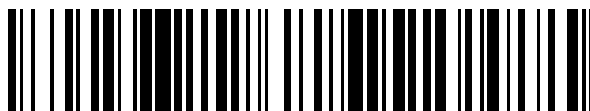


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 080**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/37** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2012 PCT/US2012/062757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13052973**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12838635 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2841593**

54 Título: **Deshidrogenasa y toxina de Clostridium difficile como un biomarcador**

30 Prioridad:

**26.04.2012 US 201213457049**  
**30.10.2012 US 201213664383**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.06.2020**

73 Titular/es:

**TECHLAB, INC. (100.0%)**  
**2001 Kraft Drive**  
**Blacksburg, VA 24060-6358, US**

72 Inventor/es:

**BOONE, JAMES, HUNTER;**  
**LYERLY, DAVID, M. y**  
**CARMAN, ROBERT, J.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 764 080 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

Deshidrogenasa y toxina de *Clostridium difficile* como un biomarcador

## 5 Antecedentes de la invención

10 *La infección por Clostridium difficile* (CDI) involucra una variedad de presentaciones clínicas que incluyen desde diarrea leve a autolimitante, hasta colitis pseudomembranosa y megacolon potencialmente mortales. Muchas personas sanas (por ejemplo, los bebés) portan *Clostridium difficile* (*C. difficile*), y muchos pacientes se convierten en portadores asintomáticos después del ingreso al hospital. La mayoría de los casos se diagnostican en base a evaluaciones clínicas, antecedentes de uso de antibióticos y la presencia del organismo y/o las toxinas A y B (es decir, TcdA y TcdB, respectivamente) en las deposiciones. Las pruebas inmunoenzimáticas (EIA) son el formato de prueba más frecuentemente usado para medir la toxina en las muestras de deposiciones, y el cultivo de tejidos combinado con la neutralización específica es el estándar de oro para detectar la toxina de las deposiciones. Más recientemente, las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están disponibles para determinar la presencia de los genes de las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*) del *C. difficile* y estas se usan como pruebas independientes y en combinación con la detección de la glutamato deshidrogenasa (GDH) para descartar pacientes con *C. difficile* negativo. Todos estos ensayos son adecuados para detectar la presencia de *C. difficile* como ayuda para el diagnóstico, pero no proporcionan información sobre la gravedad de la enfermedad ni confirma que el *C. difficile* en realidad es responsable de los síntomas en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome del intestino irritable (SII), otras infecciones entéricas y agentes causantes de diarrea como laxantes y antibióticos.

25 La presencia y la gravedad de la enfermedad es un factor importante para recomendar un curso de tratamiento adecuado. En general, los pacientes con la enfermedad por *C. difficile* a menudo presentan fiebre, tienen los glóbulos blancos ligeramente elevados (leucocitosis) y experimentan dolor abdominal leve. El estado de portador incluye aquellos pacientes que están colonizados con *C. difficile* pero carecen de toxina en las deposiciones e inflamación intestinal que indica que algo más está causando los síntomas. Los pacientes que se determina que son portadores aún pueden ser ubicados en salas de aislamiento, pero no recibirán tratamiento para la CDI. Determinar el estado de portador es importante al decidir un curso de tratamiento, ya que los antibióticos podrían alterar la flora normal y hacer que el paciente sea susceptible a la enfermedad por *C. difficile*. Además, un bajo nivel de células como lo indican los bajos niveles de GDH de *C. difficile* puede diferenciar aún más entre pacientes que son infecciosos versus no infecciosos y, por lo tanto, permite el alta de las salas de aislamiento.

35 Oppenheimer y otros (informe de la conferencia Scientific Symposium on New Approaches to *Clostridium difficile* Testing del Simposio Satélite celebrado durante la Semana de la Gastroenterología en la Unión Europea (UEGW) de 2010, 23 de octubre de 2010) y Langhorst y otros (Gastroenterology, 138 (5) S-197, resumen S1178) describen el uso de la GDH y las toxinas A/B para identificar la enfermedad por *C. difficile* y la lactoferrina para investigar la inflamación intestinal.

40 Para los pacientes con la enfermedad, los casos leves responden bien a la suspensión del antibiótico incitante mientras que los casos de enfermedad por *C. difficile* moderada a grave a menudo requieren intervención antibiótica. Actualmente, ningún parámetro de laboratorio único se usa habitualmente para estratificar a los pacientes según la gravedad de la enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD) para optimizar el tratamiento médico y/o quirúrgico. La tasa de recaída es de aproximadamente el 20 % de los pacientes que ocurre dentro de días a un mes después del final del tratamiento con antibióticos.

45 Breve descripción de las distintas vistas de los dibujos

Los aspectos de la descripción se describen en detalle a continuación con referencia a las figuras de dibujos adjuntas, en las que:

50 La Figura 1A representa las características de los pacientes diagnosticados con la enfermedad por *C. difficile*;

La Figura 1B representa los niveles medios de lactoferrina ( $\mu\text{g/mL} \pm$  error estándar) para los pacientes con casos clínicamente definidos de la enfermedad por *C. difficile* estratificada según la gravedad;

55 La Figura 2 representa los niveles medios de lactoferrina ( $\mu\text{g/mL} \pm$  error estándar) para los pacientes estratificados por ARL 027 versus otro robotipo de las infecciones por *C. difficile*;

60 La Figura 3 representa la monitorización diaria de los niveles de lactoferrina durante y después del tratamiento con antibióticos en un paciente con la enfermedad por *C. difficile*;

La Figura 4A muestra un resumen de los resultados de biomarcadores para pacientes con curación clínica (sin síntomas y sin *C. difficile* durante y/o después del tratamiento inicial);

65 La Figura 4B representa un resumen de los resultados de biomarcadores para pacientes con reinfección bacteriana (retorno de *C. difficile* en ausencia de síntomas durante y/o después del tratamiento inicial);

La Figura 4C representa un resumen de los resultados de biomarcadores para pacientes con recurrencia clínica o sin cura (retorno de síntomas y *C. difficile* durante y/o después del tratamiento inicial);

5 La Figura 5 representa una curva estándar generada por una prueba cuantitativa ELISA para la GDH usando el antígeno GDH de *C. difficile* purificado;

La Figura 6 representa una curva estándar generada por una prueba cuantitativa ELISA para lactoferrina usando el antígeno de lactoferrina purificado;

10

La Figura 7 representa un resumen de la monitorización de un paciente curado de *C. difficile* usando el tratamiento antibiótico Difcid con biomarcadores de la enfermedad por *C. difficile* que incluyen el promedio de la GDH (ng/ml), la toxina (densidad óptica por ELISA ABII) y niveles de lactoferrina ( $\mu\text{g/ml}$ );

15

La Figura 8 representa un resumen de la monitorización de un paciente con infección continua de *C. difficile* durante el tratamiento antibiótico con rifaximina usando biomarcadores de la enfermedad por *C. difficile* que incluyen el promedio de la GDH (ng/ml), la toxina (densidad óptica por ELISA ABII) y niveles de lactoferrina ( $\mu\text{g/ml}$ ); y

La Figura 9 representa la utilización de un panel de biomarcadores de diagnóstico que incluye GDH cuantitativa, lactoferrina cuantitativa y la toxina en las deposiciones como ayuda para diferenciar a los pacientes con la enfermedad por *C. difficile* de aquellos con estado de portador.

