40, 42 o 45 nucleótidos contiguos de la secuencia complementaria de diana presente en las SEQ ID NO: 4 o 9.  
60

Las variantes anteriores pueden comprender una región que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 desapareamientos (sustituciones) con respecto a la región complementaria de diana correspondiente del oligonucleótido de invasión de cadena original de las SEQ ID NO: 4 o 9 (y por lo tanto la secuencia diana) y por lo tanto es parcialmente  
65 complementaria de las mismas. Por lo tanto, por ejemplo, las variantes pueden comprender una región de al menos 30 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, 3, o 4, tales como 1-4 o 1-3 desapareamientos con una región

correspondiente de al menos 40 nucleótidos contiguos del oligonucleótido de invasión de cadena original correspondiente. Las variantes pueden comprender una región de al menos 35, 40, 42 o 45 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6, tal como 1-5 o 1-3 desapareamientos con una región correspondiente de una longitud equivalente en el oligonucleótido de invasión de cadena original correspondiente. Cualquier desapareamiento en la

5 secuencia de oligonucleótido de invasión de cadena variante puede ser a al menos 2, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 nucleótidos de distancia.

Como alternativa, las variantes pueden comprender una región de al menos 32, 35, 37, 40, 42 o 45 nucleótidos de longitud que es completamente complementaria de la región complementaria de diana del oligonucleótido de

10 invasión de cadena original.

Las variantes de las SEQ ID NO: 4 y 9 también pueden ser oligonucleótidos de más de 30 nucleótidos de longitud que comprenden una región complementaria de diana que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia complementaria de diana del oligonucleótido de invasión de cadena original correspondiente, preferentemente al menos 75 %, al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, al menos 90 %, al menos

15 95 % de identidad de secuencia.

Además, los oligonucleótidos de invasión de cadena variantes pueden comprender una secuencia adicional complementaria de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' flanqueante del gen *tcdA* o *tcdB* con respecto a la región de

20 unión del oligonucleótido de invasión de cadena original, tal como 5 -10 o 5-15 nucleótidos de la región 5' flanqueante y/o región 3'.

La secuencia restante de los oligonucleótidos de invasión de cadena variantes normalmente no está relacionada con la secuencia diana y tampoco está relacionada normalmente con el oligonucleótido de invasión de cadena original.

25

Los oligonucleótidos de invasión de cadena variantes comprenden además uno o más oligonucleótidos modificados en su región 3' tales como, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más nucleótidos modificados, que pueden estar en los 10-15 o 10-20 nucleótidos del extremo 3'. Las modificaciones pueden seleccionarse de cualquiera de las analizadas anteriormente.

30

Un oligonucleótido de invasión de cadena de la invención puede comprender además un marcador detectable, por ejemplo un colorante fluorescente.

#### *Amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana*

35

El ácido nucleico procedente de la muestra se pone en contacto con los cebadores cadena arriba y cadena abajo y el oligonucleótido de invasión de cadena para fines de detección, en condiciones que promueven la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

40 Dichas condiciones comprenden típicamente la presencia de una enzima ADN polimerasa. Las condiciones adecuadas incluyen cualquier condición usada para posibilitar la actividad de enzimas polimerasas conocidas en la técnica.

Las condiciones típicamente incluyen la presencia de los cuatro dNTP, dATP, dTTP, dCTP y dGTP o análogos de los mismos, agentes tamponantes adecuados/pH y otros factores que son necesarios para rendimiento o estabilidad de enzimas. Las condiciones pueden incluir la presencia de detergentes y agentes estabilizantes. La temperatura usada es típicamente isotérmica, es decir constante durante todo el proceso de amplificación. La temperatura usada depende típicamente de la naturaleza de la enzima polimerasa y otros componentes enzimáticos y también refleja la temperatura de hibridación necesaria para los cebadores y oligonucleótidos de invasión de cadena. Cuando se usa

50 Bsu polimerasa, una temperatura adecuada es de 40 grados centígrados.

La polimerasa usada típicamente tiene actividad de desplazamiento de cadena. La expresión "desplazamiento de cadena" se usa en el presente documento para describir la capacidad de una ADN polimerasa, opcionalmente junto con proteínas accesorias, para desplazar cadenas complementarias al encontrar una región de ADN bicatenario durante síntesis de ADN. Las ADN polimerasas adecuadas incluyen polí de *E. coli*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, y fragmentos funcionales o variantes de los mismos, y ADN polimerasas T4 y T7 y fragmentos

55 funcionales o variantes de los mismos. Una polimerasa preferida es ADN polimerasa Bsu o un fragmento funcional o variante del mismo.

Las condiciones pueden comprender además la presencia de una recombinasa. Puede usarse cualquier sistema de recombinasa en el método de la invención. El sistema de recombinasa puede ser de origen procariota o eucariota, y puede ser bacteriano, de levadura, de fago o de mamífero. La recombinasa puede polimerizar en un oligonucleótido monocatenario en la dirección 5'-3' o 3'-5'. La recombinasa puede proceder de un fago myoviridae, tal como T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, fago de *Acinetobacter* 133, fago de *Aeromonas* 65, cianofago P-SSM2, cianofago PSSM4, cianofago S-PM2, Rbl4, Rb32, fago de *Aeromonas* 25, fago de *Vibrio* nt-1, phi-1, Rbl6, Rb43, fago 31, fago 44RR2.8t, Rb49, fago Rb3 o fago LZ2. En una realización preferida, se usa la recombinasa T4 UvsX (Número de

65

referencia: P04529) o una variante funcional o fragmento de la misma. También pueden usarse los sistemas Rad de eucariotas o el sistema recA-Reco de *E. coli* u otros sistemas procariotas.

5 Las condiciones pueden comprender además la presencia de proteínas accesorias de recombinasa, tales como proteína de unión monocatenaria (por ejemplo gp32, número de referencia P03695) y agente de carga de recombinasa (por ejemplo UvsY, número de referencia NP\_049799.2). En una realización preferida, las condiciones comprenden la presencia de las proteínas T4 gp32, UvsX y UvsY.

10 La recombinasa (tal como UvsX) y, cuando se use, el agente de carga de recombinasa (tal como UvsY) y proteína de unión a ADN monocatenario (tal como gp32), pueden ser cada uno proteínas nativas, híbridas o mutantes de las mismas o diferentes fuentes de fago myoviridae. Una proteína nativa puede ser una variante natural o de tipo silvestre de una proteína.

15 Las condiciones pueden comprender además otros factores usados para potenciar la eficacia de la recombinasa tales como compuestos usados para controlar las interacciones de ADN, por ejemplo prolina, DMSO o agente aglutinante que se sabe que potencian la carga de recombinasas en ADN (Lavery P et. Al JBC 1992, 26713, 9307-9314; documento WO2008/035205).

20 Las condiciones pueden comprender también la presencia de un sistema de regeneración de ATP. Los expertos en la materia conocen diversos sistemas de regeneración de ATP, e incluyen enzimas glucolíticas. Los componentes adecuados de un sistema de regeneración de ATP pueden incluir una o más de fosfocreatina, creatina quinasa, mioquinasa, pirofosfatasa, sacarosa y sacarosa fosforilasa. Las condiciones pueden comprender además la presencia de ATP.

