



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 215**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06733160 .3**
96 Fecha de presentación : **13.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1877570**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Análisis de muestras de aliento en cuanto a pentilfurano.**

30 Prioridad: **19.04.2005 NZ 539518**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2011

73 Titular/es: **AGRESEARCH LIMITED**
East Street Ruakura Campus
Hamilton, NZ
The University of Otago y
SYFT TECHNOLOGIES LIMITED

72 Inventor/es: **Scotter, Jennifer M;**
Chambers, Stephen T y
Syhre, Mona

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 358 215 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

Análisis de muestras de aliento en cuanto a pentilfurano.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la determinación de un biomarcador único, pentilfurano, y a su uso para el ensayo en cuanto a la presencia de agentes patógenos fúngicos y bacterianos, incluido *Aspergillus fumigatus*, en un individuo o a partir de un cultivo utilizando el análisis de muestras de aliento.

Antecedentes de la invención

10 Todos los microorganismos producen subproductos como resultado de su metabolismo normal. La capacidad de diferentes organismos de metabolizar diferentes sustratos con el fin de satisfacer sus requisitos energéticos y nutritivos es fundamental para la microbiología de laboratorio, y constituye la base de muchos ensayos de identificación rápida. Los metabolitos producidos por una sola especie pueden variar ampliamente, dependiendo del sustrato de crecimiento, de las condiciones (temperatura, disponibilidad de oxígeno) y de la edad del cultivo propiamente dicho.

15 Entre los muchos metabolitos grandes primarios y secundarios producidos por microbios, se forman algunas sustancias orgánicas que se volatizan fácilmente a bajas temperaturas. Compuestos orgánicos volátiles microbianos (MVOCs - siglas en inglés) han sido estudiados ampliamente en agricultura y en la producción de alimentos, dado que algunos MVOCs tienen importantes implicaciones en la salud y económicas en estos campos. Por ejemplo, algunos MVOCs han estado asociados con el deterioro en cosechas y productos alimenticios almacenados en donde pueden ser responsables de "malos olores" contaminantes, la decoloración de productos o la toxicidad. Crecientemente se están encontrando perfiles de MVOCs que son únicos para el nivel de especie o cepa.

20 La aspergilosis invasiva es una de las infecciones más problemáticas debido a dificultades de diagnóstico y de tratamiento. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs - siglas en inglés) tienen el potencial de mejorar la especificidad y sensibilidad de diagnóstico de esta y otras infecciones. Sería útil identificar un biomarcador único de una especie de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus fumigatus*, en el gas del espacio de cabeza de cultivos *in vitro* y detectar el marcador a partir de muestras de aliento de pacientes infestados o colonizados.

Objeto de la invención

25 Es un objeto de la invención proporcionar un biomarcador para detectar agentes patógenos bacterianos y/o fúngicos tales como *Aspergillus fumigatus* en una biomuestra, o al menos proporcionar a la población una elección útil.

Sumario de la invención

30 La invención proporciona el biomarcador, pentilfurano, para uso en bioanálisis de microorganismos tales como agentes patógenos fúngicos y bacterianos en una muestra gaseosa procedente del aliento de un animal, incluido un ser humano. En particular, la invención proporciona el uso del biomarcador pentilfurano para detectar especies de hongos, más particularmente especies de *Aspergillus*, en una biomuestra gaseosa procedente del aliento de un animal, incluido un ser humano.

35 Más particularmente, la invención proporciona el uso del biomarcador, pentilfurano, para detectar *Aspergillus fumigatus* en una biomuestra gaseosa procedente del aliento de un animal, incluido un ser humano.

La biomuestra puede ser, lo más preferiblemente, una muestra de aliento de un paciente.

En particular, la invención proporciona el uso del biomarcador pentilfurano en el bioanálisis de microorganismos en una biomuestra gaseosa procedente del aliento de un animal, incluido un ser humano.

40 También se pueden detectar otros microorganismos tales como *Aspergillus flavus*, *Haemophilus influenza* y *Pseudomonas aeruginosa*. La biomuestra es una muestra del aliento. Preferiblemente, el biomarcador es 2-pentilfurano. Sin embargo, podría ser 3-pentilfurano.