20

#### Descripción detallada de la invención

25

La presente invención está dirigida a los métodos de prueba para ayudar a estratificar a los pacientes según la gravedad de la enfermedad por *C. difficile*. Estratificar a los pacientes con la enfermedad según la gravedad usando un panel de biomarcadores es un concepto nuevo que es críticamente necesario debido al aumento de la incidencia y las frecuentes presentaciones graves y el uso excesivo de antibióticos. La aparición de la cepa del brote ribotipo ARL 027 que produce más toxinas y esporas se ha relacionado con la enfermedad por *C. difficile* más grave y una mayor probabilidad de recaída. Además, los medicamentos más nuevos como el antibiótico fidaxomicina (Difcid) ofrecen opciones de tratamiento adicionales para la enfermedad por *C. difficile*. En un estudio publicado por L. Kyne y otros 1999, los autores realizaron una caracterización detallada de los estados de la enfermedad para un brote de CDAD en Dublín, Irlanda. Este brote en particular involucró a 14 pacientes que eran positivos para las citotoxinas en las deposiciones pero eran asintomáticos. De los pacientes sintomáticos, el 25 % tenía la enfermedad leve autolimitante sin tratamiento con antibióticos, el 35 % tenía la enfermedad por *C. difficile* moderadamente grave que responde al tratamiento con antibióticos y el 40 % desarrolló la enfermedad grave con síntomas prolongados que duran entre once y treinta y seis días. Un total de 8 % de los pacientes con la enfermedad por *C. difficile* progresó a colitis grave con pseudomembranas y megacolon tóxico. Los autores señalaron que los médicos deben conocer los indicadores tempranos de la gravedad de la enfermedad para reducir la morbilidad y la mortalidad en los casos de la enfermedad por *C. difficile*.

30

35

40

Se ha evaluado una combinación de presentaciones clínicas y varios parámetros de laboratorio para estratificar a los pacientes según la actividad de la enfermedad (*por ejemplo*, leve, moderado y moderado a grave). El conteo de glóbulos blancos (WBC), el nivel de albúmina sérica (indicador de filtración al intestino) y el nivel de creatinina para la monitorización del fallo renal son los indicadores de laboratorio más usados para la actividad de la enfermedad por *C. difficile*. Los casos leves a moderados de *C. difficile* generalmente se presentan con un WBC  $\leq 15,000/\mu\text{L}$ , creatinina sérica normal ( $<2,0$  mg/dL) y niveles de albúmina ( $\geq 2,5$  g/dL). Los síntomas incluyen tener menos de 10 deposiciones acuosas sin sangre por día y calambres leves que duran hasta un promedio de 4 días. Un tratamiento común para los pacientes con un episodio inicial de leve a moderado de la enfermedad por *C. difficile* es el tratamiento con un miembro de la clase de antibióticos nitroimidazol. Por ejemplo, la enfermedad leve a moderada por *C. difficile* puede tratarse con 500 mg de metronidazol, tres veces al día durante diez días. La mayoría de los casos se resuelven sin más complicaciones, pero hasta el 25 % de estos casos pueden recaer varias veces y requerir una segunda ronda de antibióticos, que históricamente ha incluido el tratamiento con un miembro de la clase de antibióticos glucopéptidos, como la vancomicina. Sin embargo, ahora tales segundas rondas de antibióticos incluyen miembros de la clase macrocíclica de antibióticos, tales como la fidaxomicina (Difcid).

45

50

55

Los pacientes mayores de sesenta y cinco años con múltiples comorbilidades tienen un mayor riesgo de la enfermedad por *C. difficile* y más a menudo sufren de una enfermedad más grave que conduce a múltiples recaídas. La enfermedad por *C. difficile* grave fulminante se caracteriza por tener once o más deposiciones líquidas por día durante más de diez días. Las muestras de deposiciones a menudo contienen moco y pueden ser sanguinolentas. Los parámetros de laboratorio definidos para la colitis por *C. difficile* fulminante son WBC  $\geq 15,000/\mu\text{L}$ , un aumento de la creatinina sérica (aumento del 50 % y niveles  $\geq 2,0$  mg/dL) que indica una función renal deficiente y niveles de albúmina que caen por debajo de 2,5 g/dL y muestran pérdida de proteína debido a la exudación de suero al intestino. Las presentaciones clínicas pueden incluir pseudomembranas en la endoscopia, dolor abdominal grave y calambres, y engrosamiento del colon observado por tomografía computarizada. El megacolon tóxico derivado del íleo puede causar náuseas, vómitos, deshidratación grave y letargo extremo. El tratamiento para casos graves y recurrentes de la enfermedad por *C. difficile* generalmente involucra 125 mg de vancomicina 4 veces al día durante 10 días.

60

65

Identificar la actividad de la enfermedad en pacientes con infección por *C. difficile* es imprescindible para un tratamiento adecuado y un mejor resultado con una disminución de la morbilidad y la mortalidad. En la presente descripción se describe un parámetro de diagnóstico para evaluar la gravedad en la enfermedad por *C. difficile* midiendo la lactoferrina en las deposiciones y usando la medición de la lactoferrina en las deposiciones como un indicador de inflamación intestinal causada por el *C. difficile*. Las modalidades de la invención están dirigidas a la medición de biomarcadores de la enfermedad en pacientes infectados con *C. difficile* para monitorear la efectividad del tratamiento y el potencial de recaída, como se discutirá con más detalle a continuación. La invención proporciona métodos para medir una cantidad de *C. difficile* en una muestra de deposiciones según la reivindicación 1 y métodos de monitorización de un paciente con la enfermedad por *C. difficile* según la reivindicación 5.

La enfermedad por *C. difficile* es una enfermedad inflamatoria que implica la infiltración de neutrófilos activados a través de la mucosa hacia la luz que causa colitis y, en casos graves, la formación de pseudomembranas. La lactoferrina humana es una glucoproteína que está presente en la mayoría de las secreciones de la mucosa y un componente primario de los gránulos de neutrófilos activados. Durante el inicio de la inflamación intestinal por *C. difficile*, los neutrófilos activados se infiltran en la luz intestinal y causan un aumento de la lactoferrina fecal.

Las muestras fecales se recolectan rutinariamente para la prueba del *C. difficile* (antígeno y toxina). En consecuencia, se pueden realizar pruebas adicionales para medir el nivel de lactoferrina fecal para determinar la cantidad de inflamación intestinal como un indicador de la gravedad de la enfermedad. Además, combinar la presencia de antígeno y los niveles de toxinas A y B con las concentraciones de lactoferrina fecal puede ayudar al médico a determinar si un paciente es portador de pacientes que tienen verdaderas infecciones leves a graves para un tratamiento médico óptimo.

Como se describe en la presente descripción, se proporciona un método para evaluar la gravedad de la enfermedad en pacientes con la enfermedad por *C. difficile* usando niveles de lactoferrina fecal. La toxina A es una proteína quimiotáctica fuerte que provoca la liberación de IL-8 y la infiltración de neutrófilos activados en la mucosa intestinal. De hecho, se ha demostrado que las concentraciones de toxina A de 100 veces menos que la de la toxina B estimulan la liberación de IL-8. La toxina A también estimula otras citocinas proinflamatorias, incluidas la IL-1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). La toxina B es una citotoxina que causa daño tisular e inflamación que contribuye, junto con la toxina A que causa la acumulación de líquido, a la enfermedad. Los efectos combinados de la toxina enterotóxica y quimiotáctica A y los efectos citotóxicos de la toxina B contribuyen en gran medida a la gravedad de la enfermedad. En un estudio de Kuehne y otros, los mutantes knockout mostraron que los mutantes A+B- y A-B+ eran citotóxicos y causaban enfermedades en el modelo de hámster. Un hallazgo interesante fue que cuando la *tcdB* fue inactivada por una inserción, el mutante A+B- resultante mostró una citotoxicidad aumentada de la toxina A en el cultivo celular. El aumento de la citotoxicidad no fue neutralizado completamente por el anticuerpo específico antitoxina A. La razón del aumento de la citotoxicidad después de la inactivación de *tcdB* no se determinó pero se pensó que se debía a una mayor expresión. El mutante de doble desactivación A-B- no causó la enfermedad en el hámster. Estos resultados confirmaron que tanto la TcdA como la TcdB en combinación e independientemente causan enfermedad. En otro estudio, el análisis de los aislados A-B+ mostró una variante de toxina B que fue significativamente más letal en un ratón que la toxina B normal. Estos estudios respaldan el papel de ambas toxinas en la enfermedad. Un método para determinar la presencia de inflamación intestinal en combinación con la presencia de toxina en las deposiciones puede ofrecer información adicional sobre el estado de la enfermedad para pacientes con infección por *C. difficile*.