25 También pueden incluirse componentes adicionales tales como iones de magnesio, DTT u otros agentes reductores, sales, BSA/PEG u otros agentes aglutinantes.

30 Los diversos componentes descritos anteriormente, que incluyen los cebadores y el oligonucleótido de invasión de cadena, pueden proporcionarse en diversas concentraciones para posibilitar la amplificación de ADN. Los expertos en la materia pueden seleccionar concentraciones de trabajo adecuadas de los diversos componentes en la práctica.

#### *Detección de presencia de ADN amplificado*

35 La presencia de ADN amplificado resultante del contacto de la secuencia de ácido nucleico diana con los cebadores y el oligonucleótido de invasión de cadena en condiciones que promueven la amplificación de ADN puede supervisarse por cualquier medio adecuado.

40 Uno o ambos de los cebadores, o el oligonucleótido de invasión de cadena pueden incorporar un marcador u otro resto detectable. Puede usarse cualquier marcador o resto detectable. Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen radioisótopos o restos fluorescentes y pares de TERF de un fluoróforo y resto aceptor. Como alternativa, o además, pueden usarse una o más sondas que detectan el ADN amplificado, incorporando de nuevo un marcador u otro resto detectable. Las sondas pueden unirse en cualquier localización adecuada en el amplicón. Las sondas que detectan diferentes secuencias diana amplificadas pueden señalar a diferentes longitudes de onda fluorescentes para proporcionar detección múltiple. También pueden usarse colorantes que se intercalan con ADN amplificado para detectar el ADN amplificado, tales como SYBR green y naranja tiazol.

La detección de la señal del ADN amplificado puede realizarse por cualquier sistema adecuado, incluyendo PCR en tiempo real.

#### 50 Cebadores y oligonucleótidos

La presente divulgación también proporciona los cebadores y oligonucleótidos de invasión de cadena de SEQ ID NO: 2 a 5 y 7 a 10 y variantes de las mismas como productos en sí mismos, y composiciones y formulaciones que comprenden dichos cebadores y oligonucleótidos de invasión de cadena. Los cebadores y opcionalmente el oligonucleótido de invasión de cadena pueden usarse en cualquier método de detección de *C. difficile* tóxico. Normalmente, el método es un método de amplificación de ADN basado en invasión de cadena. Sin embargo, puede usarse cualquier método de amplificación de ADN que permita la detección específica de *C. difficile* tóxico. Los cebadores cadena arriba y cadena abajo pueden usarse en un método de amplificación de ADN que no requiere uso de un oligonucleótido de invasión de cadena, tal como PCR.

#### 60 Composiciones y kits

65 La invención también se refiere a composiciones y kits que comprenden al menos dos oligonucleótidos seleccionados de (a) un cebador cadena arriba, (b) un cebador cadena abajo y (c) un oligonucleótido de invasión de cadena. El cebador cadena arriba, cebador cadena abajo y oligonucleótido de invasión de cadena son como se han descrito anteriormente. La composición o el kit pueden comprender un cebador cadena arriba y uno cadena abajo,

un cebador cadena abajo y un oligonucleótido de invasión de cadena, o un cebador cadena abajo y un oligonucleótido de invasión de cadena. Preferentemente, la composición o el kit comprende un cebador cadena arriba, un cebador cadena abajo y un oligonucleótido de invasión de cadena. La composición o el kit pueden ser adecuados para la detección de *C. difficile* de acuerdo con el método de la invención, o un método de amplificación de ADN alternativo.

Cuando la composición o el kit sea adecuado para su uso para la detección de la secuencia de ácido nucleico diana de la SEQ ID NO: 1 (*tcdB*), normalmente el cebador cadena arriba es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma, el cebador cadena abajo es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma, y el oligonucleótido de invasión de cadena es un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o una variante de la misma, y que comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3'. El oligonucleótido de invasión de cadena puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 5.

Cuando la composición o el kit sea adecuado para su uso para la detección de la secuencia de ácido nucleico diana de la SEQ ID NO: 6 (*tcdA*), normalmente el cebador cadena arriba es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma, el cebador cadena abajo es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma, y el oligonucleótido de invasión de cadena es un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma, y que comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3'. El oligonucleótido de invasión de cadena puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 10.

La composición o el kit puede proporcionar un primer conjunto de oligonucleótidos que permite la detección de la secuencia de ácido nucleico diana de la SEQ ID NO: 1 y adicionalmente un segundo conjunto de oligonucleótidos que permite la detección de la secuencia de ácido nucleico diana de la SEQ ID NO: 6.

La composición anterior puede ser por ejemplo una solución, liofilizado, suspensión, o una emulsión en un vehículo oleoso o acuoso.

En el kit anterior, los al menos dos oligonucleótidos pueden proporcionarse como una mezcla, o en recipientes separados. El kit comprende opcionalmente además instrucciones para su uso en un método de la invención. El kit puede comprender un medio para la detección de ADN amplificado.

El kit o la composición comprende opcionalmente una o más sondas que detectan ADN amplificado. El kit o la composición comprende opcionalmente una o más de una ADN polimerasa, una recombinasa y proteínas accesorias de recombinasa. Preferentemente, la ADN polimerasa es polimerasa Bsu. Preferentemente, la recombinasa es bacteriófago T4 UvsX, opcionalmente en combinación con las proteínas accesorias de recombinasa UvsY y gp32. El kit o la composición pueden comprender además dNTP, tampones adecuados y otros factores que son necesarios para la amplificación de ADN en el método de la invención como se ha descrito anteriormente.

#### Diagnóstico de una infección por *C. difficile* y aplicaciones médicas

La presente invención es particularmente ventajosa en el entorno médico. Los métodos de detección de la invención proporcionan un ensayo muy específico para posibilitar la determinación de si una muestra clínica contiene una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxígeno. El método puede aplicarse a una serie de situaciones de enfermedad asociadas con *C. difficile* toxígeno. Además, el método puede aplicarse para exploración de vehículos de *C. difficile* toxígeno.

La determinación de si está presente o no *C. difficile* toxígeno puede ser en el contexto de cualquier enfermedad o dolencia presente o que se sospeche que esté presente en un paciente. Dichas enfermedades pueden incluir las provocadas por, ligadas a o empeoradas por la presencia de *C. difficile* toxígeno. Por lo tanto, un paciente puede presentar síntomas que indiquen la presencia de *C. difficile* toxígeno, y puede obtenerse una muestra del paciente para determinar la presencia de *C. difficile* y opcionalmente también el toxintipo del mismo por el método descrito anteriormente.

La invención proporciona por lo tanto un método para diagnosticar una infección provocada por *C. difficile* toxígeno en un sujeto, que comprende determinar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxígeno según la invención en una muestra de dicho sujeto. El método puede comprender además otras etapas de identificación de la cepa de *C. difficile* toxígeno, tal como por cultivo microbiológico de una muestra proporcionada por el sujeto.