La invención proporciona un método ex-vivo para detectar *Aspergillus* en un paciente, que comprende:

(a) analizar una biomuestra obtenida del aliento del paciente en cuanto a la presencia de pentilfurano; y

(b) determinar si en la muestra del aliento está presente *Aspergillus*.

45 La invención proporciona también el uso de un biomarcador, pentilfurano, en la detección de *Aspergillus fumigatus* procedente de una muestra del aliento de un animal.

La especie de *Aspergillus* es preferiblemente *Aspergillus fumigatus*.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un escáner TC (tomografía computarizada) del tórax de un paciente con múltiples focos de opacidad de espacio de aire rodeados por material hiperdenso.

Descripción detallada de la invención

5 Se describirá ahora la invención a modo de ejemplo únicamente.

Se utilizó la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) con la microextracción en fase sólida (SPME - siglas en inglés) para identificar pentilfurano en calidad de un biomarcador específico de *A. fumigatus* a partir de cultivos. Se recogieron cuatro litros de muestras del aliento de pacientes con fibrosis quística (FQ), con o sin colonización de *A. fumigatus* y otros agentes patógenos, y voluntarios sanos. Las muestras del aliento se analizaron semi-cuantitativamente mediante SPME/GC-MS en cuanto a la presencia o ausencia de pentilfurano. Se sometió a ensayo a un total de 21 individuos. Pentilfurano se detectó a partir de muestras del aliento de 4/4 pacientes con FQ y colonización por *A. fumigatus*, 3/7 pacientes con FQ y sin evidencia microbiológica de *A. fumigatus* y 0/10 individuos control sanos.

Materiales y métodos

15 **Cepas y condiciones de cultivo**

En estos experimentos se utilizaron aislados clínicos de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Mucor racemosus*, *Fusarium solani* y *Cryptococcus neoformans*.

Los organismos se hicieron crecer en agar sangre en viales de vidrio estéril de 100 ml cerrados con tapones de aluminio estancos al aire que incorporan un septum de caucho revestido con teflon.

20 **Preparación de las cepas**

Las cepas se hicieron crecer durante 72 horas en placas de agar sangre y luego, en el caso de cepas de levaduras, se retiró de la placa un asa de siembra estéril de cultivo y se transfirió a 5 mL de agua estéril. Para cepas de hongos filamentosos, las esporas se recolectaron de la placa con agua estéril que contenía Tween al 0,05%. Quinientos microlitros de esta suspensión se introdujeron en el vial de cultivo sellado mediante inyección a través del septum en el medio.

Los cultivos se mantuvieron a 37°C durante 5 días. Los viales se barrieron con 100 ml de aire seco purificado una vez cada aproximadamente 12 horas.

Detección de pentilfurano mediante GC-MS. Calibración y estandarización

30 Se trazaron curvas de calibración del análisis del gas del espacio de cabeza de diluciones acuosas en serie de pentilfurano. La curva de calibración resultante demostró ser lineal en el intervalo de 1-50 pg.

Demografía de pacientes

Se identificaron cuatro pacientes con fibrosis quística y colonización por *Aspergillus*, 6 pacientes con FQ y sin colonización por *Aspergillus* y 10 individuos control que cumplían los criterios de inclusión para el estudio. En la Tabla 2 se muestran datos demográficos y clínicos relevantes.

35 **Microextracción en fase sólida (SPME) - cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS)**

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva y se creó una base de datos de todos los MVOCs procedentes de especies de *Aspergillus*, que incluían el compuesto aislado, la especie y la cepa, el medio y las condiciones de cultivo y el método de análisis. Los gases del espacio de cabeza de las cepas cultivadas según se describe antes se sometieron a análisis por SPME/GC-MS.

40 **Preparación de la muestra**

La fibra acondicionada por SPME se expuso en viales de cultivo durante 10 minutos y luego se desorbió directamente en el orificio de inyección durante 5 minutos.

Parámetros de GC/MS

45 Las temperaturas del inyector, trampa de iones, colector y tubería de transferencia eran 250, 200, 60 y 250°C, respectivamente. El programa de la estufa comenzó a 50°C durante 2 minutos y se elevó a 250°C a una velocidad de 10°C/min, temperatura a la cual se mantuvo durante 2 minutos adicionales. El flujo de helio se estableció a una

velocidad constante de 1,2 ml/min. La válvula de división se abría a una relación de 1:50 después de 1 minuto. La fragmentación se llevó a cabo en el modo EI como un rastreo completo que dio una certeza adicional. Se podía utilizar una fragmentación MS/MS adicional para aumentar más la sensibilidad.

