

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 862**

21 Número de solicitud: 201131497

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.09.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.04.2013

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO (100.0%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa (Bizkaia) ES

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ MOLINA, Jimena Victoria;
REMENTERIA RUIZ, Aitor Domingo y
GARAZAR CANDINA, Javier

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE ASPERGILLUS SP.**

57 Resumen:

Métodos y reactivos para la detección de *Aspergillus* sp.

El método se basa en el empleo de sondas específicas para las secciones *Fumigati*, *Nigri* y *Flavi* del género *Aspergillus*, secciones de gran interés debido a que incluyen algunos de los patógenos más importantes del género. El método puede utilizarse para detectar secciones concretas de *Aspergillus* sp. en muestras ambientales, clínicas y alimentarias.

ES 2 399 862 A1

DESCRIPCIÓN**MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE *ASPERGILLUS* SP.****CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

5 La invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de secciones del género *Aspergillus* mediante el empleo de sondas diseñadas para tal fin. Dicho método resulta de utilidad en la detección de hongos *Aspergillus* sp. en muestras ambientales, clínicas y alimentarias. Asimismo, la invención también se relaciona con un kit para la puesta en práctica de dicho método.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La mejoría en el manejo y tratamiento de pacientes quirúrgicos y médicos ha estado acompañada por un incremento en el número de infecciones que amenazan la salud del
15 paciente debido a hongos oportunistas y patógenos. Los tratamientos contra el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la quimioterapia y las altas dosis de corticosteroides han contribuido al incremento del número de pacientes inmunodeprimidos. Muchos individuos inmunodeprimidos desarrollan infecciones oportunistas de hongos filamentosos saprofiticos, tales como las especies del género
20 *Aspergillus* que se encuentran en el ambiente y que originalmente eran considerados de baja virulencia. Estas infecciones son con frecuencia fulminantes y fatales para individuos inmunodeprimidos.

El género *Aspergillus* se clasifica dentro de la División *Ascomycota*, Clase
25 *Eurotiomycetes*, Orden *Eurotiales*, Familia *Trichocomaceae*. Fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli, quien usó el nombre de “*Aspergillum*” por parecerse el conidióforo de estos hongos al instrumento usado para dispersar agua bendita. *Aspergillus* es un género constituido por hongos filamentosos mitospóricos que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas
30 conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus* sp., aunque es una estructura unicelular, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula, estipe y célula pie. Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente

fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas.

5 El género *Aspergillus* se dividió inicialmente en subgéneros y grupos, pero el sistema de clasificación actual sustituye la denominación de "grupo" por "sección " para ajustarse a las reglas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica. Actualmente el género *Aspergillus* se divide en 8 subgéneros, que se subdividen a su vez en 18 secciones, aunque en los últimos años esta clasificación está siendo sometida a constantes revisiones debido a los análisis filogenéticos basados en características moleculares.

10

La gran importancia de este género de hongos radica no sólo en que es uno de los principales productores de micotoxinas, sino también en su capacidad de originar enfermedades infecciosas en animales y humanos y en la dificultad que existe hoy en día en su detección y discriminación temprana en un proceso infectivo.

15

El desarrollo de nuevos y específicos fármacos ha mejorado el control de las infecciones producidas por *Aspergillus* sp. Sin embargo, el diagnóstico continúa siendo difícil, debido a que los sistemas convencionales de detección y caracterización de especie por medio del cultivo del microorganismo y la observación tanto de su morfología
20 macroscópica como microscópica son métodos muy lentos, que requieren de gran experiencia por parte del microbiólogo que lo lleva a cabo y además, no siempre son eficaces debido a la variabilidad fenotípica que puede mostrar una misma cepa en diversas condiciones.

25 El diagnóstico de infecciones fúngicas se realiza normalmente mediante el aislamiento del organismo infeccioso, por ensayos serológicos, o a través del examen histopatológico del tejido. El aislamiento de especies de *Aspergillus* en cultivo puede requerir varios días para adecuar el tratamiento y que ocurra la esporulación, retrasando el tratamiento adecuado, pues un cultivo positivo puede representar una colonización
30 benigna en lugar de una invasión o infección.

Sin embargo, gracias a las técnicas moleculares se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico. En los últimos años muchos autores han desarrollado métodos de detección

e identificación de *Aspergillus* sp. basados en la reacción en cadena de la polimerasa utilizando como diana diferentes regiones de los genes del ARN ribosómico (ADNr) 18S, 28S y 5,8S. Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos y también dominios variables, y regiones espaciadoras internas (ITS) entre ellos, altamente variables. Todas estas regiones tienen la ventaja de que se encuentran repetidas un alto número de veces en el genoma, y por lo tanto, su detección mediante PCR presenta una mayor sensibilidad.