Una realización particularmente preferida de la invención es la identificación de *C. difficile* toxígeno presente en pacientes que tienen una infección del tracto gastrointestinal, en particular que tienen síntomas de diarrea.

La invención proporciona por lo tanto un método de diagnóstico para enfermedades gastrointestinales, tales como diarrea que están provocadas por *C. difficile* toxígeno. El método de diagnóstico puede comprender además detectar marcadores de resistencia a antibióticos y marcadores de virulencia. El método posibilita una mejora drástica del tratamiento del paciente de enfermedades gastrointestinales ya que permite el tratamiento terapéutico óptimo para un paciente dado. Por lo tanto el ensayo reduciría la duración de las estancias en el hospital, la frecuencia de readmisión y reduciría costes.

El método de diagnóstico puede realizarse convenientemente basándose en ácido nucleico procedente de una muestra de un paciente, lo que proporciona una indicación a los especialistas clínicos de si la enfermedad gastrointestinal se debe a una infección por *C. difficile* toxígeno. El método de diagnóstico puede proporcionar también una indicación del toxinotipo y la virulencia de *C. difficile* y si el *C. difficile* es resistente a algún antibiótico. Dependiendo del resultado del ensayo puede después optimizarse el tratamiento médico, por ejemplo mediante el uso de antibióticos.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - DISEÑO DE LOS ENSAYOS DE *tcdB* Y *tcdA* DE *C. DIFFICILE*

El diseño de oligonucleótidos específicos para la detección y amplificación de genes *tcdA* y *tcdB* fue difícil. Los genes *tcdA* y *tcdB* muestran alta homología de secuencia no solamente entre sí sino también con las otras toxinas clostridiales grandes. El gen de citotoxina de *C. sordellii*, *tcsL*, es el homólogo más cercano de *tcdB* (Popoff, 1987; Green, 1995). Los anticuerpos para *tcsL* de *C. sordellii* son reactivos de forma cruzada con toxina B de *C. difficile*. Por lo tanto, los ensayos de flujo lateral para la detección de toxina B de *C. difficile* habitualmente reaccionan de forma cruzada con *tcsL* de *C. sordellii*. El diseño de oligonucleótidos específicos se complicó adicionalmente por la necesidad de un oligonucleótido invasor específico.

Además, el contenido de GC del genoma de *C. difficile* es bajo (29,1 %) lo que se aplica también al gen *tcdB*, el contenido de GC del cual es 27,4 %. Este contenido de GC bajo también hizo el diseño de oligonucleótidos adecuados para amplificación de ADN difícil. Los cebadores con contenido de GC bajo tendrán una temperatura de fusión ( $T_m$ ) baja, que desestabiliza la unión de oligonucleótidos y da como resultado poca eficacia de amplificación.

En primer lugar, se seleccionaron regiones adecuadas de los genes *tcdA* y *tcdB* para ser diana de detección y amplificación. Se muestran posteriormente regiones diana particulares para *tcdB* (SEQ ID NO: 1) y *tcdA* (SEQ ID NO: 6). Las regiones diana se seleccionaron 1) para ser específicas para *C. difficile*, es decir para diferir de especies de *Clostridium* estrechamente homólogas, 2) para mostrar buena inclusividad de toxinotipos de *C. difficile* y 3) tener un mayor contenido de GC que el genoma de *C. difficile* en promedio.

En segundo lugar, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificación de las regiones diana. Se muestran posteriormente oligonucleótidos particulares usados para detección y amplificación del gen *tcdB* y gen *tcdA* de *C. difficile* (SEQ ID NO: 2-5 y 7-10).

### Ejemplo 2 - PRUEBA DE ENSAYO DE *tcdB*

Se usaron oligonucleótidos detectores de *tcdB* de SEQ ID NO: 2, 3 y 5 para amplificar el gen *tcdB* de *C. difficile* mediante amplificación de ADN de invasión de cadena isotérmica a 40 °C. Se usó colorante fluorescente de unión a ADN Sybr Green I para detección de amplificación y se midió la fluorescencia con un fluorímetro o un instrumento de PCR en tiempo real. La mezcla de reacción contenía tampón de reacción (Tris-acetato 10 mM, pH 8, EDTA 0,5 mM, DTT 4 mM, sacarosa 150 mM, BSA 0,1 mg/ml, DMSO 5 %), ATP 2 mM, PEG1000 5 %, sal di(tris) de fosfocreatina 60 mM, dNTP (con dTT reemplazado mediante dUTP), sacarosa fosforilasa 12,5 mU/μl, creatina fosfoquinasa 25 mU/μl, Bsu polimerasa 62,5 mU/μl, bacteriófago T4 UvsX 0,1-0,3 mg/ml, bacteriófago T4 gp32 0,25-0,5 mg/ml, Mg-acetato 10 mM y oligonucleótidos en presencia o ausencia de ADN molde.

Se ensayó la capacidad de los cebadores finales y el oligonucleótido invasor para producir dímeros de cebadores o autocebado en ausencia de ADN molde (control sin molde, NTC). La capacidad de los oligonucleótidos para detectar y amplificar el ADN diana correcto se ensayó en presencia de ADN genómico (ADNg) de *C. difficile* BAA-1382. La presencia o ausencia de producto de amplificación se determinó tanto por aumento de la fluorescencia de SybrGreen I (Fig. 1(a)) como por análisis de curva de fusión (Fig. 1(b)).

Los productos de amplificación se analizaron adicionalmente con un sistema de electroforesis de microchip MultiNA (Fig. 1(c)). El electroferograma de reacción de amplificación de *tcdB* positivo con 10 000 copias (cp) de ADNg de *C. difficile* como molde mostró la aparición de un fragmento de ADN con la longitud esperada. Este fragmento no se detectó en la reacción de control sin molde.

### Ejemplo 3. ESPECIFICIDAD PARA *C. DIFFICILE*

La especificidad del ensayo de *tcdB* se comprobó mediante el uso de ADN g de *C. sordellii* ATCC 9714 como molde en una reacción como se ha descrito en el Ejemplo 2. El gen de toxina *tcsL* de *C. sordellii* es el homólogo más cercano hallado de *tcdB*. Los resultados se muestran en la Fig. 2(a). La reacción de *tcdB* con 10 000 cp de ADN g de *C. sordellii* como ADN molde no mostró ninguna amplificación de ADN mientras que 10 000 cp de *C. difficile* BAA-1382 (630) mostraron una clara amplificación medida por el aumento de la intensidad de fluorescencia de SybrGreen I.

#### Ejemplo 4. SENSIBILIDAD DE DETECCIÓN DE *C. DIFFICILE*

La sensibilidad del ensayo de *tcdB* se comprobó con una serie de diluciones de *C. difficile* BAA-1382 (630) y se midió la amplificación con fluorescencia de Sybr Green I y se detectó mediante PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en la Fig. 2(b). 10 - 10 000 cp/reacción de ADN g de *C. difficile* como molde mostró amplificación positiva mientras que NTC, control negativo y 1 cp/reacción no se amplificaron. La reacción de control negativo contenía una mezcla de ADN g aislado de *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter sp.*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*, al menos 1000 cp/reacción cada uno. NTC=control sin molde.

