

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 047**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.1996 E 98103296 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 0894870**

54 Título: **Extracción de ADN de células fúngicas de material clínico**

30 Prioridad:

17.08.1995 DE 19530332

17.08.1995 DE 19530333

17.08.1995 DE 19530336

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

13.03.2013

73 Titular/es:

**MYCONOSTICA LIMITED (100.0%)
SOUTH COURT SHARSTON ROAD
SHARSTON MANCHESTER M22 4SN, GB**

72 Inventor/es:

EINSELE, HERMANN, DR.

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 398 047 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

Extracción de ADN de células fúngicas de material clínico

La presente invención se refiere generalmente a un procedimiento para detectar células fúngicas en un material clínico mediante la obtención de ADN fúngico de la sangre completa que comprende las etapas de:

- 5 a) Aislar las células fúngicas en su mayoría intactas de la sangre completa, y
 b) Obtener ADN de las células fúngicas aisladas mediante
 b1) Descomposición de las células fúngicas aisladas, y
 b2) Aislamiento del ADN fúngico,

donde la etapa a) comprende además las etapas de:

- 10 a1) Descomponer las células sanguíneas existentes en la sangre completa; y
 a2) Aislar las células fúngicas en su mayoría intactas del ADN celular,

y la etapa b1) comprende además la etapa :

b1.1) Lisado alcalino y tratamiento enzimático de las células de hongo, donde la etapa a) comprende además las etapas:

- 15 a1.1) Lisar los glóbulos rojos sanguíneos mediante hemólisis osmótica;
 a1.2) Descomponer enzimáticamente los glóbulos blancos sanguíneos; y
 a2.1) Centrifugar la sangre completa tratada de esta manera y usar el gránulo en las siguientes etapas del procedimiento,

y donde la etapa b1.1) comprende las siguientes etapas:

- 20 - Incubar las células fúngicas existentes en el gránulo de la etapa a2.1) a 90-95° C, preferentemente 95° C durante 5-15 min, preferentemente 10 min, en una solución de NaOH 50 mM, y
 - Neutralizar con Tris-HCl 1 M a pH 7,0,
 - Tratar enzimáticamente con zimolasa durante 50-70 min, preferentemente 60 min a 30-40° C, preferentemente a 37° C,
 25 - Desnaturalizar la proteína mediante incubación con Tris/EDTA a 60-70° C, preferentemente a 65° C durante 10-30 min, preferentemente 20 min.

Un procedimiento de ese tipo se conoce a partir del documento WO 93/23568.

Además, en la práctica se conocen procedimientos para la detección de células fúngicas en el material clínico, basados según la norma de un cultivo de la especie de hongo del material clínico en los medios de cultivo correspondientes.

- 30 La velocidad y sensibilidad de la detección se ven muy afectadas por este cultivo, por ejemplo, en placas Petri y la detección sobre la base de colonias cultivadas o no cultivadas especialmente debido al crecimiento lento de la especie de hongo. Por tal razón, el diagnóstico de la infección invasiva por hongo se realiza a menudo solo mediante la biopsia de un órgano, que trae consigo muchas complicaciones, o incluso solo después de la muerte del paciente.

- 35 El interés en los procedimientos para detectar células fúngicas se enmarca en el antecedente de que especialmente durante los últimos años, las especies de hongo han adquirido una importancia considerable para pacientes inmunodeprimidos como patógenos nosocomiales considerables. Las infecciones invasivas por hongo han aumentado considerablemente sobre todo después de trasplantes de médula (TMO), pero también después de trasplantes de hígado, riñones, páncreas, corazón y corazón-pulmón. Por ejemplo, en 1994 sobre todo en centros franceses de TMO, se produjo un aumento principalmente de las infecciones con *Aspergillus* tal, que estos centros tuvieron que cerrar varios meses.

- 40 Sin embargo, adicionalmente a los pacientes con trasplante de órganos, los pacientes con cáncer se ven cada vez más afectados por infecciones invasivas de hongos, sobre todo después de la quimioterapia o de intervenciones quirúrgicas, los pacientes con quemaduras, así como los pacientes en unidades de cuidados intensivos quirúrgicos y neonatales. Tan pronto

como se afecta un sistema de órganos o incluso varios sistemas de órganos en estos grupos de pacientes, la mortalidad por esta complicación contagiosa asciende entre 80 y 100%.

5 En estos casos, el éxito del tratamiento solo se puede mejorar mediante un diagnóstico temprano. Debido a las desventajas asociadas a los procedimientos de detección estándares mencionados al inicio, se realizan esfuerzos intensivos para permitir asegurar de forma temprana el diagnóstico de una infección sistémica por hongo.