Zhao *et al.* (2001) [Journal of Clinical Microbiology. 39(6): 2261-2266] han desarrollado sistemas de amplificación de las regiones ITS, por PCR anidada, llegando a diferenciar mediante electroforesis en gel de agarosa a *A. fumigatus* de otras especies del género, pero no de especies relacionadas de la sección *Fumigati*. La amplificación de las regiones ITS, principalmente las regiones ITS I e ITS II, seguida de secuenciación y análisis comparativo de la secuencia obtenida, es actualmente un método recomendado para la identificación de especies de *Aspergillus* a nivel de sección o complejo de especies (Balajee *et al.* 2007. Studies in Mycology. 59: 39-46). Sin embargo, la identificación entre especies dentro de una misma sección es complicada, ya que las diferencias morfológicas y moleculares son pequeñas. Aún así, la identificación de *Aspergillus* a nivel de especie puede realizarse mediante la amplificación por PCR de dianas más específicas, como el gen de la β -tubulina, seguido de un análisis comparativo de la secuencia amplificada (Balajee *et al.* y col, 2007, citado *supra*).

La patente estadounidense US6372430 describe ácidos nucleicos para la detección de cinco especies diferentes de *Aspergillus* y otros hongos filamentosos, basados en la región ITS II.

Los sistemas utilizados actualmente para la detección e identificación de *Aspergillus* sp. como agente causal de un proceso infeccioso o contaminación son normalmente poco efectivos, tediosos o conllevan un elevado coste. Por ello, existe la necesidad de desarrollar un sistema rápido, sencillo y sensible que permita, en un principio, la detección y diferenciación de *Aspergillus* sp. de otros géneros e incluso de secciones

diferentes dentro del mismo género *Aspergillus*, partiendo de muestras de diversa procedencia.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5

En un aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de secciones del género *Aspergillus* en una muestra biológica que comprende

- (a) extraer el ADN de dicha muestra biológica; y
- (b) poner en contacto el ADN obtenido en la etapa (a) con una sonda seleccionada del grupo formado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, o cualquier combinación de dichas sondas,

10

15

en donde

- (i) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Fumigati*;
- (ii) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Flavi*; y
- (iii) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Nigri*.

20

25

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con una sonda seleccionada del grupo formado por:

- i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos

mostrada en la SEQ ID NO: 2, y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3,

ii) un polinucleótido que hibrida específicamente con un polinucleótido como el definido en i); y

5 iii) cualquier combinación de polinucleótidos definidos en i) o ii).

En otro aspecto, la invención se relaciona con una pareja de oligonucleótidos formada por un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en
10 SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende, al menos, una sonda según la presente invención y, opcionalmente, una pareja de cebadores que amplifica específicamente un polinucleótido que comprende la totalidad o parte de la
15 región ITS de *Aspergillus* sp.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según la presente invención, para la identificación de las secciones *Fumigati*, *Flavi* y *Nigri* del género *Aspergillus* en una muestra biológica.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un esquema que ilustra la localización de la región ITS de *Aspergillus* sp.

25

La Figura 2 muestra el alineamiento y la comparación mediante T-coffee de un fragmento de las secuencias pertenecientes a las diferentes secciones dentro del género *Aspergillus* contempladas en la presente invención. Zonas 1 y 2: Regiones de homología entre las secuencias disponibles para el diseño de cebadores. Zona de divergencias entre
30 secuencias utilizada para el diseño de las sondas específicas.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la fluorescencia detectada a tiempo real durante la amplificación mediante una PCR múltiple de la región ITS con las sondas Taqman

diseñadas para distinguir *Aspergillus* de las secciones *Fumigati*, *Flavi* y *Nigri*, utilizando el ADN extraído a partir *A. fumigatus* AF-293, *A. flavus* y *A. niger*, y agua como control negativo de la reacción. El cuadrado negro (■) corresponde a la sonda marcada con el fluoróforo Texas red (específica de la sección *Nigri*). El triángulo negro (▲) corresponde a la sonda marcada con el fluoróforo FAM (específica de la sección *Fumigati*). El círculo negro (●) corresponde a la sonda marcada con el fluoróforo HEX (específica de la sección *Flavi*).

La Figura 4 muestra la localización de las zonas de muestreo ambiental.

10

La Figura 5 es una gráfica que muestra la fluorescencia detectada a tiempo real durante la amplificación mediante una PCR múltiple de la región ITS con las sondas Taqman diseñadas para distinguir *Aspergillus* sp. de las secciones *Fumigati*, *Flavi* y *Nigri*, utilizando el ADN extraído a partir de todos los aislamientos realizados del ambiente, agua como control negativo y el ADN extraído de *A. niger* (■) como control positivo de la reacción.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los sistemas utilizados actualmente para la detección e identificación de *Aspergillus* sp. como agente causal de un proceso infeccioso o de contaminación son normalmente poco efectivos, tediosos o conllevan un elevado coste. Por ello, los inventores han diseñado un método rápido, sencillo y sensible que permite la detección y diferenciación de *Aspergillus* sp. de otros géneros de hongos e incluso de secciones dentro del mismo género. Dicho método está basado en el diseño de tres sondas específicas para tres secciones del género *Aspergillus*, en particular, las secciones *Fumigati*, *Nigri* y *Flavi*, tres de las secciones de *Aspergillus* que más interés clínico tienen debido a que incluyen algunos de los patógenos más importantes del género.