#### Ejemplo 5. INCLUSIVIDAD DE DETECCIÓN DE TOXINOTIPOS DE *C. DIFFICILE*

La inclusividad del ensayo de *tcdB* se comprobó con toxinotipos de *C. difficile* 0, III, VIII y X. Se muestran resultados en la Figura 3(A) y (C). Se usaron 2 ng de ADN g/reacción de cada toxinotipo como molde en la reacción de *tcdB*. Todos los toxinotipos ensayados proporcionaron un resultado de amplificación positivo (Fig. 3A). Además, el análisis de curva de fusión indicó amplificación de un único amplicón específico (Fig. 3C).

La inclusividad del ensayo de *tcdB* se comprobó además con un panel mayor de 37 toxinotipos de *C. difficile* 0, I, II, IIIa, IIIb, IIIc, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XIa, XIb, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII; XIX, XX, XXI; XXII; XXIII; XXIV, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII y XXXIII. Los resultados se muestran en la Figura 3(B) y (D). Todos los toxinotipos excepto por XIa y XIb, 35 en total, proporcionaron un resultado de amplificación positivo (Fig. 3(B)), y el análisis de curva de fusión postamplificación de reacciones de amplificación positiva mostró amplificación de un único amplicón (Fig. 3(C)). El análisis de curva de fusión postamplificación para los toxinotipos XIa y XIb tampoco mostró amplificación. Se espera la amplificación negativa para los toxinotipos XIa y XIb ya que estos no producen toxina A ni toxina B (Rupnik *et al.* 2001). Carecen del gen *tcdB* completamente pero contienen al menos algunas partes del gen *tcdA*.

#### Ejemplo 6. PRUEBA DE ENSAYO DE *tcdA* SIBA

Se usaron oligonucleótidos de detección de *tcdA* de las SEQ ID NO: 7, 8 y 10 para amplificar el gen *tcdA* de *C. difficile* a 40 °C con una mezcla de reacción como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se ensayó la capacidad de los cebadores finales para producir dímeros de cebadores o autocebado en ausencia de ADN molde (control sin molde, NTC). La capacidad de los oligonucleótidos para detectar y amplificar el ADN diana correcto se ensayó en presencia de 10 - 10 000 cp/reacción de ADN genómico (ADNg) de *C. difficile* BAA-1382. La presencia o ausencia de producto de amplificación se determinó por aumento de la fluorescencia de SybrGreen I (Fig. 4a) y se midió con instrumento de PCR en tiempo real. Se realizó análisis de curvas de fusión para confirmar la amplificación de amplicón específico individual (Fig. 4b).

#### Secuencias de la invención

SEQ ID NO: 1

AACCAAAGTGGAGTGTTACAAACAGGTGTATTTAGTACAGAAGATGGATTTAAATATTTTGCCCCA

SEQ ID NO: 2 AACCAAAGTGGAGTGTTACAA

SEQ ID NO: 3 TGGGGCAAATATTTA

SEQ ID NO: 4 TCCTCCTGTACCTCGTTACAAACAGGTGTATTTAGTACAGAAGATGGATTTAAATA

SEQ ID NO: 5

TCCTCCTGTACCTCGTTACAAACAGGTGTATTTAGTACAGAAGmAmUmGmAmUmUmUmAmAmAmUmA/  
nvdT/. mX = 2'-O-metil ARN. invdT = dTTP invertido.

SEQ ID NO: 6 ATGGATAGGTGGAGAAGTCAGTGATATTGCTCTTGAATACATAAAACAATGGGCTGATATTAA

SEQ ID NO: 7 ATGGATAGGTGGAGAAGTC

SEQ ID NO: 8 TTAATCTCAGCCCATTG

SEQ ID NO: 9 TCCTCCTGTACCTCAGAAGTCAGTGATATTGCTCTTGAATACATAAAACAATGG

SEQ ID NO: 10

TCCTCCTGTACCTCAGAAGTCAGTGATATTGCTCTTGAATmAmCmAmUmAmAmAmAmCmAmAmUmGmG/Inv  
dT/. mX = 2'-O-metil ARN. invdT = dTTP invertido.

#### Referencias

Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M. y von Eichel-Streiber, C. (1996) Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 181 (1-2): 29-38

Carter, G. P., Rood, J. I. y Lyras, D. (2012) The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends in Microbiology* 20(1): 21-29

5 Green, G. A., Schu e, V. y Monteil, H. (1995) Cloning and characterization of the cytotoxin L-encoding gene of *Clostridium sordellii*: homology with *Clostridium difficile* cytotoxin B. *Gene* 161(1): 57-61

Lyras, D., O'Connor, J., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., Gerding, D. N. y Rood, J. I. (2009) Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458(7242): 1176-1179

10 McMillin, D. E., Muldrow, L. L. y Laggette, S. J. (1990) Simultaneous detection of toxin A and toxin B genetic determinants of *Clostridium difficile* using the multiplex polymerase chain reaction. *Canadian journal of microbiology* 38(1), 81-83.

McMillin, D. E., Muldrow, L. L., Leggette, S. J., Abdulahi, Y. y Ekanemesang, U. M. (1991) Molecular screening of *Clostridium difficile* toxins A and B genetic determinants and identification of mutant strains. *FEMS Microbiology Letters* 62(1):75-80.

15 Popoff, M. R. (1987) Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infect. Immun.* 55(1): 35-43

Rupnik, M., Brazier, J. S., Duerden, B. I., Grabnar, M. y Stubbs, S. L. J. (2001) Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes *Microbiology* 147, 439-447.

20 von Eichel-Streiber, C., Boquet, P., Sauerborn, M. y Thelestam, M. (1996) Large clostridial cytotoxins - a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends in Microbiology* 4: 375-382

Wren, B. W., Clayton, C. L. y Tabaqchali, S. (1990) Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin A gene fragment and detection of toxigenic strains by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters* 58(1), 1-6

25 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> ORION DIAGNOSTICA OY

<120> M ETODO DE AMPLIFICACIÓN DE ADN BASADO EN INVASIÓN DE CADENA

<130> N.119360B-WO

<140> tbc

<141> tbc

<150> EP13275100.9

<151> 25/04/2013

<160> 10

<170> PatentIn versi n 3.5

<210> 1

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> REGIÓN DIANA

<400> 1

aaccaaagtg gagtgttaca aacaggtgta ttagtagcag aagatggatt taaatatttt 60

gccccca 66

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SECUENCIA DE CEBADOR

<400> 2

aaccaaagtg gagtggtaca a 21

<210> 3  
 <211> 16  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SECUENCIA DE CEBADOR

10 <400> 3  
 tggggcaaaa tattta 16

<210> 4  
 <211> 56  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO INVASOR DE CADENA