La presente invención proporciona la determinación de la presencia de la enfermedad por *C. difficile* usando un panel de biomarcadores que incluye, a modo de ejemplo, el antígeno GDH de *C. difficile*, las toxinas A (*tcdA* o TcdA) y B (*tcdB* o TcdB) para determinar la presencia de *C. difficile* toxigénica. Como se entenderá, otras modalidades de la invención utilizan biomarcadores adicionales para la infección por *C. difficile*. Cuando un diagnóstico de la enfermedad por *C. difficile* ha concluido, las concentraciones de lactoferrina fecal pueden usarse para determinar la gravedad de la enfermedad. En pacientes con sospecha de infección con *C. difficile*, si la GDH está presente, indicando la presencia de *C. difficile*, luego se detectan las toxinas A y/o B (genes y/o proteínas) para mostrar la presencia del *C. difficile* toxigénico seguido por la medición de los niveles de lactoferrina fecal como un indicador de inflamación intestinal. Saber si el *C. difficile* toxigénico está presente en combinación con una concentración de lactoferrina ayudará a determinar la gravedad de la enfermedad para optimizar el tratamiento.

En las modalidades, se utilizan las mediciones en serie de los biomarcadores para las infecciones por *C. difficile*. Por ejemplo, los niveles de lactoferrina, GDH, toxina A y/o toxina B pueden monitorearse a intervalos regulares durante el análisis y/o tratamiento para monitorear el estado de la enfermedad y/o la efectividad del tratamiento. En las modalidades, el análisis en serie de la presencia de los biomarcadores (lactoferrina, GDH, toxinas A y/o B) proporciona un indicador de la bacteria, que puede usarse para determinar la respuesta de un paciente al tratamiento. La mayoría de los tratamientos con antibióticos se administran durante diez (10) días seguidos de una evaluación clínica para la cura. Además, después del régimen de antibióticos por 10 días, algunos pacientes siguen siendo portadores del *C. difficile* dejándolos en riesgo de una recaída clínica. La información sobre la efectividad del tratamiento dentro de los días posteriores al episodio inicial puede permitir un ajuste en la terapia farmacológica que resulte en un manejo médico óptimo de los pacientes. Por ejemplo, los pacientes que están infectados con la cepa del brote, el ribotipo 027 que produce más toxinas, corren un mayor riesgo de enfermedad grave que conduce a la colectomía y/o a la muerte. Estos pacientes se beneficiarían de una estrecha vigilancia de su enfermedad por *C. difficile* usando biomarcadores de inflamación y por la cantidad de *C. difficile*

y sus toxinas. Al identificar a los pacientes que no responden al tratamiento antes en su régimen de 10 días, puede ofrecer la opción de cambiar la terapia para obtener mejores resultados.

5 El nivel de lactoferrina en muestras fecales proporciona una indicación de la gravedad del *C. difficile*. Por ejemplo, la enfermedad por *C. difficile* "leve" puede estar indicada en muestras con niveles de lactoferrina cercanos a 7,25 µL/ml de lactoferrina. Un diagnóstico de enfermedad por *C. difficile* leve está indicada en muestras con niveles más bajos de lactoferrina combinados con indicadores clínicos para definir la enfermedad leve. Por ejemplo, los indicadores clínicos como la cantidad de deposiciones no formadas por día, la presencia de fiebre, dolor abdominal y vómitos pueden caracterizarse y/o determinarse como indicativos de un diagnóstico de enfermedad por *C. difficile* leve, y puede analizarse  
10 junto con una medición baja de lactoferrina cerca o alrededor de los niveles basales (<7,25 µg/ml de lactoferrina), para determinar la gravedad de la enfermedad. En las modalidades, los indicadores clínicos para el diagnóstico de la enfermedad por *C. difficile* leve incluye tener de tres a cinco deposiciones por día y un conteo de glóbulos blancos menor o igual a 15,000/mm<sup>3</sup>. En modalidades adicionales, los parámetros de laboratorio tales como la proteína C reactiva (CRP), el conteo de glóbulos blancos (WBC), la albúmina sérica y/o la creatinina, se pueden combinar con un nivel de lactoferrina,  
15 un nivel de calprotectina y/o un indicador(es) clínico(s) para determinar la gravedad de la enfermedad en pacientes con diagnóstico de *C. difficile*.

En otro ejemplo, la enfermedad por *C. difficile* "moderada" puede estar indicada en muestras con niveles superiores a 99,99 µg/ml de lactoferrina. Un diagnóstico de la enfermedad por *C. difficile* moderada está indicada en muestras con más  
20 de 99,99 µg/ml de lactoferrina, combinada con indicadores clínicos para definir la enfermedad moderada. Por ejemplo, los indicadores clínicos tales como el número de deposiciones no formadas por día, la presencia de fiebre, dolor abdominal y vómitos pueden caracterizarse y/o determinarse como indicativos de un diagnóstico de enfermedad por *C. difficile* moderada, y puede analizarse junto con una medición de más de 99,99 µg/ml de lactoferrina, para determinar la gravedad de la enfermedad. En las modalidades, los indicadores clínicos para un diagnóstico de enfermedad por *C. difficile* moderada incluye tener de seis a nueve deposiciones por día, un conteo de glóbulos blancos de 15,001/mm<sup>3</sup> hasta  
25 20,000/mm<sup>3</sup> y dolor abdominal moderado. En modalidades adicionales, los parámetros de laboratorio tales como la proteína C reactiva (PCR), el conteo de glóbulos blancos (WBC), la albúmina sérica y/o la creatinina, pueden combinarse con un nivel de lactoferrina, un nivel de calprotectina y/o un indicador(es) clínico(s) para determinar la gravedad de la enfermedad en pacientes con diagnóstico de *C. difficile* moderado.

30 En otro ejemplo, la enfermedad por *C. difficile* "moderada a grave" puede estar indicada en muestras cercanas a 500 µg/ml o más de lactoferrina. Un diagnóstico de enfermedad por *C. difficile* moderada a grave está indicada en muestras cercanas a 500 µg/ml o más de lactoferrina, combinadas con indicadores clínicos para definir la enfermedad de moderada a grave. Por ejemplo, los indicadores clínicos como el número de deposiciones no formadas por día, la presencia de fiebre, dolor abdominal y vómitos pueden caracterizarse y/o determinarse como indicativos de un diagnóstico de enfermedad por *C. difficile* moderado a grave, y puede analizarse junto con una medición cercana a 500 µg/ml o más de lactoferrina, para determinar la gravedad de la enfermedad. En las modalidades, los indicadores clínicos para un diagnóstico de *C. difficile* moderado a grave incluye tener diez o más deposiciones por día, un conteo de glóbulos blancos de 20,001/mm<sup>3</sup> o mayor, y dolor abdominal grave. En modalidades adicionales, los parámetros de laboratorio tales como  
35 la proteína C reactiva (PCR), el conteo de glóbulos blancos (WBC), la albúmina sérica y/o la creatinina, se pueden combinar con un nivel de lactoferrina, un nivel de calprotectina y/o un indicador(es) clínico(s) para determinar la gravedad de la enfermedad en pacientes con diagnóstico de *C. difficile* moderado a grave.

45 Un método ilustrativo para probar la presencia del biomarcador GDH de *C. difficile* es utilizar la prueba *C. DIFF CHEK™* - 60, que usa anticuerpos específicos para la GDH de *C. difficile*. La *Placa de Microensayo* contiene un anticuerpo policlonal contra el antígeno GDH inmovilizado, mientras que el *Conjugado* consiste en un anticuerpo monoclonal altamente específico conjugado con peróxido de rábano picante. Si el antígeno GDH está presente en la muestra, se detecta un color debido a los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en el ensayo.

50 Un método ilustrativo para evaluar la presencia de la toxina A y la toxina B es usar la prueba *C. DIFFICILE TOX A/ B II™*, que usa anticuerpos contra las toxinas A y B del *C. difficile*. La prueba utiliza un anticuerpo policlonal contra las toxinas A y B, purificado por afinidad inmovilizado, y el anticuerpo de detección consiste en una mezcla de anticuerpo monoclonal de toxina A conjugado con la peroxidasa de rábano picante y un anticuerpo policlonal de toxina B conjugado con peroxidasa de rábano picante. Si las toxinas A y B están presentes en la muestra, se detecta un color debido a los  
55 complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en el ensayo.