25

Para la obtención de dichas sondas, tal como se muestra en el Ejemplo 1, en primer lugar los inventores diseñaron una pareja de cebadores dirigida a amplificar la región ITS de *Aspergillus* sp., para lo cual se llevó a cabo un análisis comparativo de las ITS de *Aspergillus* sp. pertenecientes a las distintas secciones a identificar buscando zonas

30

de divergencia y homología entre ellas (Figura 2). Una vez obtenida la pareja de cebadores dirigida a amplificar la región ITS de *Aspergillus* sp., se procedió a diseñar las sondas específicas de cada una de las secciones de *Aspergillus* a identificar. A continuación, se ensayaron cada una de las sondas con especies del género *Aspergillus*,
 5 demostrando la efectividad de dichas sondas en la identificación de las especies incluidas en las secciones *Fumigati*, *Nigri* y *Flavi* de *Aspergillus*.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con un método, de aquí en adelante método de la invención, para la identificación de secciones del género *Aspergillus* en una
 10 muestra biológica que comprende

- (a) extraer el ADN de dicha muestra biológica; y
- (b) poner en contacto el ADN obtenido en la etapa (a) con una sonda seleccionada del grupo formado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende la
 15 secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, o cualquier combinación de dichas sondas,
 en donde

- (i) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de
 20 nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Fumigati*;

- (ii) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de
 25 nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Flavi*; y

- (iii) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de
 30 nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Nigri*.

Como sabe el experto en la materia, según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, el género *Aspergillus* se divide en 8 subgéneros, que se subdividen a su vez en

18 secciones, tal como se muestra en la Tabla 1. Dichas secciones incluyen, entre otras, las secciones *Fumigati*, *Falvi* y *Nigri*, a las cuales va dirigida la presente invención.

Tabla 1
Subgéneros y secciones del género *Aspergillus*

Subgénero	Sección	Teleomorfo
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i>
	<i>Restricti</i>	<i>Eurotium</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>
	<i>Clavati</i>	<i>Neocarpenteles</i> ,
	<i>Cervini</i>	<i>Dichotomomyces</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Neopetromyces</i>
	<i>Nigri</i>	-
	<i>Flavi</i>	<i>Petromyces</i>
	<i>Cremeri</i>	<i>Chaetosartorya</i>
<i>Candidi</i>	<i>Candidi</i>	-
<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i>	-
	<i>Flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Usti</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Sparsi</i>	-
<i>Warcupi</i>	<i>Warcupi</i>	<i>Warcupiella</i>
	<i>Zonati</i>	<i>Penicilliopsis</i>
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	<i>Sclerocleista</i>

El método de la invención comprende, en una primera etapa, la extracción del ADN de una muestra biológica.

En la presente invención, el término “muestra biológica” se refiere a cualquier materia que contenga un ácido nucleico, por ejemplo, ADN. En la presente invención se entiende por “ADN” o “ADN genómico” al material genético de los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo de las células.

Así, en una realización particular, la muestra biológica se selecciona del grupo formado por una muestra ambiental, una muestra clínica y una muestra alimentaria. Ejemplos de muestras ambientales incluyen, sin limitar a, muestras de agua, muestras de tierra y muestras vegetales. Ejemplos de muestras clínicas incluyen, sin limitar a, muestras de sangre, saliva, orina, heces, etc. Ejemplos de muestras alimentarias incluyen, sin limitar a, todas aquellas muestras obtenidas de un alimento, ya sea alimento humano o animal, tales como una muestra de carne, una muestra de pescado, harinas y derivados, leche y

derivados, etc. Como sabe el experto en la materia, a la hora de recoger la muestra biológica, es necesario emplear la instrumentación adecuada (tijeras, torundas, gasas, etc.), tomar todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación de las mismas, y almacenar o procesar la muestra de forma apropiada.

5

Una vez recogida la muestra, esta puede conservarse en fresco o puede conservarse en un medio apropiado, por ejemplo, parafina, para su posterior utilización.

La extracción del ADN de la muestra biológica [etapa (a) del método de la invención] puede realizarse mediante protocolos convencionales conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, cromatografía de penetrabilidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, ultrafiltración, empleo de bolas magnéticas a las que los ácidos nucleicos se unen selectivamente, etc. (Sambrook *et al.*, 2001. “Molecular cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3). Igualmente, la extracción del ADN puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de resinas quelantes (e.g. CHELEX 100) y de intercambio iónico. Estas resinas pueden ser naturales (aluminosilicatos) como zeolitas, arcillas minerales y feldespatos, etc., o de naturaleza sintética como óxidos metálicos hidratados (óxido de titanio hidratado), sales insolubles de metales polivalentes (fosfato de titanio), sales insolubles de heteropolisacáridos (molibdofosfato amónico), sales complejas basadas en hexacianoferratos insolubles y zeolitas sintéticas. Estas resinas poseen una elevada afinidad por los iones metálicos polivalentes y se emplean para superar los inhibidores de PCR presentes en el ADN de la muestra. No obstante, en la extracción del ADN también pueden emplearse kits comerciales, por ejemplo, el kit G-Spin IIp (Intron Biotechnology, Corea) o el Fast Prep System Bio 101 (Qbiogene, Madrid, España).