<400> 4  
 20 tctcctgta cctcgtaca aacaggtgta ttagtacag aagatggatt taaata 56

<210> 5  
 <211> 56  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO INVASOR DE CADENA MODIFICADO

<220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (44)..(44)  
 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (45)..(45)  
 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (46)..(46)  
 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (47)..(47)  
 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (48)..(48)  
 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (49)..(49)  
 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 65 <222> (50)..(50)  
 <223> 2'-O-METIL ARN



<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (51)..(51)  
 5 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (52)..(52)  
 10 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (53)..(53)  
 15 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (54)..(54)  
 20 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (54)..(54)  
 25 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (55)..(55)  
 30 <223> 2'-O-METIL ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (56)..(56)  
 35 <223> dTTP INVERTIDO

<400> 5  
 tcctcctgta cctcgttaca aacaggtgta ttagtacag aagauggauu uaaaun 56

40 <210> 6  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> REGIÓN DIANA

<400> 6  
 atggataggt ggagaagtca gtgatattgc tcttgaatac ataaaacaat gggctgatat 60

50 taa 63

<210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> SECUENCIA DE CEBADOR

60 <400> 7  
 atggataggt ggagaagtc 19

<210> 8  
 <211> 17

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> SECUENCIA DE CEBADOR  
  
 <400> 8  
 ttaatctcag cccattg 17  
  
 10 <210> 9  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO INVASOR DE CADENA  
  
 <400> 9  
 20 tctcctgta cctcagaagt cagtgatatt gctcttgaat acataaaaca atgg 54  
  
 <210> 10  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO INVASOR DE CADENA  
  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (41)..(41)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
  
 <220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (42)..(42)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (43)..(43)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
  
 <220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (44)..(44)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
  
 <220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (45)..(45)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
  
 <220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (46)..(46)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (47)..(47)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
  
 <220>  
 65 <221> misc\_feature  
 <222> (48)..(48)

<223> 2'-O-METIL ARN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (49)..(49)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (50)..(50)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (51)..(51)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (52)..(52)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (53)..(53)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (54)..(54)  
 <223> 2'-O-METIL ARN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (55)..(55)  
 <223> dTTP INVERTIDO  
 <400> 10  
 40 tcctcctgta cctcagaagt cagtgatatt gctcttgaat acauaaaaca auggn 55

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxígeno en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con al menos un cebador cadena arriba, al menos un cebador cadena abajo y al menos un oligonucleótido de invasión de cadena en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana, en el que cada uno de dicho cebador y dicho oligonucleótido de invasión de cadena comprende una región complementaria de dicha secuencia de ácido nucleico diana; en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena hace al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión de dicho cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo; y en el que dicho cebador cadena arriba es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, en el que dicho cebador cadena abajo es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, y en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena es un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud, en el que dicho oligonucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o es una variante que comprende una región complementaria de diana que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4, o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4, y en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.
2. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxígeno en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con al menos un cebador cadena arriba, al menos un cebador cadena abajo y al menos un oligonucleótido de invasión de cadena en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana, en el que cada uno de dicho cebador y dicho oligonucleótido de invasión de cadena comprende una región complementaria de dicha secuencia de ácido nucleico diana; en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena hace al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión de dicho cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo; y en el que dicho cebador cadena arriba es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 7, en el que dicho cebador cadena abajo es un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 8, y en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena es un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud, en el que dicho oligonucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o es una variante que comprende una región complementaria de diana que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9, o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9, y en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.
3. Un método según la reivindicación 1 en el que la variante del cebador cadena arriba comprende una secuencia que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, la variante del cebador cadena abajo comprende una secuencia que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y la variante del oligonucleótido de invasión de cadena que comprende una región complementaria de diana comprende una región complementaria de diana que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4.
4. Un método según la reivindicación 2 en el que la variante del cebador cadena arriba comprende una secuencia que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 7, la variante del cebador cadena abajo comprende una secuencia que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 y la variante del oligonucleótido de invasión de cadena que comprende una región complementaria de diana comprende una región complementaria de diana que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además poner en contacto dicha muestra con una recombinasa.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se lleva a cabo en condiciones isotérmicas que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana.
7. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 3 o 5 dependiente de la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena es de la secuencia de la SEQ ID NO: 5.
8. Un método según la reivindicación 2 o la reivindicación 4 o 5 dependiente de la reivindicación 2, en el que dicho

oligonucleótido de invasión de cadena es de la secuencia de la SEQ ID NO: 10.

- 5 9. Una composición que comprende un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 2; un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 3; y un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud, en el que dicho oligonucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o es una variante que comprende una región complementaria de diana que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4 o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4 y comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.
- 10 10. Una composición que comprende un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 7; un oligonucleótido de menos de 30 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y un oligonucleótido de más de 30 nucleótidos de longitud, en el que dicho oligonucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o es una variante que comprende una región complementaria de diana que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9 o que comprende una región complementaria de la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9 y comprende además uno o más nucleótidos modificados en su región 3' que lo hacen no extensible.
- 15 11. Un kit que comprende tres oligonucleótidos como se define en la reivindicación 9 o como se define en la reivindicación 10.
- 20 12. Una composición o un kit según la reivindicación 9 u 11, en el que la variante del cebador cadena arriba comprende una secuencia que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 2, la variante del cebador cadena abajo comprende una secuencia que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y la variante del oligonucleótido de invasión de cadena que comprende una región complementaria de diana comprende una región complementaria de diana que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 4.
- 25 13. Una composición o un kit según la reivindicación 10 u 11, en el que la variante del cebador cadena arriba comprende una secuencia que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 7, la variante del cebador cadena abajo comprende una secuencia que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 y la variante del oligonucleótido de invasión de cadena que comprende una región complementaria de diana comprende una región complementaria de diana que tiene 1, 2, 3 o 4 desapareamientos con la secuencia complementaria de diana de la SEQ ID NO: 9.
- 30 14. Una composición o un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, que comprende además una ADN polimerasa y/o una recombinasa.
- 35 15. Uso de un cebador cadena arriba, un cebador cadena abajo y un oligonucleótido de invasión de cadena, cada uno como se define en la reivindicación 1 o cada uno como se define en la reivindicación 2, en un método para detección de *C. difficile* toxígeno.
- 40 16. Un método para diagnóstico de una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprende llevar a cabo un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en una muestra de dicho sujeto.
- 45 50