10 Un procedimiento basado en técnicas de biología molecular para la detección y diferenciación de la especie de hongo patógeno en el material clínico se describe en la patente WO 93/23568 mencionada al inicio. En este procedimiento, se aíslan células fúngicas de la sangre del paciente, donde primero se separan las células fúngicas del material de sangre restante. Luego se abre la pared del hongo y se aísla el ADN fúngico. De este, luego se amplifica un segmento del gen de 5S rARN mediante una reacción en cadena de polimerasa y se descompone usando diferentes métodos. Utilizando el ADN aislado se puede distinguir, además, una especie de hongo diferente de otra.

Los problemas fundamentales para la detección de infecciones fúngicas con la ayuda de técnicas de biología molecular se deben a la composición muy compleja de la pared de las células del hongo, que hasta el momento ha requerido procedimientos de extracción caros y que requieren mucho tiempo.

15 Otro problema consiste en que un número creciente de especies de hongo puede provocar amenazas de infecciones en los pacientes inmunodeprimidos, lo que hace necesario que haya que considerar y determinar un gran volumen de géneros y cepas de hongo diferentes en estos pacientes. Debido a que el tratamiento de las infecciones se diferencia según la especie de hongo, es necesario por tanto no solo tener en cuenta todas las especies de hongo, sino también diferenciarlas y poder identificarlas.

20 Ante este antecedente, la presente invención tiene la tarea de perfeccionar el procedimiento mencionado al inicio de manera que sea posible un diagnóstico temprano de una infección por hongo.

El procedimiento se debe realizar de la manera más rápida y simple posible, abarcar tantas especies de hongo como sea posible y también identificarlas de manera continua.

La etapa a) comprende además las etapas de:

- 25 a1) Descomponer las células sanguíneas existentes en la sangre completa; y
a2) aislar las células fúngicas en su mayoría intactas del ADN celular,

en donde la etapa b1) comprende el lisado alcalino de las células de hongo, preferentemente con NaOH, y un tratamiento enzimático de las células de hongo.

30 En cada una de las etapas del nuevo procedimiento hubo que superar muchos problemas resultantes, en parte, debido a la composición de la pared de las células fúngicas y del hecho que gran parte de las células fúngicas en la sangre completa no se encuentran libres en la solución, sino en diferentes poblaciones de células sanguíneas después de la fagocitosis, sobre todo en granulocitos y macrófagos.

35 Si bien el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea ventajosamente en el diagnóstico para poder detectar una infección por hongo en un paciente, también se emplea, sin embargo, en los casos en que se necesita ADN fúngico para otro procesamiento.

Con el nuevo procedimiento, por ejemplo, se puede obtener ADN fúngico de la sangre de animales que fueron infectados especialmente con la especie de hongo de interés. A partir del ADN fúngico obtenido de esa manera se pueden cortar, por ejemplo, sondas de ADN que se pueden usar para reacciones de detección o se pueden montar en plásmido. Se prevé su uso en toda el área de investigación básica, diagnóstico, terapéutica, tecnología genética industrial, etc.

40 El procedimiento de extracción de ADN fúngico permite, especialmente en el diagnóstico, extraer ADN fúngico de manera segura aun cuando haya cantidades muy pequeñas de hongos en la sangre completa. Además, este paso del procedimiento se puede realizar rápidamente y de manera tan sencilla que se puede usar de manera cotidiana en las clínicas y por el personal adiestrado.

45 El nuevo procedimiento consiste, por así decirlo, consta de dos fases, en donde en la primera fase se aíslan las células fúngicas de la sangre completa y en la segunda fase se extrae el ADN de estas células fúngicas aisladas, para posteriormente, con la ayuda de este ADN extraído poder detectar infecciones por hongo y eventualmente especificarlas. Este procedimiento de dos fases aumenta sobre todo la especificidad porque eventualmente otro ADN de interferencia solo puede estar presente en el segundo paso del procedimiento en pequeña cantidad.

Además, se logra una separación muy rápida y segura del ADN fúngico del ADN celular. En esta solución de partida, el ADN celular se libera mediante la descomposición de las células sanguíneas existentes en la sangre completa, con lo cual las células fúngicas no descompuestas o al menos aún no descompuestas completamente por el procedimiento de descomposición anterior se pueden separar usando procedimientos rápidos y fáciles como, por ejemplo, centrifugación del ADN celular libre. En la descomposición que se realiza a continuación de las células fúngicas así aisladas se puede partir con gran seguridad de que en la solución no hay ninguna o solo cantidades insignificantes de ADN celular. La descomposición de las células sanguíneas realizada en la etapa a1) se debe llevar a cabo por consiguiente de manera que las células fúngicas aún no sean lisadas. Debido a que la pared de las células fúngicas es bastante más compleja que la pared de las células sanguíneas, esto se puede asegurar usando los procedimientos de descomposición adecuados oportunamente.