Un método ilustrativo para probar la presencia de GDH, de toxina A y toxina B es usar la prueba *QUIK CHEK COMPLETED™*, que usa anticuerpos específicos para la GDH y las toxinas A y B de *C. difficile*. El dispositivo contiene tres líneas verticales de anticuerpos inmovilizados, la línea de prueba del antígeno contiene anticuerpos contra la GDH  
60 de *C. difficile*, y la línea de control es una línea de puntos que contiene anticuerpos anti peroxidasa de rábano picante. La línea de prueba de las toxinas A y B contiene anticuerpos contra las toxinas A y B del *C. difficile* y el *Conjugado* consiste en anticuerpos contra la GDH y anticuerpos contra las toxinas A y B acopladas a la peroxidasa de rábano picante. La reacción de GDH se examina visualmente para detectar la aparición de una línea azul vertical, que indica una prueba positiva, mientras que una línea azul también indica una prueba positiva para la toxina A y la toxina B.

65

Un método ilustrativo para probar la presencia de la toxina de *C. difficile* es la *C. DIFFICILE TOX-B TEST™*, que usa un formato de cultivo de tejidos para detectar la presencia de actividad citotóxica en muestras fecales y confirma la identificación de la toxina de *C. difficile* usando una antitoxina específica. La prueba confirma la presencia de la toxina de *C. difficile* neutralizando la actividad citotóxica con un reactivo que es una antitoxina específica. En el ensayo, si la toxina de *C. difficile* está presente, las células en el pozo con PBS se volverán redondas, demostrando la presencia de la actividad citotóxica, mientras que la presencia de la toxina de *C. difficile* se confirma si la actividad citotóxica se neutraliza en el pozo que contiene antitoxina.

Un método ilustrativo para tratar al *C. difficile* es a través de un trasplante de flora nativa. Este proceso, también conocido como trasplante de microbiota fecal (FMT), es la restauración de la flora del colon mediante la introducción de una flora bacteriana saludable a través de la infusión de deposiciones, por ejemplo, mediante enema, obtenido de un donante humano sano. Un trasplante de flora nativa también se puede administrar como un líquido que el paciente bebe.

Los siguientes son ejemplos de procedimientos que se han utilizado para establecer los ensayos preferidos de acuerdo con la presente invención. Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no se presentan a modo de limitación.

#### Ejemplo 1

Los niveles de lactoferrina fecal se evaluaron en pacientes con la enfermedad clínicamente definida por *C. difficile* que varía de la enfermedad leve a moderada a grave. En resumen, los pacientes con la enfermedad por *C. difficile* clínicamente confirmada que presentaban un espectro de gravedad se reclutaron junto con catorce sujetos sanos de la misma edad y sexo definidos como no teniendo enfermedades intestinales. La actividad de la enfermedad se definió mediante la evaluación del médico y se basó en los síntomas, la albúmina sérica, los conteos de leucocitos y las comorbilidades. La lactoferrina fecal se midió usando un inmunoensayo enzimático cuantitativo (EIA). La *glutamato deshidrogenasa (GDH)* de *C. difficile* y las toxinas A y B en las deposiciones se detectaron mediante el uso de un EIA basado en membrana. El cultivo toxigénico se realizó mediante enriquecimiento de esporas y se analizaron tanto los aislamientos como las muestras de deposiciones mediante un ensayo de cultivo de tejidos para determinar la citotoxicidad.

#### Resultados

Treinta y nueve casos clínicamente confirmados de la enfermedad por *C. difficile* (quince moderados a graves, veintiuno moderados y tres leves) se evaluaron durante un período de seis meses. Las edades iban de treinta y dos a ochenta y nueve años y el cincuenta por ciento eran mujeres. Las comorbilidades predominantes fueron diabetes (31 %), cáncer (23 %) y fallo renal (23 %). Todos los pacientes eran GDH-positivos y el *C. difficile* toxigénico fue aislado de todos menos de cuatro pacientes. Los niveles medios de lactoferrina ( $\mu\text{g/mL} \pm$  error estándar) fueron  $1198 \pm 404$  para moderado a grave,  $132 \pm 50$  para moderado,  $12 \pm 5$  para leve y  $2 \pm 0,3$  para sujetos sanos. La toxina de las deposiciones se detectó mediante cultivo de tejidos en el 87 % (13/15) de moderada a grave, 71 % (15/21) de moderada y 33 % (1/3) para enfermedad leve. Dos de los pacientes de moderados a graves con los niveles más bajos de lactoferrina ( $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ ) y tres de los cuatro más bajos con niveles moderados ( $\leq 12 \mu\text{g/ml}$ ) también fueron negativos para el cultivo de tejidos. De estos pacientes, tanto los pacientes graves como dos de los cuatro moderados tuvieron cultivos de deposiciones negativos. Todos estos pacientes tenían comorbilidades que contribuyeron a las evaluaciones clínicas. Nuestra conclusión es que, en un entorno clínico, las comorbilidades pueden complicar la evaluación clínica de la infección por *C. difficile*. Nuestros resultados muestran que la lactoferrina fecal es útil para indicar la gravedad de la enfermedad en pacientes con infección por *C. difficile*.

Por consiguiente, la Figura 1A detalla las características del paciente para casos clínicamente confirmados de la enfermedad por *C. difficile*. La mayoría de los pacientes tenían  $>64$  años, experimentaban dolor, tenían deposiciones líquidas y sufrían comorbilidades, como diabetes, cáncer, fallo renal y neumonía. La Figura 1B muestra que los niveles de lactoferrina fueron significativamente más altos entre los casos leves, moderados y moderados a graves de la enfermedad por *C. difficile* y la tendencia más alta para el grupo moderado a grave.

La Figura 2 muestra los niveles medios de lactoferrina para pacientes con la enfermedad por *C. difficile* clínicamente confirmada agrupados por ribotipo. Los pacientes infectados con el ARL 027 tenían niveles significativamente más altos de lactoferrina que los pacientes infectados con otros ribotipos. Los estudios han demostrado que los pacientes infectados con el ARL 027 tienden a tener toxinas en las deposiciones y se presentan con una enfermedad más grave.

#### Ejemplo 2

La GDH de *C. difficile* fecal, las toxinas A y B, y los niveles de lactoferrina humana se midieron en varios sujetos con la enfermedad por *C. difficile* durante el tratamiento con antibióticos. Ambos sujetos con la enfermedad por *C. difficile* clínicamente confirmada se monitorizaron para detectar la presencia de GDH, toxinas A y B y lactoferrina fecal mediante inmunoensayo enzimático (EIA). La recolección de muestras se inició al inicio del tratamiento con antibióticos y se continuó de forma diaria o semanal cuando fue posible. Cada paciente mantuvo un registro de síntomas y todos los tratamientos se registraron durante el período de prueba. Ambos pacientes mostraron una respuesta rápida al tratamiento con antibióticos y la GDH fecal, las toxinas A y B, y la lactoferrina fecal alcanzaron el valor basal en 24 horas. El antígeno, la toxina y la lactoferrina fecal permanecieron negativos durante la terapia con antibióticos. Después del tratamiento, ambos

pacientes experimentaron una recaída clínica y mostraron un rápido aumento de todos los parámetros. Después de un segundo ciclo de antibióticos, todos los parámetros volvieron al basal. Al finalizar el segundo ciclo de antibióticos, todos los parámetros aumentaron rápidamente en ausencia de síntomas clínicos. Tanto la GDH como la toxina permanecieron presentes durante 3 a 4 semanas, pero la lactoferrina fecal volvió rápidamente al basal. No se administraron antibióticos ya que no hubo síntomas clínicos y los pacientes permanecieron sanos.

#### Resultados

En esta evaluación, se observó que la GDH, toxina y lactoferrina fecal de *C. difficile* respondieron rápidamente a la terapia con antibióticos volviendo al valor basal (negativo). Más interesante aún, tanto la GDH como la toxina estaban presentes sin síntomas clínicos y sin inflamación intestinal según lo determinado por la lactoferrina basal. Estos resultados muestran un papel para la lactoferrina fecal en combinación con mediciones de antígenos y toxinas para determinar qué casos de la enfermedad por *C. difficile* puede no requerir tratamiento adicional con antibióticos. Además, nuestra invención proporciona un papel para la lactoferrina fecal en el monitoreo de la enfermedad por *C. difficile*. Al determinar la cantidad de inflamación intestinal mediante el uso de lactoferrina en pacientes con la enfermedad por *C. difficile* junto con evaluaciones clínicas, la identificación de los pacientes por la gravedad de la enfermedad puede resultar útil para optimizar el tratamiento y conducir a mejores resultados para el paciente.