Fig. 1A

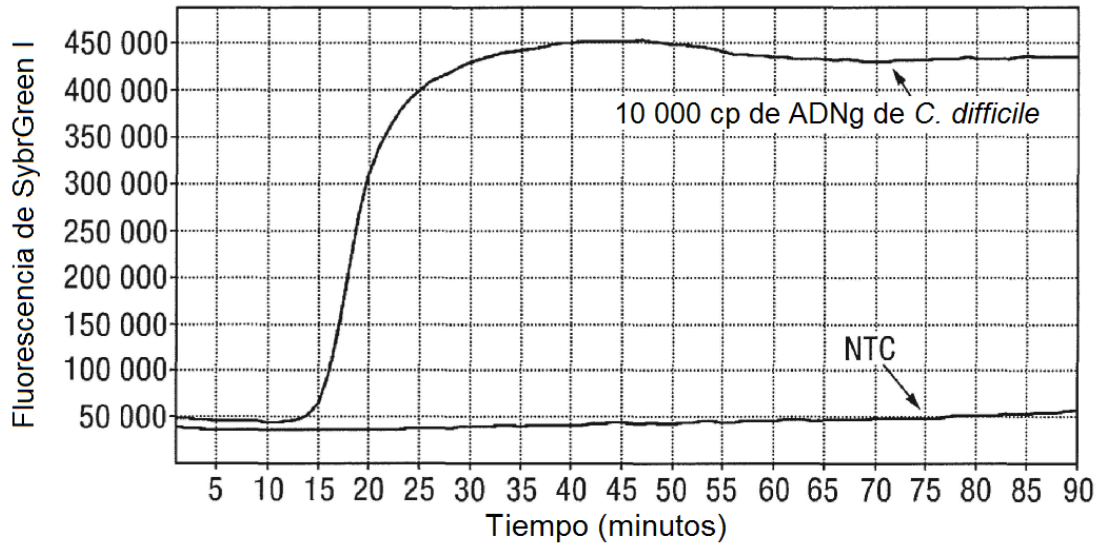


Fig. 1B

Representación de curva de fusión

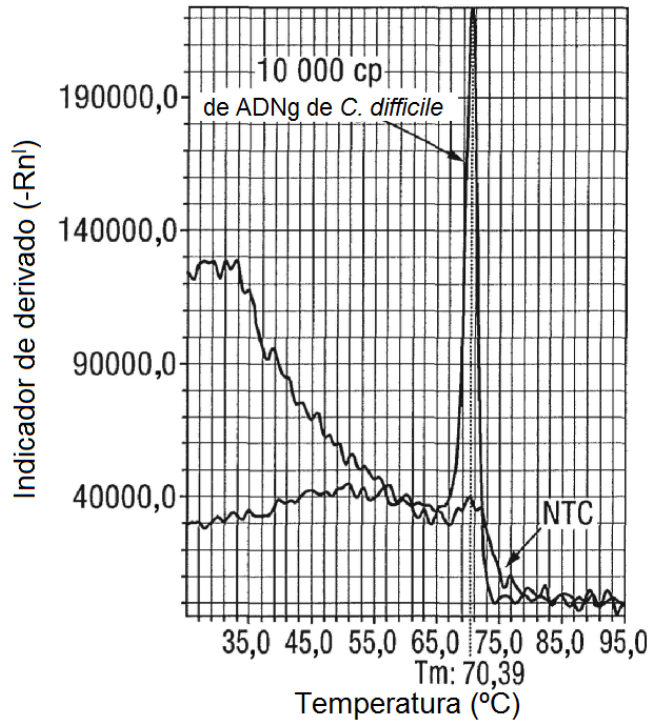


Fig. 1C

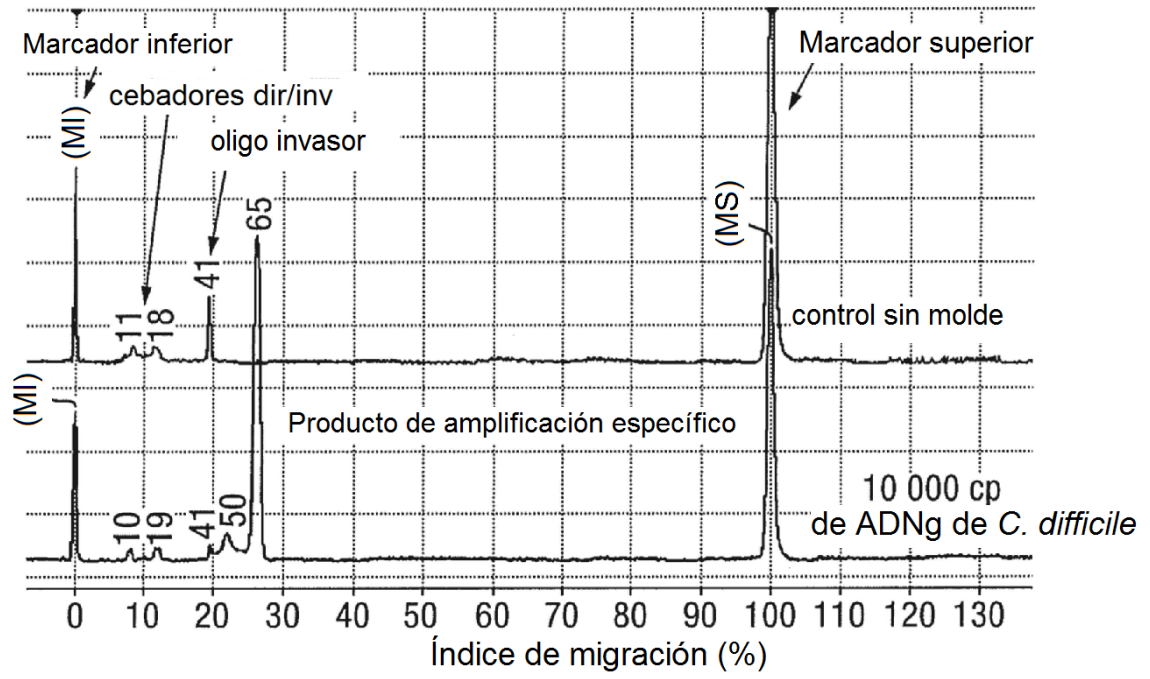