Sin embargo, la etapa del procedimiento a1) tiene todavía otra ventaja, a través de él se liberan de nuevo eventualmente células fúngicas fagocitadas, de manera que, especialmente para el diagnóstico, se pueden extraer incluso cantidades muy pequeñas de hongos presentes en la sangre completa. En el nuevo procedimiento ya no es necesario, que al menos algunas células fúngicas estén presentes en la sangre completa libre en la solución, basta simplemente que después de la fagocitosis existan algunas células de hongo, por ejemplo, en granulocitos o macrófagos.

La tarea que sirve de base a la invención se resuelve completamente de este modo.

La etapa a) abarca las siguientes etapas:

a1.1) Lisis de los glóbulos rojos sanguíneos mediante hemólisis osmótica;

a1.2) Descomponer enzimáticamente los glóbulos blancos sanguíneos; y

a2.1) Centrifugar la sangre completa tratada de esta manera y usar el gránulo en las siguientes etapas del procedimiento.

Resulta ventajoso que en las etapas a1.1) y a1.2), si bien las células sanguíneas se descomponen de manera segura, las propias células fúngicas no resultan dañadas aún. Luego, mediante la centrifugación siguiente es posible, por una parte, una separación muy segura entre el ADN celular liberado entretanto de las células sanguíneas y los fragmentos de las células sanguíneas, así como, por otra parte, las células fúngicas en su mayoría aún intactas. Además, de este modo se garantiza que no se pierda ningún ADN fúngico, ya que este aún está disponible en las células fúngicas que se encuentran en el gránulo. En resumen, las ventajas de las etapas antes mencionados radican en que, por un lado, las concentraciones más pequeñas también son abarcadas por las células fúngicas y, por otro lado, el ADN fúngico aislado está poco o no está contaminado con ADN celular, de manera que se dispone de una elevada sensibilidad y especificidad para las etapas diagnósticas siguientes, debido a que la proporción de ADN fúngico a ADN celular se mejora mucho a favor del ADN fúngico.

La etapa b) comprende las siguientes etapas:

b1.1) Lisado alcalino y tratamiento enzimático de las células de hongo.

De ello resulta, que por estas sencillas etapas del procedimiento es posible la descomposición segura de las células fúngicas extraídas de nuevo del gránulo en la etapa del procedimiento a2.1).

Además se prefiere que en la etapa a1.1) la lisis de los glóbulos rojos sanguíneos ocurra con la ayuda de una solución hipotónica, preferentemente con una concentración final de aprox. 10 mM de Tris pH 7,6, 5 mM de $MgCl_2$, y 10 mM de NaCl, y en la etapa a1.2) la descomposición enzimática de los glóbulos blancos sanguíneos en una solución con una concentración final de 200 $\mu g/ml$ de proteinasa K, 10 mM de Tris pH 7,6, 10 mM de EDTA pH 8,0, 50 mM de NaCl y 0,2% de SDS.

En un perfeccionamiento, la solución de la etapa a1.2) se incuba durante 100-140 min, preferentemente 120 min a 60-70° C, preferentemente a 65° C.

Se descubrió que de este modo las células sanguíneas se pueden descomponer de forma segura y completa y se evita un daño de las células fúngicas, de manera que después de estos pasos del procedimiento no solo las células fúngicas que se encuentran libremente en solución en la sangre de partida, sino también las células fúngicas fagocitadas existan relativamente intactas y se puedan centrifugar sin perder su ADN.

La etapa b1.1) comprende las siguientes etapas:

- Incubar las células fúngicas existentes en el gránulo de la etapa a2.1) a 90-98° C, preferentemente a 95° C durante 5-15 min, preferentemente 10 min, en una solución de NaOH 50 mM,

- Neutralizar con Tris-HCl 1 M, pH 7,0,
- Tratar enzimáticamente con zimolasa durante 50-70 min, preferentemente 60 min a 30-40° C, preferentemente a 37° C,
- Desnaturalizar la proteína mediante incubación con Tris/EDTA a 60-70° C, preferentemente a 65° C, durante 10-30 min, preferentemente 20 min.