Calibración y semi-cuantificación

- 5 Cincuenta microlitros de disoluciones diluidas de pentilfurano en metanol se depositaron en viales con espacio de cabeza de 20 mL. La calibración final se constituyó como las cantidades totales en los viales con espacio de cabeza que contenían 1, 5, 10 y 50 pg, respectivamente. La fibra se expuso en los viales con espacio de cabeza durante 5 min utilizando el automuestreador Combi-PAL.

Selección de pacientes.

- 10 Pacientes enrolados en el estudio incluían individuos con fibrosis quística (FQ), colonizados crónicamente con *Aspergillus*, pacientes con FQ no colonizados con *Aspergillus* e individuos control sanos. La aprobación ética para el estudio se obtuvo del Comité de Ética Local, y cada uno de los participantes dio su consentimiento informado para tomar parte en el estudio. Los criterios de inclusión para que los pacientes actuaran como “positivos” (colonizados con *Aspergillus*) fueron un historial de cultivos positivos para *A. fumigatus* procedentes de muestras del tracto respiratorio inferior (esputo, BAL, aspirado traqueal, o frotis de catarro en casos en los que el esputo no estaba disponible para el laboratorio de microbiología. Los pacientes necesitaban tener un mínimo de tres resultados positivos en los últimos 12 meses, e idealmente uno en el espacio de 1 mes de ensayo. Los pacientes fueron excluidos del estudio si estaban siendo actualmente tratados con itraconazol contra ABPA.

- 15 Pacientes en el grupo de fibrosis quística “no colonizados” fueron seleccionados si no tenían un historial actual o pasado de resultados de cultivo positivos para *Aspergillus* según se describe antes y no existía evidencia clínica de colonización por *Aspergillus*. Individuos control sanos fueron reclutados del personal del laboratorio. A estos participantes se les solicitó completar un cuestionario que servía para proporcionar información concerniente a cualquier uso reciente de antibiótico o una evidencia de infección del tracto respiratorio o urinario. Todo participante que no cumpliera estos criterios fue excluido del estudio.

- 20 Toma de muestras del aliento

Muestras del aliento se recogieron en una bolsa de tedlar de 4 L que incorporaba una válvula, boquilla desechable y septum que podía ser perforado para la toma de muestras. Las muestras se recogieron solicitando a los participantes que exhalaran a través de la boca en la bolsa hasta que estuviera llena. La válvula en la bolsa se cerró después y las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio para el ensayo.

- 25 Análisis de muestras del aliento mediante GC-MS

Muestras del aliento se analizaron mediante GC-MS en cuanto a la presencia y cantidad de pentilfurano según se describe para los cultivos anteriores. La fibra de SPME acondicionada se expuso en las bolsas de recogida durante 48 h y luego se desorbió directamente en el orificio de inyección durante 5 minutos.

Resultados

- 30 Detección de pentilfurano de los cultivos de laboratorio

Los resultados para el ensayo de cepas de laboratorio en cuanto a la presencia de pentilfurano se proporcionan en la Tabla I.

Tabla I. Resultados del rastreo de aislados fúngicos y bacterianos mediante GC-MS en cuanto a la presencia de pentilfurano

Organismo	Fuente	pentilfurano
<i>A. flavus</i>	Clínica (frotis del oído)	nd
<i>A. flavus</i>	Clínica (frotis del oído)	nd
45 <i>A. niger</i>	Medioambiental	xx
<i>A. niger</i>	Medioambiental	xx
<i>F. oxysporum</i>	Medioambiental	x

	Organismo	Fuente	pentilfurano
	<i>M. racemosus</i>	Clínica (biopsia del seno)	x
5	<i>C. albicans</i>	Clínica (orina)	x
	<i>C. albicans</i>	Clínica (orina)	x
	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (biopsia de los pulmones)	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (esputo)	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (esputo)	xx
10	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (BAL)	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (esputo)	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (esputo)	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (esputo)	xx
15	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (esputo)	xxx
	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (esputo)	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Clínica (frotis del oído)	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xx
20	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xxx
	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xxx
	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xxx
	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xxx
25	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xx
	<i>A. fumigatus</i>	Medioambiental	xx
	<i>H. influenza</i>	Clínica (esputo)	x
	<i>B. cepacia</i>	Clínica (esputo)	x
	<i>Ps. aeruginosa</i>	Clínica (esputo)	x
30	<i>Ps. aeruginosa</i>	Clínica (esputo)	x
	<i>S. aureus</i>	Clínica (esputo)	nd
	<i>S. aureus</i>	Clínica (esputo)	nd
35	Fuente: Spt; esputo, BAL; lavado broncoalveolar, pentilfurano: nd; no detectado, x; niveles bajos/traza, xx; niveles moderados; xxx; niveles altos		