Fig. 2A

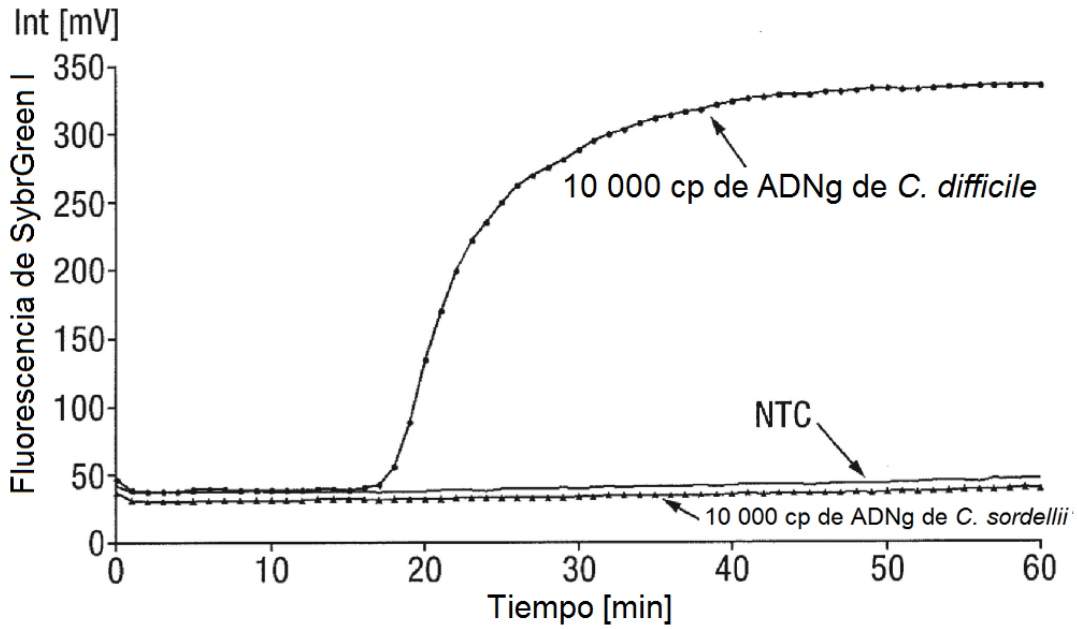


Fig. 2B

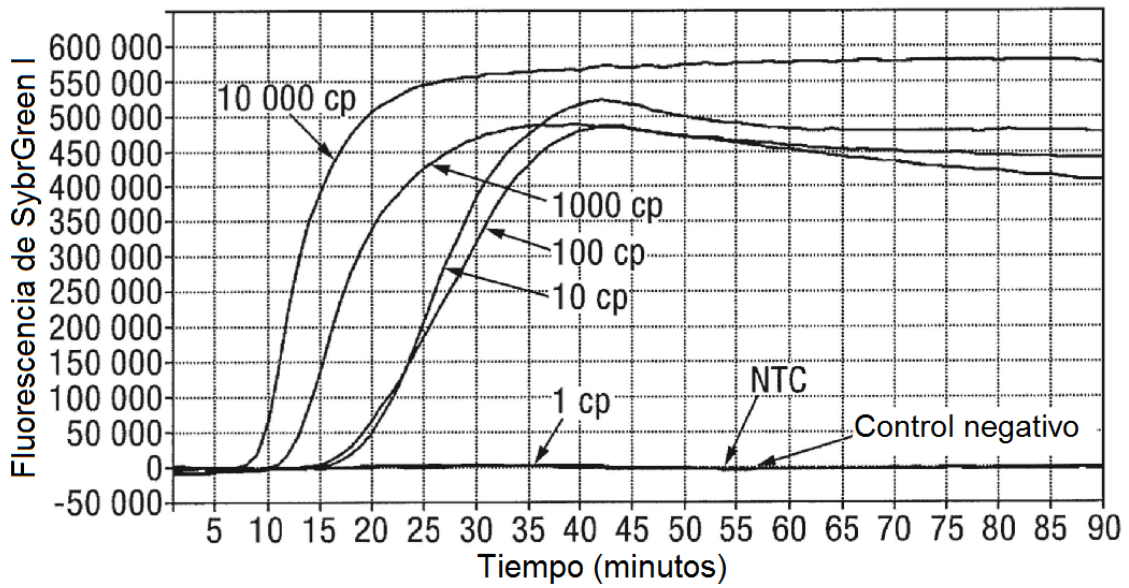




Fig. 3A

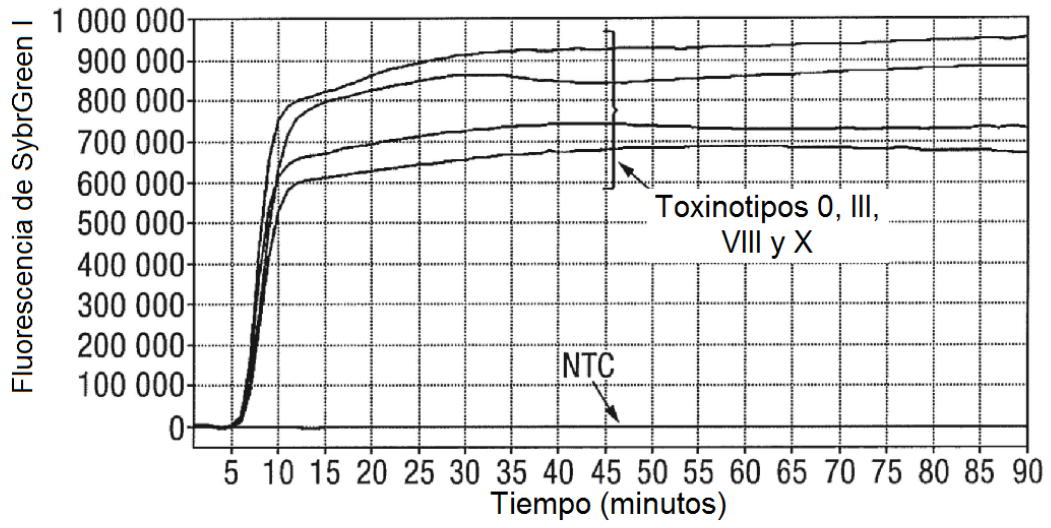


Fig. 3B