5 Se descubrió que con estas etapas del procedimiento es posible una descomposición segura de las células fúngicas con la posterior liberación completa exitosa del ADN fúngico, de manera que el ADN fúngico se encuentre libremente en la solución y se pueda aislar de los fragmentos de células fúngicas.

Para ello se prefiere que la etapa b2) comprenda las siguientes etapas de:

- Precipitar la proteína con 5 M de acetato de potasio, y
- 10 - Precipitar el ADN del sobrenadante en isopropanol helado.

Estas etapas del procedimiento se deben realizar de manera muy simple, primero se precipita la proteína mediante la adición de acetato de potasio, luego se extrae el sobrenadante y se mezcla con isopropanol helado, de manera que precipite el ADN. Luego este ADN precipitado se puede cultivar para las otras etapas del procedimiento, o sea, para detectar e identificar una infección por hongo.

15 En el procedimiento descrito se resume como una ventaja que la especie de hongo se puede determinar generalmente por medio de su ADN y después se puede identificar específicamente. De esta forma, el ADN fúngico no se extrae directamente de la sangre completa, sino que primero tiene lugar una separación de las células fúngicas del ADN celular para aumentar la sensibilidad y especificidad de la detección. En otras palabras, si en la sangre completa solo están disponibles unas pocas células fúngicas, la cantidad muy pequeña de ADN fúngico extraída de ellas no podría detectarse en el fondo de ADN

20 celular existente en una concentración muy alta, de manera que la separación antes mencionada trae grandes ventajas con respecto a la sensibilidad.

Otra ventaja del nuevo procedimiento radica en que para la detección también están disponibles las células fúngicas fagocitadas, debido a que primero se descomponen las células sanguíneas de la sangre completa, sin que con esto se dañen las células fúngicas, independientemente de que se encuentren libres en la solución o en estado fagocitado. Las

25 células fúngicas se descomponen solo después de la separación de las células fúngicas del ADN celular y de los restos de las células sanguíneas. El procedimiento usado aquí permite realizar una descomposición completa a pesar de la alta complejidad de las paredes de las células fúngicas, sin que con ello se destruya el ADN fúngico.

Igualmente se describe un estuche para realizar el procedimiento descrito anteriormente. Un estuche de este tipo puede contener una composición de todas las soluciones habituales necesarias para los pasos mencionados del procedimiento por separado. Sin embargo también se puede prever que este estuche solo contenga las soluciones no disponibles

30 habitualmente en un laboratorio, de manera que, por ejemplo, se puede renunciar al tampón Tris, etc., pero al menos en el estuche están disponibles la proteinasa K y zimolasa.

En los ejemplos del 6 al 9 se describe primero la forma de detectar si en el precipitado hay disponible generalmente ADN fúngico, después de lo cual se clasifica el precipitado según la especie de hongo particular. Para ello se aprovecha, que las

35 secuencias de ADN que aparecen en el protocolo de secuencias como sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2 se unen específicamente en los Sitios de unión del gen fúngico para 18 ssu-rARN de muchas cepas y especies fúngicas y aparecen como iniciador en una reacción en cadena de polimerasa de productos de amplificación con una longitud de aprox. 500 pares de bases. Estos productos de amplificación se pueden clasificar en el marco de una hibridación secuencial de determinadas especies de hongo, donde las secuencias de nucleótidos indicadas en el protocolo de secuencias como sec.

40 con núm. de ident.: 3 a sec. con núm. de ident.: 8, que son sondas específicas de la especie, se usan como sondas de hibridación.

Naturalmente, el ADN fúngico, por ejemplo, se puede detectar además por otros métodos de biología molecular, y clasificar la especie de hongo particular, sin embargo la PCR con el iniciador específico así como la posterior hibridación secuencial representan procedimientos de funcionamiento muy seguro, y fáciles de ejecutar.

45 Otras ventajas resultan de la descripción que aparece a continuación.

A continuación se describen ejemplos de realización de las etapas particulares del procedimiento, así como el uso del procedimiento en el marco de un programa de análisis clínico.

Una ventaja especial del nuevo procedimiento radica en que se realiza con sangre completa y que, por ejemplo, no se requiere ninguna biopsia ni se usa suero que haya que fabricar. Con la sangre completa se efectúa primero una separación

50 de las células fúngicas del ADN celular. Esto es necesario para que el ADN fúngico que eventualmente solo existe en

5 pequeña cantidad no tenga que detectarse en el fondo de ADN celular disponible en una concentración muy superior. Con ello se aumenta la especificidad del procedimiento de detección. Con este objetivo primero se someten a lisis los glóbulos rojos sanguíneos mediante hemólisis osmótica y luego los glóbulos blancos sanguíneos de manera enzimática. Ambos pasos del procedimiento se seleccionan de forma tal que las propias células fúngicas no se afectan con ello y que, eventualmente, las células fúngicas fagocitadas se liberan de nuevo intactas, de manera que también estén disponibles para otra detección.