Análisis de muestras del aliento en cuanto a la presencia de pentilfurano

40 Muestras del aliento de cuatro litros fueron analizadas en cuanto a la presencia y cantidad de pentilfurano. Los resultados se muestran en la Tabla 2 junto con datos clínicos y microbiológicos relevantes

5

Tabla 2 Datos demográficos y microbiológicos de pacientes enrolados en el estudio, y resultados de someter a ensayo el aliento mediante SPME / GC-MS en cuanto a la presencia y cantidad de pentilfurano. “Colonización por *Aspergillus*” se refiere a la colonización con *Aspergillus fumigatus* solamente. Los organismos mostrados en negritas son los que han mostrado producir niveles traza de pentilfurano. Se muestran otros organismos aislados mediante el cultivo de muestras respiratorias. Los organismos en negritas son productores conocidos de pentilfurano.

	ID	Edad	Sexo	Enfermedad subyacente	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>M. catarrhalis</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>A. fumigatus</i>	2-pentilfurano (pg)
CF + <i>Aspergillus</i>	12	20	F	CF				+	+	+	7
	16	20	F	CF	+			+		+	3
	9	5	F	CF				+		+	7
	30		M	CF					+	+	5
CF, sin <i>Aspergillus</i>	10	7	M	CF	+	+		+			10
	11	7	M	CF	+	+		+			nd
	17	19	M	CF	+				+		2
	19	9	M	CF				+			nd
	20	7	M	CF			+	+			nd
	21	7	M	CF		+	+	+			9
	22	8	M	CF			+	+			nd
Controles normales	18	30	F	ninguna							nd
	13	25	F	ninguna							nd
	14	33	M	ninguna							nd
	15	31	M	ninguna							nd
	24	35	M	ninguna							nd
	25	36	M	ninguna							nd
	26	36	M	ninguna							nd
	27	44	M	ninguna							nd
	28	37	M	ninguna							nd
29	57	M	ninguna							nd	

10

Pentilfurano se detectó en el aliento de todos los pacientes (n = 4) colonizados con *A. fumigatus*. Pentilfurano también fue detectado en muestras del aliento de 3 de 7 pacientes sin evidencia de colonización por *Aspergillus*, pero con colonización con otros agentes patógenos, incluidos algunos que demostraban producir pentilfurano en cantidades modestas. De los individuos sanos, uno de diez sujetos demostró un nivel traza de pentilfurano en el aliento.

El mensaje importante a partir de este conjunto de datos es que individuos sanos y normales no parecen producir pentilfurano (o solamente a niveles de línea base), mientras que sí lo hacen los colonizados pulmonarmente con

organismos que producen pentilfurano. Esta es la primera vez que se ha reseñado la detección y cuantificación de un metabolito microbiano específico procedente del aliento de individuos infestados/colonizados. Pentilfurano es un metabolito de *Aspergillus fumigatus* y, posiblemente, de otros agentes patógenos fúngicos y bacterianos. Estos experimentos *in vitro* demostraron que los bajos niveles de pentilfurano son producidos por *A. flavus* así como por *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae*, ambos de los cuales son colonizadores comunes de los pulmones de pacientes con FQ.