Una vez extraído el ADN de la muestra biológica, se procede a poner en contacto dicho ADN, obtenido en la etapa (a) del método de la invención, con una sonda seleccionada del grupo formado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, o cualquier combinación de

dichas sondas [etapa (b) del método de la invención]. En la Tabla 2 se muestra la secuencia de nucleótidos de las secuencias identificadas SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

5

Tabla 2
Sondas

SEQ ID NO:	Polinucleótido (5'-3')	Sección de <i>Aspergillus</i>
1	CAGCCGACACCCAACTTTAT	<i>Fumigati</i>
2	TTGCCGAACGCAAATCAATC	<i>Flavi</i>
3	CTGCCGACGTTTTCCAACCA	<i>Nigri</i>

En la presente invención, se entiende por “polinucleótido” a la repetición de monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos de polinucleótido: ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Adicionalmente, de forma artificial, a partir de ARN se puede obtener ADN complementario (ADNc) que también se considera un ácido nucleico.

En la etapa (b), el ADN obtenido en la etapa (a) se pone en contacto con al menos una sonda seleccionada del grupo formado por un polinucleótido que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2 ó 3, o bien con cualquier combinación de dichas sondas, bajo condiciones adecuadas para que se produzca hibridación de la/s sonda/s con el ADN.

20

Como sabe el experto en la materia, una sonda (polinucleótido) hibrida de forma selectiva con otro polinucleótido cuando ambos polinucleótidos presentan secuencias de nucleótidos complementarias el uno respecto el otro y se combinan para dar lugar a una doble cadena. Los nucleótidos se unirán con sus complementarios bajo condiciones normales: A=T; A=U; C≡G; G≡C; T=A ó U=A. El porcentaje de GC dentro de la cadena condiciona la temperatura de anillamiento ya que G se une a C mediante tres puentes de hidrógeno y A se une a U o T mediante dos puentes de hidrógeno; por tanto, y dado que se requiere más energía para romper tres enlaces que para romper dos, dicha energía se traduce en una mayor temperatura. Para el experto en la materia, en base al

porcentaje de GC dentro de las cadenas, es práctica de rutina determinar la temperatura de alineamiento a la que se produce el apareamiento de las secuencias de nucleótidos.

Una vez llevada a cabo la etapa (b) del método de la invención, se procede a detectar la
5 hibridación de la/s sonda/s con el ADN extraído en la etapa (a) del método de la invención.

La detección de dicha hibridación puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos convencionales del estado de la técnica, tales como los recogidos en Sambrook *et al.*,
10 2001 (citado *supra*). A modo de ejemplo, es posible detectar la hibridación por métodos físico-químicos mediante el marcaje del polinucleótido, bien sea con radiactividad o bien con un fluorocromo, como es el caso del método Southern, Northern o la técnica de hibridación *in situ*. Ejemplos de materiales fluorescentes que se pueden emplear en el marcaje de oligonucleótidos incluyen, sin limitar a, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-
15 FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED, Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC). Por otro lado, también es posible marcar las sondas mediante el empleo de FRET o transmisión
20 de energía de resonancia, que es un mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos, donde uno actúa como donador y otro como receptor de energía. Ejemplos de este tipo de sondas incluyen, pero no se limitan a, sondas Taqman, sondas tipo Molecular Beacons, y sondas de tipo Scorpion. Como entiende el experto en la materia, en caso de emplear varias sondas simultáneamente, éstas estarán marcadas con distintos
25 fluorocromos, de forma que se pueden detectar de forma independiente cada una de las hibridaciones.

Las sondas TaqMan permiten, por ejemplo, medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica
30 en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés «quencher»); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la

sonda híbrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia. Fluorescencia que está
5 relacionada con la cantidad de amplicón producido. Así, en una realización particular, la sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de quenchers incluyen BlackBerry® Quenchers [Berry & Associates], Black Hole Quenchers (Sigma-Aldrich) tales como Black Hole Quencher-1 (BHQ1), Black Hole Quencher-2 (BHQ2) y Black
10 Hole Quencher-3 (BHQ-3); DABCYL Quenchers (4,4 - Dimetilamino - azobenzeno - 4' - ácido carboxílico) [AnaSpec, Inc]; QXL® quenchers [AnaSpec, Inc]; TAMRA: 6-carboxitetrametilrodamina, etc.