Ejemplo 1: Lisis de glóbulos rojos sanguíneos mediante hemólisis osmótica.

La lisis de los glóbulos rojos sanguíneos ocurre con la ayuda de una solución hipotónica. Para ello se usa el siguiente tampón con las siguientes concentraciones finales:

Tris pH 7,6	10 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM

10 La solución se incuba durante 10 min a temperatura ambiente, y luego se centrifuga.

Para este primer paso es suficiente una cantidad de 3 ml de sangre completa.

Ejemplo 2: Descomposición enzimática de los glóbulos blancos sanguíneos

15 Los glóbulos blancos sanguíneos, que eventualmente contienen células fúngicas, se descomponen con cuidado mientras las células con proteinasa K (200 µg/ml) de la firma Boehringer, de Mannheim, subsisten enzimáticamente en el tampón posteriormente con las concentraciones finales indicadas, en el cual se incluye el gránulo del Ejemplo 1:

Tris pH 7,6	10 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
NaCl	50 mM
SDS	0,2%
Proteinasa K	200 µg/ml

Este tampón se incuba durante dos horas a 65° C.

Ejemplo 3: Separación de células fúngicas en su mayoría intactas del ADN celular

20 Después que las células sanguíneas se descomponen como se describió en los ejemplos 1 y 2, de manera que se libere el ADN celular, tiene lugar un paso de centrifugación a 5000 revoluciones/minuto, que conlleva a una pérdida considerable del ADN celular que precipita a esta velocidad de centrifugación.

25 En el gránulo se encuentran ahora las células fúngicas completamente libres o liberadas que se incluyen en un tampón (Aqua bidest) para el procesamiento ulterior.

Ejemplo 4: Descomposición de las células fúngicas

A continuación, las células fúngicas se someten a lisis alcalina y se tratan enzimáticamente para liberar el ADN fúngico.

Para ello, primero tiene lugar una lisis alcalina con 200 ml de NaOH 50 mM durante 10 min a 95° C.

30 Después se produce un paso de neutralización con Tris-HCl 1 M pH 7,0.

A continuación se adicionan 500 µl de zimolasa Sigma (300 µg/ml) y se incuba la solución durante 60 min a 37° C para descomponer las células fúngicas enzimáticamente.

Posteriormente se adicionan 500 µl de Tris/EDTA y 50 µl de solución de SDS al 10% y se incuba la mezcla a 65° C durante 20 min, para desnaturalizar la proteína.

Ejemplo 5: Aislamiento del ADN fúngico

5 En la solución existente se encuentran restos de las células fúngicas, así como ADN fúngico libre, que tienen que aislarse. Para ello primero tiene lugar una precipitación de la proteína con 5 M de acetato de potasio, con lo que se elimina el sobrenadante y después se precipita el ADN mediante la adición de isopropanol helado. Posteriormente este producto precipitado se usa para las otras etapas del procedimiento.

A través de las etapas del procedimiento presentadas en los ejemplos 1 - 5 es posible extraer de manera muy selectiva ADN fúngico de la sangre completa, que existe en forma de precipitado y está muy poco contaminada con ADN celular, con lo cual se puede realizar de manera muy sensible y específica la detección que tiene lugar a continuación.

10 **Ejemplo 6: Amplificación de un segmento de ADN específico del hongo**

En esta etapa del procedimiento se debe detectar primero si en el precipitado de la etapa del procedimiento del ejemplo 5 existe realmente ADN fúngico. Para ello se aprovecha que las secuencias de ADN identificadas en el protocolo de secuencias como sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2 se unen específicamente en los sitios de unión del gen fúngico para el 18ssu-rARN de muchas cepas y especies de hongo.

15 El inventor de la presente solicitud reconoce, que este gen fúngico en las diferentes cepas y especies de hongo muestra un segmento de secuencia de un tipo, que por una parte está flanqueado por dos regiones de enlace para el iniciador que son idénticas para todas las cepas y especies de hongo, y que por otra parte, sin embargo, la secuencia de este segmento es tan diferente para las distintas especies y géneros de hongo, que se puede usar al mismo tiempo para la detección de la especie y el género del hongo particular.