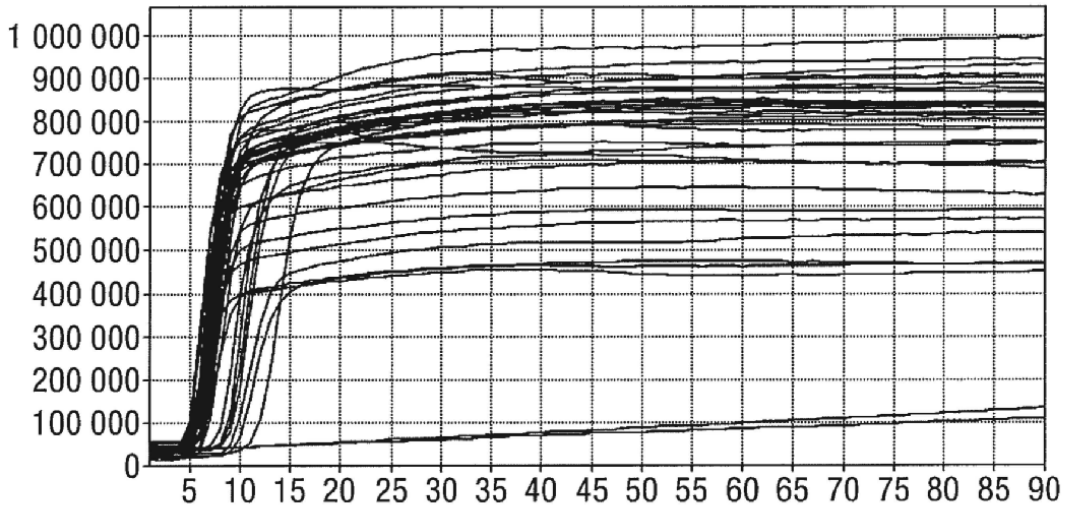


Fig. 3C

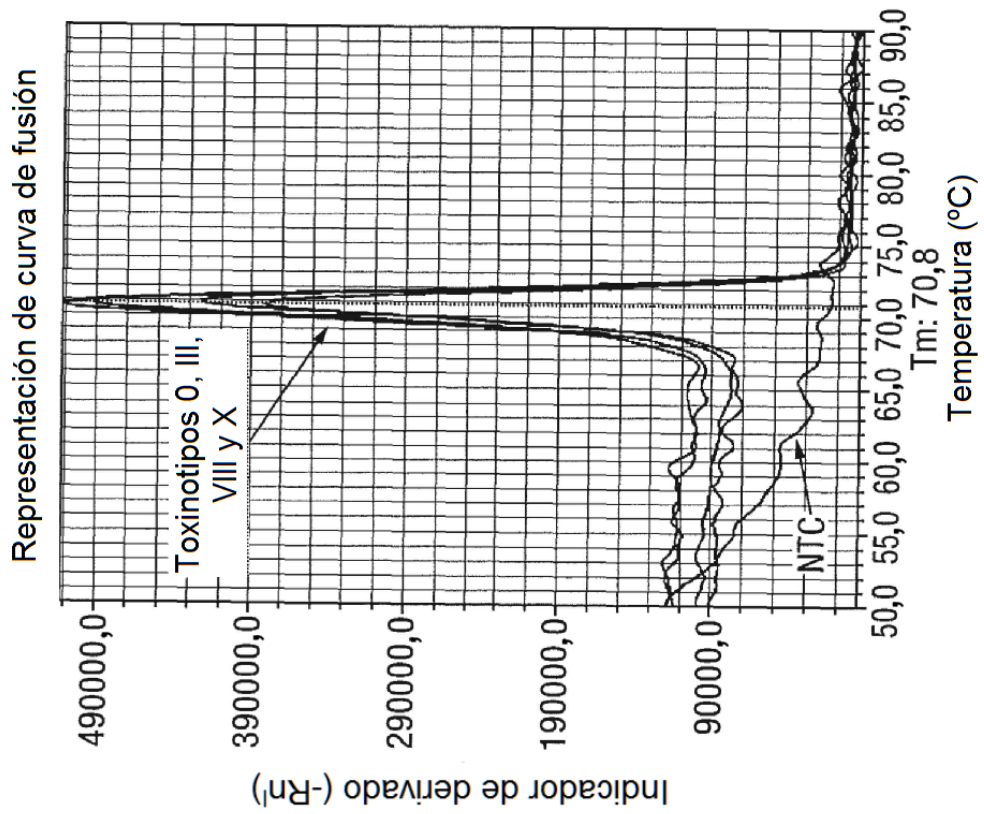


Fig. 3D

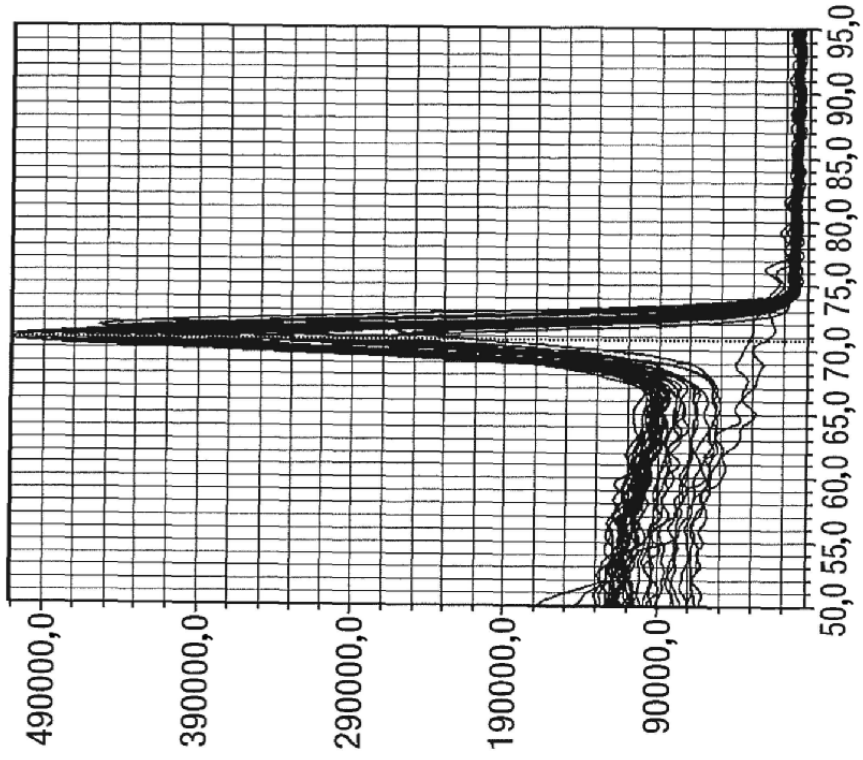


Fig. 4A

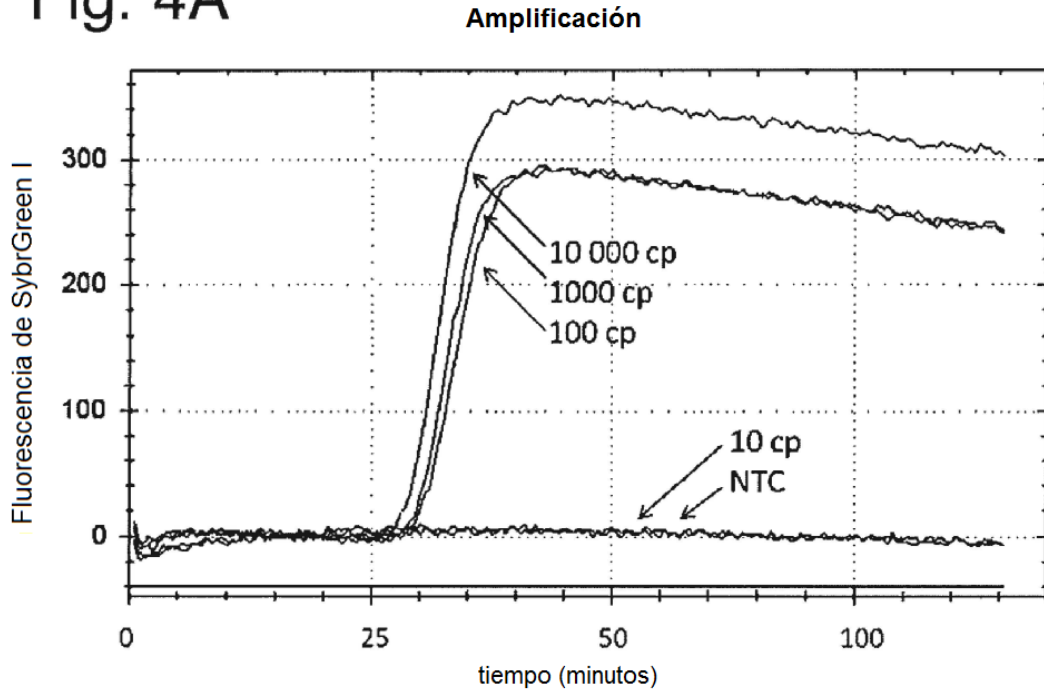


Fig. 4B