Las sondas tipo Molecular Beacons son también polinucleótidos de cadena simple que,
15 por su estructura, poseen una zona de apareamiento de bases interna y, que, por tanto, forman una horquilla. En presencia del amplicón la sonda se abre y se une preferentemente a aquél, lo que produce la emisión de fluorescencia. Estructuralmente, poseen la zona complementaria al amplicón en el giro de la horquilla, la de complementariedad interna en el cuello y los fluoróforos en sus extremos: el donador en
20 el 5' y el aceptor en el 3'. Cuando la sonda está cerrada en horquilla, el fluoróforo del 3' impide la emisión de fluorescencia por parte del propio del 5', cosa que no sucede al unirse al amplicón.

Las sondas de tipo Scorpion son moléculas mixtas conteniendo un cebador específico
25 para el amplicón unido covalentemente a una horquilla similar a las sondas del tipo Molecular Beacon que, en su zona de giro, poseen un elemento complementario al amplicón. Los fluoróforos donador y aceptor se encuentran en la estructura de horquilla; de este modo, cuando ésta se encuentra cerrada no se produce la emisión de fluorescencia, cosa que sí sucede cuando ambos se separan debido a la presencia del
30 amplicón y la apertura de la zona en horquilla.

Una vez detectada la hibridación, se puede identificar y concluir la sección de *Aspergillus* que está presente en la muestra biológica, ya que

- (i) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Fumigati*;
- (ii) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Flavi*; y
- (iii) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Nigri*.

10

Opcionalmente, el método de la invención puede incluir, antes de la etapa (b), la realización de una reacción de amplificación enzimática, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región ITS presente en los hongos. Así, en una realización particular, el método de la invención comprende, además, entre las etapas (a) y (b), la amplificación por PCR de un polinucleótido que comprende la totalidad o parte de la región ITS de *Aspergillus* sp. a partir del ADN extraído de la etapa (a). En la Figura 1 se representa un esquema general en el que se muestra la estructura de los genes en donde se incluyen las regiones ITS entre los genes 18S, 5,8S y 26 S para todos los hongos.

20

Como entiende el experto en la materia, una reacción de amplificación consiste, básicamente, en la multiplicación exponencial de una molécula de ADN diana (o de una región diana de una molécula de ADN) mediante el empleo de oligonucleótidos que hibridan con las regiones que flanquean la región diana que se quiere amplificar (cebadores). Las diferentes técnicas o procedimientos de llevar a cabo reacciones de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001. (citado *supra*). En una realización particular, dicha amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de la pareja de cebadores cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 (Tabla 3).

30

Tabla 3
Cebadores

Diana	SEQ ID NO:	Cebadores	Tm* (°C)	%CG**
ITS	4	(F) 5'- aatcatcgagtcctttgaa – 3'	48,33	33,3
	5	(R) 5'- cctccgcttattgatatg – 3'	51,54	44,4

F-Forward; R-Reverse

* Tm: temperatura de melting o temperatura de fusión de los cebadores, según Primer3.

** %CG: porcentaje de guaninas y citocinas que está presente en las secuencias dadas.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de reacciones de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y variaciones de la misma [amplificación regional de la reacción en cadena de la polimerasa (RA-PCR, del inglés “Regional Amplification PCR”), la reacción en cadena de la polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR del inglés “Real Time PCR”), etc.]. El protocolo seguido para llevar a cabo una PCR es ampliamente conocido en el estado de la técnica y actualmente, existen kits comerciales que contienen los materiales necesarios para llevar a cabo dicha amplificación. Asimismo, las condiciones de temperatura, tiempo, concentraciones de reactivos y número de ciclos de la PCR dependerán de la ADN polimerasa utilizada en la reacción de amplificación, de la especificidad de los cebadores, etc. Si se emplea un kit comercial, las condiciones de la reacción serán las especificadas por el fabricante del kit.

Tras finalizar la reacción de amplificación, si se desea, se puede proceder a separar los productos de amplificación o amplicones. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para separar los productos de amplificación. Las técnicas para separar los productos de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, como por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001 (citado *supra*). Técnicas para separar los productos de amplificación son, por ejemplo, electroforesis sumergida con geles de Methafor, electroforesis en geles de poliacrilamida, electroforesis capilar, etc.

Preferentemente, la PCR será una RT-PCR. La RT-PCR es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación

de ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que
 5 albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos de amplificación. Ejemplos de materiales fluorescentes que se pueden emplear en el marcaje de oligonucleótidos han sido citados previamente.

10 La RT-PCR puede realizarse marcando fluorescentemente polinucleótidos (sondas) que detectan específicamente la aparición del producto deseado. Tal como se ha explicado previamente, el fundamento de esta técnica se basa en el mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos. Ejemplos de sondas que pueden emplearse en una PCR a Tiempo Real incluyen, pero no se limitan a, sondas Taqman, sondas tipo Molecular
 15 Beacons, y sondas de tipo Scorpion, las cuales han sido explicadas en detalle en párrafos anteriores.