20 La secuencia de ADN de sec. con núm. de ident.: 1 se une a la cadena sentido, mientras que la secuencia de ADN de sec. con núm. de ident.: 2 se une a la cadena antisentido, donde la distancia entre ambos Sitios de unión es aprox. 500 pares de bases. Estas dos secuencias de ADN de sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2 son apropiadas como iniciadores para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR *por sus siglas en inglés*), en la que se obtienen productos de amplificación (Amplicón) con una longitud de aprox. 500 pares de bases.

25 En la siguiente Tabla 1 se presenta la ubicación del iniciador y la longitud de los respectivos amplicones.

Tabla 1: Amplicones obtenidos de patógenos de hongo

Especie de hongo	Sitios de unión del iniciador directo-iniciador inverso		Longitud del amplicón
C. albicans	bp544-563	bp1033-1014	bp490
C. glabrata	bp546-565	bp1047-1028	bp502
C. krusei	bp535-554	bp1016-997	bp482
C. tropicalis	bp544-563	bp1030-1011	bp487
C. parapsilosis	bp544-563	bp1033-1014	bp490
A. fumigatus	bp544-563	bp1046-1027	bp503
A. niger	bp483-502	bp986 - 967	bp503
A. flavus	bp483-502	bp985 - 966	bp502
A. terreus	bp481-500	bp984 - 965	bp503
A. nidulans	bp481-500	bp984 - 965	bp503

Con estas dos sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2 del iniciador se pueden producir amplicones de aprox. 500 pares de bases en una cantidad suficiente para todas las especies de hongo relevantes de los géneros *Candida* y *Aspergillus* mediante el procedimiento de PCR.

Para ello las condiciones de la PCR son las siguientes:

Tampón (50 µ l):	
10 mM de Tris pH 9,6	
50 mM de NaCl	
10 mM MgCl ₂	
0,2 mg/ml de BSA	
Polimerasa	
por cada 0,5 mM de nucleótido	
por cada 100 pM iniciador	
Desnaturalización inicial:	3 min a 94° C
Ciclo de desnaturalización:	0,5 min a 94° C
Hibridación:	1 min a 62° C
Extensión:	2 min a 72° C
	Extensión del terminal:
	5 min a 72° C
Número de ciclos:	34

5

La elevada concentración de magnesio en el tampón es responsable de una alta especificidad de la polimerasa que puede trabajar a su temperatura óptima con 72° C en la etapa de extensión.

10 Con estos iniciadores se podrían amplificar exitosamente un total de 40 cepas de *Candida albicans*, 10 cepas de *Candida tropicalis*, 6 cepas de *Candida parapsilosis*, 11 cepas de *Candida glabrata*, 8 cepas de *Candida krusei*, 8 cepas de *Aspergillus fumigatus*, 6 cepas de *Aspergillus flavus*, 5 cepas de *Aspergillus terreus*, 7 cepas de *Aspergillus niger*, 5 cepas de *Aspergillus nidulans* y 3 cepas de *Aspergillus versicolor*.

Ejemplo 7: Detección de los productos de amplificación del Ejemplo 6

15 En el próximo paso se debe detectar si en la reacción por PCR del ejemplo 6 también se fortalecieron realmente los segmentos de ADN con una longitud de aprox. 500 pares de bases. Esta detección de los segmentos de ADN específicos del hongo ocurre mediante tinción con bromuro de etidio de la banda específica en un gel de agarosa al 2%.

Para el reconocimiento de la banda específica, se puede partir de una infección por hongo, debido a que las sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2 del iniciador se unen a todas las cepas de hongo mencionadas anteriormente. Si el ADN fúngico se extrae de las etapas del procedimiento de los ejemplos 1 - 5, entonces la etapa de amplificación PCR del ejemplo 6 se puede detectar mediante la tinción con bromuro de etidio.

Ejemplo 8: Asignación de los productos de amplificación del ejemplo 6 a la especie de hongo particular

Para una terapia específica es necesario aún especificar con mayor exactitud la infección por hongo ya detectada en la etapa 7. Aquí se muestra ahora otra ventaja de la etapa de PCR del ejemplo 6. De hecho, se produjo un segmento de ADN fúngico tan específico que ahora son posibles otros procedimientos de detección para determinar la especie de hongo.

25 Para ello se cultivan las secuencias de nucleótido identificadas en el protocolo de secuencias como sec. con núm. de ident.: 3 a sec. con núm. de ident.: 8 que sirven como sondas específicas de la especie, que hibridan específicamente una sección de secuencia de los segmentos de ADN producidos en el ejemplo de 6.