Los ensayos de la sangre en cuanto a la infección por *Aspergillus* no son óptimos, debido a que son propensos a un error de muestreo y pueden proporcionar resultados falsos negativos, incluso en casos de una infección diseminada demostrada. Esto se puede agravar adicionalmente mediante la administración de una terapia antifúngica sistémica. El uso de un lavado bronco-alveolar (BAL) para fines diagnósticos ha encontrado un soporte creciente a lo largo de los últimos años, a pesar de que no es un proceso ideal para ser llevado a cabo en un paciente neutropénico y, a menudo, trombocitopénico. Sin embargo, el BAL tiene la ventaja frente al ensayo de la sangre que permite un muestreo directo del lugar de infección primaria. El ensayo del aliento en cuanto a la presencia de metabolitos de agentes patógenos residentes en los pulmones puede considerarse un modo similar al BAL, excepto que sin los riesgos asociados con el BAL. El principio del ensayo del aliento, al igual que el BAL, es un modo más directo de tomar muestras del lugar de la infección primaria. Ensayos basados en la detección de ADN y antígenos detectarán tanto elementos celulares de hongos viables como no viables. La detección de metabolitos de *A. fumigatus* procedentes de muestras del aliento sugeriría que el organismo es metabólicamente activo.

Los resultados de este estudio demuestran que:

1. Pentilfurano puede ser utilizado como un biomarcador de *Aspergillus fumigatus* procedente de cultivos,
2. Pentilfurano puede ser detectado a partir del aliento de pacientes colonizados o infestados con *Aspergillus fumigatus* mediante GC-MS,
3. La detección de pentilfurano procedente del aliento puede formar la base de un test de diagnóstico útil para la infección por *Aspergillus*.

Informe del caso

Una mujer de 79 años de edad que estaba siendo sometida a tratamiento con dexametasona y ciclofosfamida contra mieloma múltiple padecía un episodio de neutropenia febril (neutrófilos $0,5-0,9 \times 10^9/L$) que no pudo resolverse a pesar de una terapia con antibióticos de amplio espectro. Un TC de los senos demostró una enfermedad extensiva sugestiva de *Aspergillus*, y la TC del tórax demostró múltiples focos de una opacidad del espacio de aire con un halo circundante de material hiperdenso, sugestivo de una infección por *Aspergillus* (flechas, Figura 1). *A. fumigatus* se cultivó del esputo en 2 ocasiones. Una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) anidada para el ADN de *A. fumigatus* en la sangre periférica era negativa en 6 ocasiones. El paciente dio su consentimiento informado para participar en el estudio, y se recogieron muestras del aliento de 3 litros según se describe antes para pacientes con FQ. En el aliento exhalado se detectó 2-pentilfurano (10,1 pg) 2 días después de realizado el escáner TC. Después del tratamiento con voriconazol durante 4 semanas, las lesiones en los pulmones se habían reducido de tamaño, el test del aliento se había convertido en negativo y ya no se podía cultivar *Aspergillus* a partir del esputo.

Aplicabilidad industrial

La invención será de uso en el área médica, asistiendo a la detección de microbios y agentes patógenos en pacientes. En particular, la capacidad de detectar especies de *Aspergillus* en especial *Aspergillus fumigatus* será de utilidad para detectar y, por lo tanto, tratar infecciones causadas por el microbio en pacientes.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso del biomarcador pentilfurano en el bioanálisis de microorganismos en una biomuestra gaseosa procedente del aliento de un animal, incluido un ser humano.
- 2.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los microorganismos son agentes patógenos fúngicos.
- 5 3.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde los microorganismos proceden de especies de *Aspergillus* o en donde el microorganismo es una especie de *Aspergillus*.
- 4.- El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el microorganismo es *Aspergillus fumigatus*.
- 5.- El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el pentilfurano es 2-pentilfurano.
- 6.- Un método *ex vivo* para detectar un agente patógeno bacteriano o fúngico, p. ej. *Aspergillus*, en un paciente, comprendiendo el método:
 - 10 (a) analizar una biomuestra obtenida del aliento del paciente en cuanto a la presencia de pentilfurano; y
 - (b) así, determinar si el agente patógeno está presente en la biomuestra del aliento o en el paciente.
- 7.- Un método *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la especie de *Aspergillus* es *Aspergillus fumigatus*.
- 8.- Uso del biomarcador pentilfurano en la detección de un agente patógeno fúngico o bacteriano tal como *Aspergillus fumigatus*, procedente de una muestra del aliento de un animal.
- 15 9.- Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el animal es un ser humano.
- 10.- El uso de pentilfurano para la detección *ex vivo* de la presencia de un microorganismo tal como un agente patógeno bacteriano o fúngico en un animal, incluido un ser humano, en donde el pentilfurano está presente en la biomuestra gaseosa procedente del aliento del animal.

Figura 1