Por otro lado, como entenderá el experto en la materia, también cabe la posibilidad de llevar a cabo una PCR múltiple a Tiempo Real, mediante el empleo simultáneo de
 20 varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, de forma que se pueden detectar en una única reacción PCR distintos productos de amplificación. Un ejemplo de PCR múltiple a Tiempo Real se muestra en los Ejemplos que ilustran la invención, en donde las sondas dirigidas a identificar las secciones *Fumigati*, *Flavi* o *Nigri* de *Aspergillus* sp. han sido marcadas, respectivamente, con 5-FAM (5-Carboxifluoresceína), HEX (6-
 25 carboxi-1,4-dicloro-2',4', 5', 7'-tetraclorofluoresceína) y Texas Red® (Sulforodamina 101 ácido clorhídrico).

Para la puesta en práctica de la presente invención, los inventores han diseñado tanto una pareja de oligonucleótidos para su empleo de una PCR, como unas sondas para
 30 identificar las secciones *Fumigati*, *Flavi* o *Nigri*.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una sonda, de aquí en adelante, sonda de la invención, seleccionada del grupo formado por

- i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3,
- 5 ii) un polinucleótido que hibrida específicamente con un polinucleótido como el definido en i); y
- iii) cualquier combinación de polinucleótidos definidos en i) o ii).

Los términos polinucleótido e hibridación han sido explicados en párrafos anteriores.

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con una pareja de oligonucleótidos formada por un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 5.

15

Por otro lado, la puesta en práctica del método de la invención también requiere el empleo de los materiales apropiados para ello, los cuales pueden encontrarse formando parte de un pack o kit.

20

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante, kit de la invención, que comprende, al menos, una sonda de la invención, y, opcionalmente, una pareja de cebadores que amplifica específicamente un polinucleótido que comprende la totalidad o parte de la región ITS de *Aspergillus* sp.

25

El término “kit”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una combinación de un conjunto de componentes adecuados para la puesta en práctica del método de la invención, junto con sus contenedores y envases apropiados para su venta comercial, etc.

30

En una realización particular, la pareja de cebadores incluida dentro del kit de la invención está compuesta por los oligonucleótidos cuyas secuencias se muestran en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

Reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo una PCR incluyen, sin limitar a, dNTPs, iones divalentes y/o monovalentes, una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa, ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas, etc. No obstante, actualmente existen kits disponibles
5 comercialmente que contienen los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación.

Por otro lado, el kit de la invención puede comprender o bien la/s sonda/s ya marcada/s, o los reactivos necesarios para llevar a cabo el marcaje de las mismas. Los tipos de
10 compuestos que se puede emplear en el marcaje de polinucleótidos han sido explicados previamente en la presente memoria. En otra realización particular del kit de la invención, la sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher.

15 Tal como se ha mencionado previamente, el kit de la invención es útil en la puesta en práctica del método de invención. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para la identificación de las secciones *Fumigati*, *Flavi* y *Nigri* del género *Aspergillus* en una muestra biológica que, en una realización particular, se selecciona del grupo que consiste en una muestra ambiental, una muestra
20 clínica y una muestra alimentaria.

Todas las realizaciones particulares del método de la presente invención son aplicables al kit de la invención y a sus usos.

25 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Detección de la secciones *Fumigati*, *Nigri* y *Flavi* de *Aspergillus* sp.

30

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Diana seleccionada y Diseño de cebadores

La literatura indica que la región ITS resulta ser un marcador universal utilizado por diversos laboratorios de microbiología, junto con la observación morfológica, para la identificación de hongos. Por ello, se decidió seleccionar esta zona como secuencia
5 diana.

Se realizó la búsqueda de las secuencias ITS correspondientes a las diferentes especies de *Aspergillus* utilizadas en este estudio en la base de datos Entrez Nucleotide y BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de Estados Unidos
10 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Se llevó a cabo un análisis comparativo de las secuencias ITS de las diferentes especies de *Aspergillus*, pertenecientes a las distintas secciones que se quieren diferenciar, mediante el empleo del programa T-coffee (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>)
15 buscando de esta manera zonas de divergencia y homología entre ellas.

La pareja de cebadores, que se muestra en la Tabla 2, para amplificar una zona concreta dentro de las secuencias ITS, se diseñó mediante el programa Primer3 (v. 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>).
20

1.2 PCR a Tiempo Real

1.2.1. Cepas de colección utilizadas

25 En la Tabla 4 se recoge la relación de cepas pertenecientes a diferentes especies y secciones del género *Aspergillus* así como de otros hongos pertenecientes a diferentes géneros analizadas en este ejemplo.