El tratamiento para la enfermedad por *C. difficile* puede optimizarse ya que los diferentes niveles de gravedad requieren diferentes recomendaciones de tratamiento. Por ejemplo, los casos leves de la enfermedad por *C. difficile* a menudo no recibe tratamiento con antibióticos. Por el contrario, un caso de gravedad moderada puede requerir un antibiótico como el metronidazol, mientras que un caso de la enfermedad por *C. difficile* moderado a grave puede tratarse con antibióticos como vancomicina y fidaxomicina (Dificid).

La Figura 3 ilustra los niveles diarios de lactoferrina del episodio inicial de la infección por *C. difficile*, durante y después del tratamiento con antibióticos. La lactoferrina estaba elevada ( $\geq 7,25$   $\mu\text{g/ml}$ ) durante el episodio inicial y para ambos períodos de recaída. Los niveles disminuyen rápidamente una vez que se inicia el tratamiento y aumentan a medida que los síntomas regresan.

#### Ejemplo 3

Los pacientes (pts) con diarrea y positivos para la toxina (TcdA y TcdB) en las deposiciones y/o glutamato deshidrogenasa (GDH) fueron reclutados con consentimiento informado. Las muestras de deposiciones se recolectaron desde el ingreso (T = 0) hasta el seguimiento (T = F). La GDH, la toxina y la lactoferrina (LF: mediana  $\mu\text{g/g}$ ) se midieron en muestras de deposiciones por inmunoensayo. El cultivo bacteriano y los conteos (mediana de CFU #/g) se realizaron con enriquecimiento con etanol y los aislamientos se ribotiparon. Un total de 18 pacientes hospitalizados fueron reclutados y seguidos durante un período medio de 21 días de T = 0 a T = F. La mediana de edad fue de 75 años y la relación hombre:mujer fue de 1:3,5. Los pacientes se estratificaron en 3 grupos (i) pacientes que fueron tratados y no mostraron recurrencia (N = 9). (ii) pacientes que fueron tratados con resolución completa de síntomas pero que tenían CDI (N = 5) y (iii) pacientes que respondieron inicialmente al tratamiento pero recayeron (N = 4).

#### Resultados

Los pacientes en el grupo (i) pasaron de ser muy positivos para la GDH, la toxina y un conteo de esporas de  $10^4$  en T = 0, a negativos para todos los biomarcadores en T = F. LF cayó de 406 a 4 durante este período (Tabla 1a). Cuatro de los 5 pacientes en el grupo (ii) fueron positivos para la GDH, la toxina, y tuvieron un conteo de esporas de  $10^4$  en T = 0. En T = F, 3 de los 5 pts eran negativos para la toxina, 3 pts seguían siendo positivos para la GDH y todos los pts tenían esporas ( $10^3$ ) La LF para estos pacientes disminuyó de 85 a 2 asociada con la resolución de los síntomas (Tabla 1b). Para el grupo (iii), los 4 pacientes permanecieron sintomáticos y se mantuvieron fuertemente positivos para la GDH, la toxina, y tuvieron un conteo de esporas de  $10^4$ . Los niveles de LF para este grupo fueron similares tanto en T = 0 como en T = F (362 y 315, respectivamente) (Tabla 1c). Un total de 5 (28 %) pts tuvo 027 CDI en T = 0. En el grupo (ii), 3 de 5 pts fueron reinfectados con 027 como portadores. En el grupo (iii), 1 paciente se convirtió a 027. \*\* Todos los aislamientos de 027 fueron resistentes a las fluoroquinolonas. En nuestro estudio, a T = F, el 50 % de los pacientes no tenía CDI, el 28 % se convirtió en portador y el 22 % permaneció enfermo. Los niveles de GDH, toxina y LF se correlacionaron con la presencia de la enfermedad clínica. El *C. difficile* continúa siendo una infección compleja, y el diagnóstico preciso de la enfermedad se basa en la historia clínica utilizada junto con biomarcadores para el organismo y para la inflamación.

La Figura 4A muestra los resultados de los biomarcadores de CDI antes y después del tratamiento con antibióticos para la enfermedad por *C. difficile*. Todos los pacientes en este grupo tuvieron una cura clínica, lo que significa que no hubo síntomas ni *C. difficile* detectado durante y después del tratamiento antibiótico inicial.

La Figura 4B muestra los resultados de los biomarcadores de CDI antes y después del tratamiento antibiótico para la enfermedad por *C. difficile*. Todos los pacientes en este grupo tuvieron una reinfección de *C. difficile* lo que significa que el organismo de *C. difficile* se detectó en ausencia de síntomas durante y/o después del tratamiento antibiótico inicial.

La Figura 4C muestra los resultados de los biomarcadores de CDI antes y después del tratamiento con antibióticos para la enfermedad por *C. difficile*. Todos los pacientes en este grupo tuvieron una recurrencia clínica o ninguna cura, lo que significa que los síntomas y el organismo *C. difficile* se mantuvo o regresó durante y/o después del tratamiento antibiótico inicial.

5

La Figura 5 representa una curva estándar generada por una prueba cuantitativa ELISA para la GDH usando el antígeno GDH de *C. difficile* purificado mientras que la Figura 6 ilustra una curva estándar generada por una prueba cuantitativa de ELISA para lactoferrina usando el antígeno de lactoferrina purificado.

10

La Figura 7 representa la monitorización de un paciente curado de *C. difficile* usando un tratamiento antibiótico con Dificid con biomarcadores de la enfermedad por *C. difficile* que incluyen la media de la GDH (ng/ml), la toxina (densidad óptica por ELISA ABII) y los niveles de lactoferrina (µg/ml). Como se ilustra en la Figura 7, se analizaron muestras fecales del paciente y, como es evidente, los niveles de GDH disminuyeron y no se detectaron al concluir que los biomarcadores del régimen antibiótico muestran una cura en el paciente con Dificid. Además, los niveles de lactoferrina y toxina también disminuyeron notablemente. Esto es útil al identificar si una terapia de tratamiento es efectiva o no.

15

La Figura 8 representa la monitorización de un paciente que tiene infección continua con *C. difficile* durante el tratamiento con antibióticos de rifaximina usando biomarcadores de la enfermedad por *C. difficile* que incluyen la media de la GDH (ng/ml), la toxina (densidad óptica por ELISA ABII) y los niveles de lactoferrina (µg/ml). En contraste a la Figura 7, la Figura 8 ilustra que las muestras fecales del individuo que aún sufre de la enfermedad por *C. difficile* experimentó un aumento en la GDH. Específicamente, el nivel de GDH parece disminuir, pero luego comienza a aumentar a medida que la terapia demuestra ser ineficaz.

20

La Figura 9 representa la utilización de un panel de biomarcadores de diagnóstico que incluye la GDH cuantitativa, lactoferrina cuantitativa y toxina en las deposiciones como ayuda para diferenciar pacientes con la enfermedad por *C. difficile* de aquellos en estado de portador. Los resultados muestran los niveles de biomarcadores para diferenciar a los pacientes en estado de portador de aquellos con la enfermedad activa. Una combinación de los biomarcadores y los síntomas clínicos se usan en combinación para determinar los portadores de los pacientes con enfermedad. Por ejemplo, los pacientes con niveles de lactoferrina cercanos al valor basal (7,25 µg/g), de GDH <1000 ng/g, y con poca o ninguna toxina son sospechosos del estado de portador. En contraste, los pacientes con toxina en las deposiciones, niveles más altos de lactoferrina y GDH son sospechosos de enfermedad. Los ensayos moleculares como la PCR son altamente sensibles y muestran resultados positivos para pacientes en estado de portador y con la enfermedad. La adición de biomarcadores con evaluaciones clínicas ofrece un método para determinar qué pacientes requieren tratamiento para un resultado óptimo.