5 Se descubrió, que la sonda de sec. con núm. de ident.: 3 hibrida con *Candida albicans*, la sec. con núm. de ident.: 4 con *Candida glabrata*, la sec. con núm. de ident.: 5 con *Candida krusei*, la sec. con núm. de ident.: 6 con *Candida tropicalis*, la sec. con núm. de ident.: 7 con *Candida parapsilosis* y la sec. con núm. de ident.: 8 con *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. terreus*. La secuencia de nucleótido de sec. con núm. de ident.: 8 es una sonda general *Aspergillus*, mientras que las secuencias de nucleótido de las sec. con núm. de ident.: 3 - sec. con núm. de ident.: 5 pueden diferenciar entre sí especies de hongo del género *Candida*.

Para poder detectar la hibridación ocurrida, las sondas se marcan con Digoxigenina con el estuche de transferasa de la firma Boehringer, de Mannheim, donde la detección se realiza según los procedimientos de hibridación Southern con la reacción de colores usual.

10 Con la ayuda de estas sondas se produce una hibridación secuencial, que se escalona según la frecuencia de la especie de hongo particular, de manera que primero se hibrida con la sec. con núm. de ident.: 3 (*C. albicans*), luego con la sec. con núm. de ident.: 8 (*Aspergillus*), la sec. con núm. de ident.: 6 (*C. tropicalis*), la sec. con núm. de ident.: 7 (*C. parapsilosis*), la sec. con núm. de ident.: 4 (*C. glabrata*) y, finalmente, con la sec. con núm. de ident.: 5 (*C. krusei*).

15 De este modo, a partir del producto de amplificación producido en la etapa del ejemplo 6, es posible identificar la especie de hongo mediante hibridación secuencial e iniciar a continuación una terapia dirigida.

Ejemplo 9: Detección de células fúngicas en la sangre

20 Con la ayuda de la amplificación específica y la hibridación secuencial se logra detectar de manera reproducible la especie de hongo con una sensibilidad de 1 - 3 células fúngicas. Mediante el cultivo de la especie de hongo en muestras de sangre se podría demostrar que el procedimiento antes mencionado alcanza una sensibilidad de una CFU (unidad de formación de colonias)/ml de sangre. Este límite de detección está muy por debajo de lo que se puede esperar de un cultivo de hongos en la sangre relevante desde el punto de vista clínico.

Ejemplo 10: Programa de análisis clínico

En un gran programa de análisis clínico se pudo detectar una elevada especificidad del nuevo procedimiento en el análisis de 165 muestras de sangre de 65 sujetos sanos. Las 165 muestras de sangre son negativas.

25 Después, 94 pacientes inmunodeprimidos con fiebre confusa se analizaron en presencia de una infección por hongo. De 69 pacientes que no tenían ninguna infección invasiva por hongo, más de 200 muestras de sangre (hasta una excepción) fueron igualmente negativas.

Por el contrario, los 25 pacientes con infección invasiva por hongo se pudieron identificar como positivos durante la primera semana. Además todos los pacientes se asignaron al agente patógeno de hongo causante.

LISTADO DE SECUENCIAS

DATOS GENERALES:

SOLICITANTE:

NOMBRE: Universidad Karl Eberhard de Tubinga, Clínica Universitaria

CALLE: Geissweg 3

5 LUGAR: Tubinga

PAÍS: Alemania

CÓDIGO POSTAL: 72076

TELÉFONO: 07071-29-1 TELEFAX: 07071-293966

DENOMINACIÓN DE LA INVENCION: Extracción de ADN de células fúngicas

10 NÚMERO DE SECUENCIAS: 8

VERSIÓN LEGIBLE POR COMPUTADORA:

SOPORTE DE DATOS: (sigue)

COMPUTADORA:

SISTEMA OPERATIVO:

15 SOFTWARE:

DATOS DE LA ACTUAL SOLICITUD:

EXPEDIENTE DE ABOGADO: 5402P155EP

DATOS DE LA SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1:

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20 LONGITUD: 20 pares de bases

TIPO: Ácido nucleico

FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria

TOPOLOGÍA: lineal

HIPOTÉTICAMENTE: SÍ

25 DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1:

ATTGGAGGGC AAGTCTGGTG 20

DATOS DE LA SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2:

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 20 pares de bases

30 TIPO: Ácido nucleico

FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria

TOPOLOGÍA: lineal

HIPOTÉTICAMENTE: SÍ

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2:

CCGATCCCTA GTCGGCATAG 20
DATOS DE LA SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3:
CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
LONGITUD: 30 pares de bases
5 TIPO: Ácido nucleico
FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria
TOPOLOGÍA: lineal
HIPOTÉTICAMENTE: SÍ
DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3:
10 TCTGGGTAGC CATTATGGC GAACCAGGAC 30
DATOS DE LA SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4:
CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
LONGITUD: 30 pares de bases
TIPO: Ácido nucleico
15 FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria
TOPOLOGÍA: lineal
HIPOTÉTICAMENTE: SÍ
DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4:
TTCTGGCTAA CCCCAAGTCC TTGTGGCTTG 30
20 DATOS DE LA SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5:
CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
LONGITUD: 30 pares de bases
TIPO: Ácido nucleico
FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria
25 TOPOLOGÍA: lineal
HIPOTÉTICAMENTE: SÍ
DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5:
GTCTTTCCTT CTGGCTAGCC TCGGGCGAAC 30
30 DATOS DE LA SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6:
CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
LONGITUD: 30 pares de bases
TIPO: Ácido nucleico
FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria
TOPOLOGÍA: lineal
35 HIPOTÉTICAMENTE: SÍ

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6:

GTTGGCCGGT CCATCTTTCT GATGCGTACT 30

DATOS DE LA SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7:

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

LONGITUD: 30 pares de bases

TIPO: Ácido nucleico

FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria

TOPOLOGÍA: lineal

HIPOTÉTICAMENTE: SÍ

10

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7:

TTTCCTTCTG GCTAGCCTTT TTGGCGAACC 30

DATOS DE LA SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8:

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 30 pares de bases

15

TIPO: Ácido nucleico

FORMA DE LA CADENA: Monocatenaria

TOPOLOGÍA: lineal

HIPOTÉTICAMENTE: SÍ

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8:

20

CATGGCCTTC ACTGGCTGTG GGGGGAACCA 30

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de células fúngicas en el material clínico mediante la obtención de ADN fúngico de la sangre completa que comprende las etapas de:
 - a) Aislar las células fúngicas en su mayoría intactas de la sangre completa, y
 - 5 b) Obtener ADN de las células fúngicas aisladas mediante
 - b1) Descomposición de las células fúngicas aisladas, y
 - b2) Aislamiento del ADN fúngico,
 donde la etapa a) comprende además las etapas de:
 - a1) Descomponer las células sanguíneas existentes en la sangre completa; y
 - 10 a2) Aislar las células fúngicas en su mayoría intactas del ADN celular,

caracterizado porque la etapa b1) comprende además la etapa de:

 - b1.1) Lisis alcalina y tratamiento enzimático de las células de hongo, donde la etapa a) comprende además las etapas:
 - a1.1) Lisis de los glóbulos rojos sanguíneos mediante hemólisis osmótica;
 - 15 a1.2) Descomponer enzimáticamente los glóbulos blancos sanguíneos; y
 - a2.1) Centrifugar la sangre completa tratada de esta manera y usar el gránulo en las siguientes etapas del procedimiento,
 y donde la etapa b1.1) comprende las siguientes etapas:
 - 20 - Incubar las células fúngicas existentes en el gránulo de la etapa a2.1) a 90-95° C, preferentemente a 95° C durante 5-15 min, preferentemente 10 min, en una solución de NaOH 50 mM, y
 - Neutralizar con Tris-HCl 1 M pH 7,0,
 - Tratar enzimáticamente con zimolasa durante 50-70 min, preferentemente 60 min a 30-40° C, preferentemente 37° C,
 - 25 - Desnaturalizar la proteína mediante incubación con Tris/EDTA a 60-70° C, preferentemente a 65° C durante 10-30 min, preferentemente 20 min.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa a1.1) la lisis de los glóbulos rojos sanguíneos tiene lugar con la ayuda de una solución hipotónica y detergente, preferentemente con una concentración final de 10 mM de Tris pH 7,6, 5 mM de MgCl₂ y 10 mM de NaCl.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** en la etapa a1.2) la descomposición enzimática de los glóbulos blancos sanguíneos se produce en una solución con una concentración final de 200 µg/ml de Proteinasa K, 10 mM de Tris pH 7,6, 10 mM de EDTA pH 8,0, 50 mM de NaCl y 0,2% de SDS.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** la solución se incuba durante 100-140 min, preferentemente 120 min a 60-70° C, preferentemente a 65° C.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la etapa b2) comprende las siguientes etapas:
 - Precipitar la proteína con 5 M de acetato de potasio, y
 - 35 - Precipitar el ADN del sobrenadante en isopropanol helado.