Tabla 4
Especies y cepas de hongos de colección utilizados

Procedencia ⁽¹⁾	Nº ref. de cepas	Especie	Subgénero	Sección
CECT	2071	<i>Aspergillus fumigatus</i> (<i>Neosartorya fumigata</i>)	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>
ATCC	204305	<i>Aspergillus fumigatus</i> (<i>Neosartorya fumigata</i>)	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>
TIGR	AF-293	<i>Aspergillus fumigatus</i> (<i>Neosartorya fumigata</i>)	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>
UPV	10-610	<i>Aspergillus lentulus</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>
UPV	06-091	<i>Aspergillus udagawae</i> (<i>Neosartorya udagawae</i>)	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>
UPV	06-092	<i>Aspergillus udagawae</i> (<i>Neosartorya udagawae</i>)	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>
CECT	2674	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Clavati</i>
ATCC	204304	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Flavi</i>
CECT	2094	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Flavi</i>
CECT	2091	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Nigri</i>
CECT	2544	<i>Aspergillus nidulans</i> (<i>Emericella nidulans</i>)	<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>
UPV	99-071	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Versicolores</i>
CECT	2663	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i>
CECT	2808	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i>
CECT	20272	<i>Penicillium chrysogenum</i>		
UPV	99-059	<i>Scedosporium prolificans</i>		
ATCC	90113	<i>Cryptococcus neoformans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i>)		
ATCC	22019	<i>Candida parapsilosis</i>		
NCPF	3153	<i>Candida albicans</i>		
ATCC	6258	<i>Candida krusei</i>		
UPV	99-162	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
CBS	201.65	<i>Mucor hiemalis</i>		
CBS	226.29	<i>Mucor indicus</i>		
CBS	260.68	<i>Mucor racemosus</i>		
CBS	135.65	<i>Mucor ramosissimus</i>		
CBS	195.68	<i>Mucor circinelloides</i>		
CBS	112.07	<i>Rhizopus oryzae</i>		
FMR	9899	<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>		
FMR	10383	<i>Rhizomucor pusillus</i>		
CBS	103.93	<i>Rhizomucor irregularis</i>		

UPV: Cepas que provienen de aislamientos que se han mantenido como colección propia del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina de la UPV-EHU.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

ATCC: American Type Culture Collection.

TIGR: The Institute for Genomic Research.

CBS: Centraalbureau voor schimmelcultures (Fungal Biodiversity Centre).

FMR: Facultad de Medicina Reus.

5

10

NOTA: En aquellas especies que poseen estado sexual conocido, el nombre del teleomorfo se indica entre paréntesis

5 1.2.1.1 Condiciones de cultivo para el crecimiento de los microorganismos

Los microorganismos se sembraron por estría en tubos inclinados de agar glucosado de Sabouraud o de agar de dextrosa y patata. Las levaduras se incubaron a 28°C durante 72 horas y los hongos filamentosos a 28°C durante 7 días. Para la conservación de las cepas y aislados los tubos se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron a 4°C. Para el mantenimiento de las cepas y aislados en uso se realizaron resiembras mensuales en las mismas condiciones.

1.2.1.2 Obtención de levaduras para la extracción de ADN

15

Un cultivo de levaduras crecido en agar glucosado de Sabouraud, tal y como se describe en el apartado 1.2.1.1, se resuspendió en solución salina y las levaduras se cosecharon por centrifugación a 2.500 g durante 5 minutos. Las levaduras se lavaron 2 veces con solución salina, ajustándose a la concentración adecuada mediante recuento en hemocitómetro. Con las levaduras así obtenidas se inoculó a continuación caldo Sabouraud a una concentración final de 1×10^5 células/ml. Los cultivos se mantuvieron a 28°C durante 24- 48 horas en agitación a 120 rpm, tras lo cual se centrifugaron a 2.500 g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante las levaduras se lavaron dos veces con 30 ml de solución salina. La pastilla final de levaduras se pesó y se conservó a una temperatura de -80°C en alícuotas de aproximadamente 100 mg.

25

1.2.1.3 Obtención de conidios y micelio para la extracción de ADN

Al cultivo de un hongo filamentosos en tubos de agar de dextrosa y patata inclinado crecido según las condiciones descritas en el apartado 1.2.1.2, se le añadieron 4 ml de Solución salina 0,9% (p/v) - Tween 20 0,02% (v/v) (SS-T) estéril, se resuspendieron los conidios agitando 2 veces con agitatus y se recogieron en un tubo estéril de 50 ml. Este paso se repitió 6 veces y posteriormente se añadió SS-T hasta alcanzar los 40 ml y se centrifugó a 2.500 g durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante. La pastilla con

30

los conidios se lavó 2 veces con 30 ml de SS-T y se resuspendió en un volumen final de 10 ml de SS-T ajustándose a la concentración adecuada mediante recuento en hemocitómetro.

- 5 Los micelios se obtuvieron inoculando caldo Sabouraud a una concentración final de 1×10^5 conidios/ml. Los cultivos se mantuvieron a 28°C durante 24-48 horas en agitación a 120 rpm, tras lo cual se centrifugaron a 2.500 g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante los micelios se lavaron dos veces con 30 ml de solución salina. La pastilla final de micelio se pesó y se conservó a -80°C en alícuotas de aproximadamente 100 mg.