25

30

35

Como se describe en la presente descripción, la calprotectina fecal se puede utilizar además de la lactoferrina fecal como un marcador no invasivo para medir la inflamación intestinal. Por ejemplo, en una persona diagnosticada con la enfermedad por *C. difficile*, se puede medir un nivel cuantitativo de calprotectina fecal y el nivel cuantitativo se puede asociar con una gravedad de la enfermedad que incluye leve, moderada y moderada a grave. Además, la calprotectina fecal se puede medir después del tratamiento para monitorizar la respuesta de una persona al tratamiento médico o un nivel de actividad de la enfermedad.

40

Se describen métodos no invasivos para identificar la gravedad de la enfermedad por *C. difficile* en personas diagnosticadas con la enfermedad por *C. difficile* usando la lactoferrina. La gravedad de la enfermedad identificada se puede usar para recomendar un curso de tratamiento preferido para la persona. La divulgación se dirige además a utilizar cambios en los niveles de lactoferrina para monitorizar la actividad de la enfermedad de una persona y/o la respuesta al tratamiento.

45

Los inmunoensayos descritos en la presente descripción detectan la lactoferrina, una proteína estable que sirve como un indicador de inflamación intestinal, y proporciona niveles cuantitativos de lactoferrina fecal para asociar la gravedad de la enfermedad por *C. difficile* y para monitorizar la actividad de la enfermedad. La presente invención se ha descrito en relación con modalidades particulares que pretenden en todos los aspectos ser ilustrativas más que restrictivas. Las formas de modalidad alternativas serán evidentes para los expertos en la materia a los que pertenece la presente invención sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

50

55

De lo anterior, se verá que esta invención es una bien adaptada para alcanzar todos los fines y objetos expuestos en la presente descripción anteriormente junto con otras ventajas que son obvias y que son inherentes al método. Se entenderá que ciertas características y subcombinaciones son de utilidad y pueden emplearse sin referencia a otras características y subcombinaciones. Esto está contemplado por y está dentro del alcance de las reivindicaciones.

60



## REIVINDICACIONES

1. Un método para medir una cantidad de *C. difficile* en una muestra fecal, el método que comprende: medir cuantitativamente un nivel de lactoferrina, de la glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile* y de la toxina A de *C. difficile* o de la toxina B de *C. difficile* en una muestra fecal diluida de un paciente infectado con *C. difficile*, en donde un nivel de lactoferrina <7,25 µg/ml, de GDH de *C. difficile* <1000 ng/g y una ausencia de toxina indica el estado de portador, y en donde un nivel de lactoferrina > 7,25 µg/ml, de GDH de *C. difficile* > 1000 ng/g, y de toxina se identifica y de esta manera determina que el paciente tiene actividad en la enfermedad por *C. difficile*.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar un nivel de uno o más de otros antígenos en la muestra fecal, en donde uno o más de los otros antígenos se miden cuantitativamente.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto la muestra fecal con anticuerpos policlonales o monoclonales inmovilizados para la GDH de *C. difficile* para crear una muestra unida a anticuerpos, que comprende además poner en contacto la muestra unida a anticuerpos con anticuerpos policlonales o monoclonales ligados a enzimas de modo que los anticuerpos policlonales o monoclonales ligados a enzimas puedan unirse o capturar a la GDH de *C. difficile* y crear una muestra unida a anticuerpos ligados a enzimas, que comprende además añadir un sustrato a la muestra unida a anticuerpos ligados a enzimas para el desarrollo del color para crear una muestra unida a anticuerpos ligados a enzimas legible.
4. El método de la reivindicación 3, que comprende además determinar una densidad óptica de dicha muestra unida a anticuerpo ligado a enzima legible mediante el uso de una longitud de onda, en donde la densidad óptica corresponde a un nivel de GDH de *C. difficile* en la muestra unida a anticuerpo ligado a enzima legible.
5. Un método para monitorear a un paciente con la enfermedad por *C. difficile* por la cantidad de *C. difficile*, el método comprende: determinar una concentración de lactoferrina, de la glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile* y de la toxina A de *C. difficile* o de la toxina B de *C. difficile* en una primera muestra fecal diluida de un paciente que tiene una infección por *C. difficile* por primera vez, en la que una concentración de lactoferrina <7,25 µg/ml, de GDH de *C. difficile* <1000 ng/g y una ausencia de toxina indica un estado de portador, y una concentración de lactoferrina > 7,25 µg/ml, de GDH de *C. difficile* > 1000 ng/g y la toxina se identifica y de esta manera indica la enfermedad activa por *C. difficile*; determinar la concentración de lactoferrina, de GDH de *C. difficile* y de la toxina A de *C. difficile* o de la toxina B de *C. difficile* en una segunda muestra fecal diluida del paciente por segunda vez más tarde que la primera vez; y monitorizar la actividad de la enfermedad comparando dicha primera concentración de lactoferrina, la concentración de GDH de *C. difficile* y de la toxina A de *C. difficile* o de la toxina B de *C. difficile* a dicha segunda concentración de lactoferrina, de concentración de GDH de *C. difficile* y de la toxina A de *C. difficile* o de la toxina B de *C. difficile* para determinar si el paciente ha tenido un aumento o disminución o ningún cambio en la cantidad de *C. difficile*.
6. El método de la reivindicación 5, que comprende además: poner en contacto dicha primera muestra fecal con anticuerpos policlonales o monoclonales inmovilizados para la GDH de *C. difficile* para crear una primera muestra tratada; poner en contacto dicha primera muestra tratada con anticuerpos policlonales ligados a enzimas para crear una primera muestra unida a anticuerpos ligados a enzimas; añadir un primer sustrato a la primera muestra unida a anticuerpos ligados a enzimas para crear una primera muestra legible; y determinar una densidad óptica de dicha primera muestra legible.
7. El método de la reivindicación 5, que comprende además: poner en contacto dicha segunda muestra fecal con anticuerpos policlonales o monoclonales inmovilizados para la GDH de *C. difficile* para crear una segunda muestra tratada; poner en contacto dicha segunda muestra tratada con anticuerpos policlonales o monoclonales ligados a enzimas para crear una segunda muestra unida a anticuerpos ligados a enzimas; añadir un segundo sustrato a la segunda muestra unida a anticuerpos ligados a enzima para crear una segunda muestra legible; y determinar una densidad óptica de dicha segunda muestra legible.
8. El método de la reivindicación 5, que comprende además generar una curva estándar de GDH de *C. difficile* purificada y determinar una porción lineal de la curva estándar.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende además diluir dichas primera y segunda muestras fecales mediante diluciones en serie de 2 a diez veces hasta que un resultado medido indique una concentración de GDH de *C. difficile* fecal que proporciona una densidad óptica mediante el uso de una longitud de onda que está dentro de la porción lineal de la curva estándar.
10. El método de la reivindicación 5, que comprende además monitorear al paciente para detectar niveles cambiantes de GDH de *C. difficile* fecal como un indicador de la efectividad del tratamiento médico.
11. El método de la reivindicación 5, en donde uno o más formatos de ensayo se utilizan para determinar la cantidad de *C. difficile* en la muestra fecal, en donde uno o más formatos de ensayo incluyen inmunoensayos basados en membrana de flujo lateral y pruebas moleculares de ADN y ARN.

Características del paciente		Porcentaje del total N=39	Porcentaje MOD-A-SEVERO N=15	Porcentaje de MODERADO N=21	Porcentaje de LEVE N=3
GÉNERO	MASCULINO	41	60	29	33
	FEMENINO	59	40	71	67
EDAD	< 65 AÑOS	44	40	48	33
	> 64 AÑOS	56	60	52	67
DOLOR	SÍ	67	60	71	67
	NO	33	40	29	33
COMORBILIDADES	DIABETES	30	13	29	33
	CÁNCER	23	13	29	33
	FALLO RENAL	23	20	29	33
	NEUMONÍA	18	27	10	0
CONSISTENCIA DE LAS DEPOSICIONES	SÓLIDA	3	0	5	0
	SEMI-SÓLIDA	44	33	43	100
	LÍQUIDA	54	67	52	0
EVALUACIÓN CLÍNICA	SEVERA	38	100	0	0
	MODERADA	54	0	100	0
	LEVE	8	0	0	100

Figura 1A

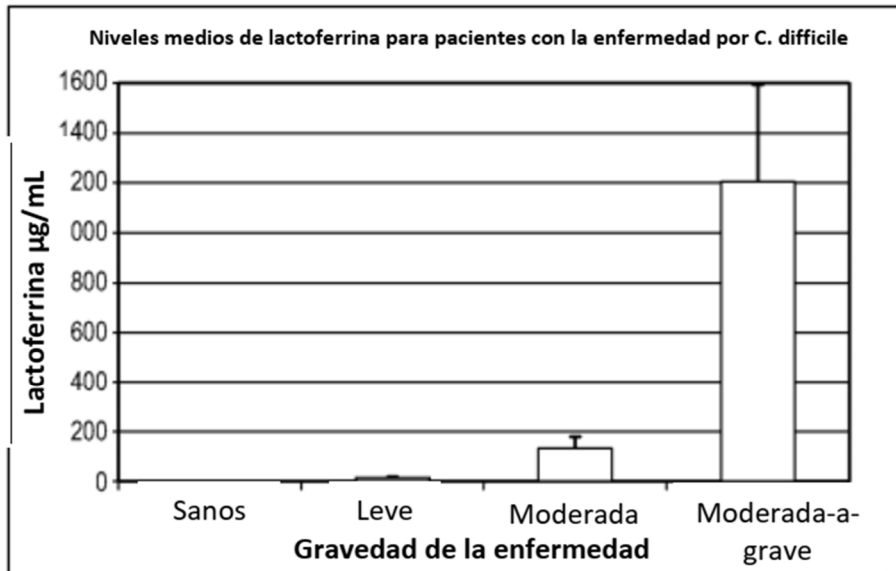
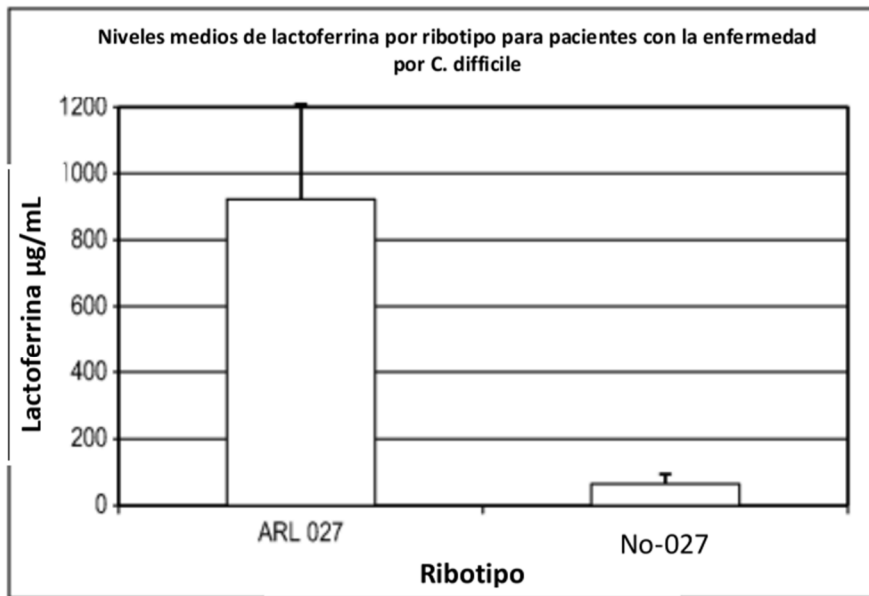
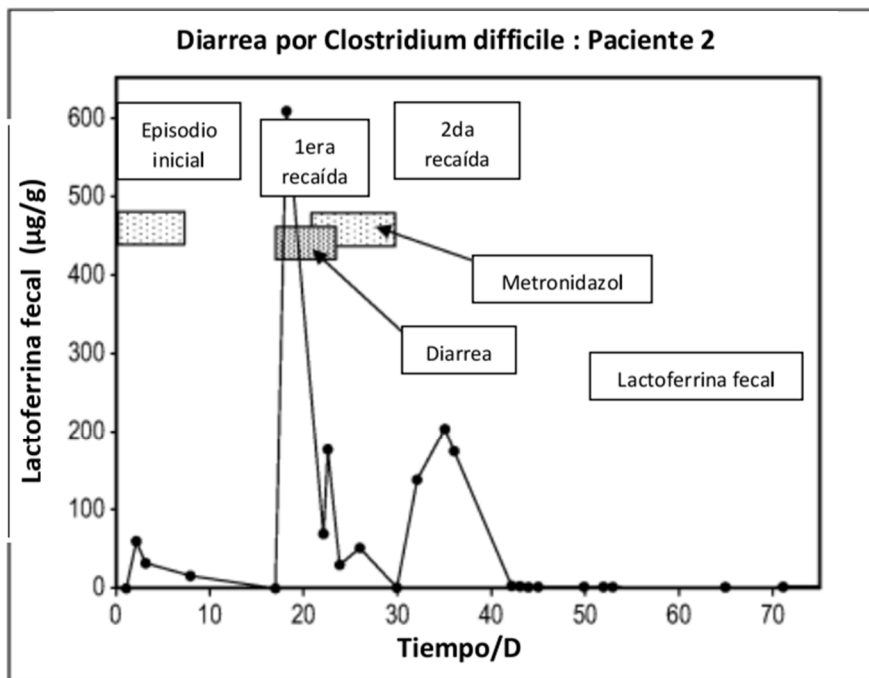


Figura 1B



**Figura 2**



**Figura 3**

N=9 ID	Edad (años)	Sexo (M/F)	T=0				Primer seguimiento				
			LAC (µg/g)	GDH	ABII	Conteo de esporas	PCR Ribotipo	LAC (µg/g)	GDH	ABII	Conteo de esporas
3	76	F	448	4.144	3.986	1.80E+04	ARL 251	0	0	0	N/A
4	78	M	44	4.342	4.126	5.00E+04	ARL 305	22	0	0	N/A
5	65	F	13	4.197	4.054	4.00E+05	ARL 005	18	0	0	N/A
7	53	M	406	4.307	3.938	1.60E+04	ARL 027	0	0	0	N/A
11	24	F	151	4.101	0.556	7.00E+02	ARL 001	1	0	0	N/A
12	55	M	14	4.487	1.787	4.00E+02	ARL 027	12	0	0	N/A
14	79	F	515	4.327	3.889	3.50E+05	ARL 054	4	0	0	N/A
17	77	F	1291	4.304	4.215	8.00E+03	ARL 059	2	0	0	N/A
19	72	F	1826	4.125	4.110	4.50E+05	ARL 027	72	0.098	0	N/A
Mediana	<b>72</b>		<b>406</b>	<b>4.304</b>	<b>3.986</b>	<b>1.80E+04</b>	<b>33% 027</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>N/A</b>

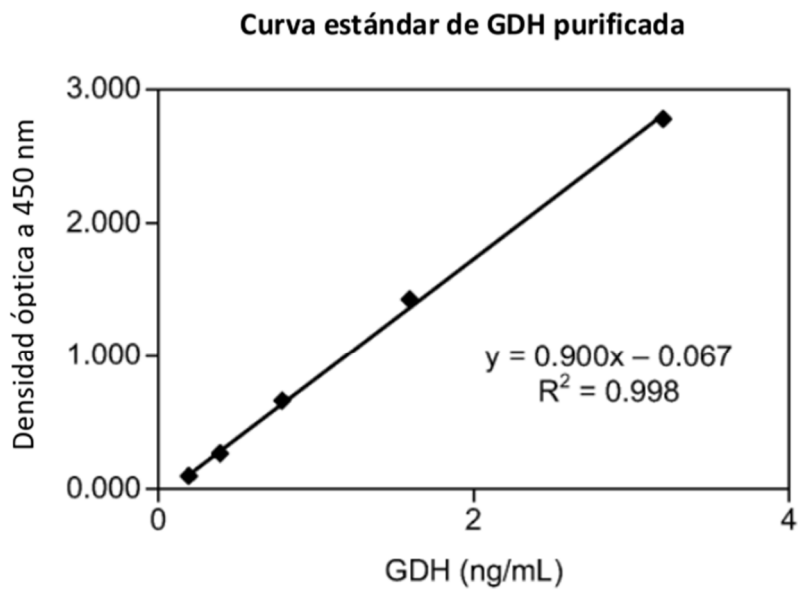
Figura 4A

N=5 ID	Edad (años)	Sexo (M/F)	T=0				Primer seguimiento					
			LAC (µg/g)	GDH	ABII	Conteo de esporas	PCR Ribotipo	LAC (µg/g)	GDH	ABII	Conteo de esporas	PCR Ribotipo
2	80	F	73	4.180	3.130	3.20E+03	ARL 027	17	5.000	0.478	4.00E+03	ARL 027
8	35	F	403	4.225	4.097	1.30E+05	ARL 027	0	0.633	0.943	5.80E+03	ARL 027
10	79	F	10	0.038	0	3.00E+04	ARL 014	2	0	0	1.00E+02	ARL 027
15	82	F	85	4.434	3.696	5.00+03	ARL 126	57	0	0	1.00E+02	ARL 126
16	49	F	164	5	1.512	1.90E+05	ARL 056	0.4	4.151	0	4.20E+04	ARL 379
Mediana	<b>79</b>		<b>85</b>	<b>4.225</b>	<b>3.130</b>	<b>3.00E+04</b>	<b>40% 027</b>	<b>2</b>	<b>0.633</b>	<b>0</b>	<b>4.00E+03</b>	<b>60% 027</b>

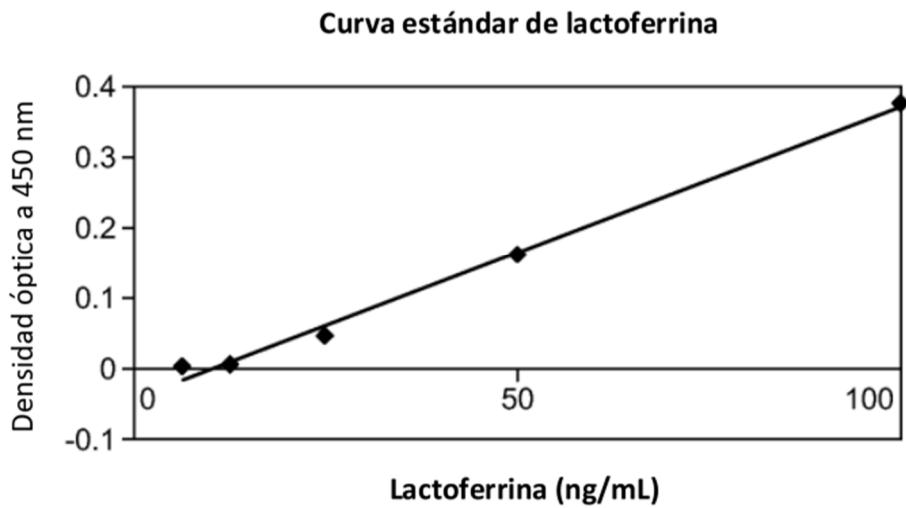
Figura 4B

N=4 ID	Edad (años)	Sexo (M/F)	T=0				Primer seguimiento					
			LAC (µg/g)	GDH	ABII	Conteo de esporas	PCR Ribotipo	LAC (µg/g)	GDH	ABII	Conteo de esporas	PCR Ribotipo
1	59	F	11	4.192	0.884	6.20E+04	ARL 054	433	3.89	1.442	1.00E+05	ARL 103
18	75	M	423	5.000	4.293	1.50E+05	ARL 126	196	3.977	0.798	4.40E+04	ARL 126
9	75	F	301	4.225	4.076	1.50E+05	ARL 005	135	4.153	3.691	2.80E+04	ARL 027
20	86	F	1541	4.503	2.299	1.00E+04	ARL 126	2155	4.157	3.909	2.80E+04	ARL 126
Mediana	<b>75</b>		<b>362</b>	<b>4.364</b>	<b>3.188</b>	<b>1.06E+05</b>	<b>NO 027</b>	<b>315</b>	<b>4.065</b>	<b>2.567</b>	<b>3.60E+04</b>	<b>25% 027</b>

Figura 4C



**Figura 5**



**Figura 6**

Tiempo (Días)	GDH (ng/mL)	Toxina ABII OD	Lactoferrina (µg/mL)
1	1040	3.334	7
2	4100	3.574	11
3	2700	0.003	32
4	60	0.003	42
5	20	0.002	44
6	0	0.003	19
7	0	0.003	1
8	0	0.002	3
9	0	0.002	7
10	0	0.003	2

Figura 7

Tiempo (Días)	GDH (ng/mL)	Toxina ABII OD	Lactoferrina (µg/mL)
1	4050	0.091	33
3	1090	0.026	1
5	4040	0.209	3
7	ND	0.238	3
9	2220	0.377	1
11	4330	0.313	2
13	4220	0.454	4
15	7250	0.114	15

Figura 8

ID	Edad	Sexo	Cultivo toxigénico	Nivel de lactoferrina (µg/g)	Síntomas	Deposiciones /día	Albumina sérica	WBC	GDH ng/g	Toxina en cultivo de tejidos	AB II	Ensayo molecular	Estado del paciente con C. difficile
1	69	F	+	152	Dolor	3	1.8	12.5	3447	+	3.960	Pos	Sospecha de enfermedad
2	59	M	+	132	Dolor	20	1.9	14	3137	+	3.960	Pos	Sospecha de enfermedad
3	56	F	+	6	Dolor	4	2.8	5.2	739	-	0.008	Pos	Sospecha de portador
4	75	M	+	962	Sin dolor	4	2.1	9.1	6851	+	3.117	Pos	Sospecha de enfermedad
5	77	F	+	1391	Dolor	8	3.6	19.4	ND	+	3.725	Pos	Sospecha de enfermedad
6	83	F	+	210	Dolor	4	3.3	8	1571	+	3.844	Pos	Sospecha de enfermedad
7	67	F	+	38	Dolor	20	3.2	20.2	ND	+	0.066	Pos	Sospecha de enfermedad
8	30	F	+	4	Dolor	8	ND	ND	0	-	0.001	Pos	Sospecha de portador
9	83	M	+	308	Dolor	3	1.8	25.8	206	+	0.010	Pos	Sospecha de enfermedad
10	77	M	+	623	Sin dolor	8	3.4	15.8	370	+	4.321	Pos	Sospecha de enfermedad
11	86	M	+	561	Sin dolor	10	2.7	28.6	186	+	3.985	Pos	Sospecha de enfermedad
12	66	M	+	771	Sin dolor	4	ND	16.6	14097	+	4.074	Pos	Sospecha de enfermedad
13	72	F	+	26	Sin dolor	8	ND	8	175	-	0.002	Pos	Sospecha de portador
14	79	M	+	422	Dolor	4	ND	15.6	13282	+	2.028	Pos	Sospecha de enfermedad
15	84	F	+	648	Sin dolor	5	2	18.5	12052	+	4.192	Pos	Sospecha de enfermedad
16	77	F	+	10	Dolor	10	3.2	3.6	125	-	0.007	Pos	Sospecha de portador
17	77	F	+	39	Sin dolor	8	3.4	14.4	7987	+	3.743	Pos	Sospecha de enfermedad
18	88	F	+	376	Sin dolor	6	2.6	21.3	747	+	3.927	Pos	Sospecha de enfermedad
19	83	F	+	6	Dolor	8	ND	8	123	+	0.105	Pos	Sospecha de portador
20	67	F	+	704	Dolor	10	2.7	33.7	1048	+	4.152	Pos	Sospecha de enfermedad
21	68	F	+	57	Dolor	6	2.1	17.9	5733	+	4.055	Pos	Sospecha de enfermedad
22	88	F	+	5	Sin dolor	3	2.4	8	ND	-	0.051	Pos	Sospecha de portador
23	68	F	+	376	Sin dolor	5	ND	14.2	0	-	0.066	Pos	Sospecha de portador
24	76	F	+	94	Sin dolor	5	3.1	4.3	604	+	3.990	Pos	Sospecha de enfermedad

Figura 9