1.2.2 Extracción de ADN

1.2.2.1 Materiales

- 15
- Tampón de lisis AP1 (Kit DNeasy Plant Mini, Qiagen Ref. 74904)
 - RNAsa A: ribonucleasa A (Qiagen Ref.19101)
 - Cloroformo
 - Isopropanol
 - Etanol (70 %)
- 20
- Tampón de elución AE (Kit DNeasy Plant Mini, Qiagen Ref. 74904)
 - Centrífuga Minispin plus de Eppendorf
 - Incubador-agitador

1.2.2.2 Preparación de las muestras

- 25
- Se colocaron las muestras de aproximadamente 100 mg de peso húmedo, sobre un mortero de ágata estéril, se les añadió nitrógeno líquido y se pulverizaron manualmente. El proceso se repitió 2 o 3 veces hasta conseguir un polvo fino. Una vez evaporado el nitrógeno líquido, se añadieron 600 µl del tampón de lisis AP1, y se resuspendió el material en dicho tampón, recogiendo la suspensión en un tubo estéril.
- 30

1.2.2.3 Método

Los pasos seguidos para la extracción de ADN fueron los siguientes:

1. Al material pulverizado del paso 1.2.1.3 y resuspendido en tampón AP1, se le añadieron 6 µl de RNAsa A y se agitó fuertemente con agitatusos.
- 5 2. Se incubó a 65°C durante 10 minutos en un baño de agua para romper las células y eliminar el ARN, invirtiendo el tubo 2 ó 3 veces durante la incubación.
3. Se enfrió en hielo durante 5 minutos.
4. Se añadieron a la mezcla 200 µl de cloroformo y se agitó suavemente invirtiendo varias veces el tubo.
- 10 5. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos, y posteriormente se pasó la fase acuosa superior a otro tubo limpio teniendo cuidado de no tocar la pastilla central.
6. Se añadieron a la suspensión anterior 500 µl de isopropanol frío y se invirtió varias veces el tubo.
- 15 7. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.
8. Se añadieron 400 µl de etanol al 70% frío y se invirtió varias veces el tubo.
9. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.
10. Se mantuvo el tubo abierto durante 15 minutos para evaporar los restos de etanol.
- 20 11. Pasado ese tiempo se resuspendió la pastilla en 50 µl de tampón de elución AE.
12. Finalmente, el ADN se conservó a -80°C hasta su uso.

Tanto la superficie de trabajo como el mortero de ágata se trataron antes y después de cada extracción con la solución Termi-DNA-tor (Biotools B&M Labs S.A. 22.001) para
25 asegurar la completa eliminación de ADN residual.

1.2.2.4 Medida de la concentración de ADN

La concentración y pureza del ADN obtenido se midió mediante absorbancia a 230, 260 y 280 nm con un nanofotómetro (Implen). Posteriormente se aplicaron las técnicas
30 desarrolladas de PCR a tiempo real con los cebadores y sondas desarrolladas, en una PCR a tiempo real simple o múltiple.

1.2.3 Diseño de sondas Taqman

Mediante el programa informático Beacon Designer 2.0 (Premier Biosoft International) se diseñaron diferentes sondas Taqman para las secciones de *Aspergillus* a discriminar, incluidas en la Tabla 5.

5

Las diferentes sondas fueron marcadas con fluoróforos distintos de manera que, posteriormente, fuese posible ser utilizadas todas a la vez en una misma reacción multiplex.

Tabla 5

10

Secuencias de las sondas Taqman utilizadas

Sección	Sonda
<i>Fumigati</i>	5'-FAM-CAGCCGACACCCAACCTTTAT-TAMRA-3'
<i>Flavi</i>	5'-HEX-TTGCCGAACGCAAATCAATC-BHQ1-3'
<i>Nigri</i>	5'-Texas Red-CTGCCGACGTTTTCCAACCA-BHQ2-3'

15

NOTA: En negrita se indican el fluoróforo, en el extremo 5', y la molécula aceptora en el extremo 3'. FAM: 5-carboxifluoresceína; HEX: 6-carboxi-1,4-dicloro-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína; Texas Red®: Sulforodamina 101 ácido clorhídrico; TAMRA: 6-carboxitetrametilrodamina; BHQ1: Black Hole Quencher-1; BHQ2: Black Hole Quencher-2.

20

Para la detección de las distintas secciones en PCR a tiempo real se utilizaron los cebadores diseñados para la amplificación de la región ITS detallados en la Tabla 3. Se ensayó, de manera separada cada una de las sondas con todas las especies y cepas de colección especificadas en la Tabla 5. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

1.2.4 Mezcla de reacción

25

Para la reacción se empleó el kit Sso fast Probe Supermix 2X (ref: 172-5233, Bio-Rad) en un volumen de reacción total de 20 µl.

Master mix 2X	10 µl
Agua	4,75 µl
Cebador Forward (20 µM)	1 µl
Cebador Reverse (20 µM)	1 µl
Sonda (4 µM)	1,25 µl
ADN (10 ng/µl)	2 µl

1.2.5 Programa de amplificación

5 La PCR a tiempo real se llevó a cabo en el sistema CFX96 Real-Time PCR System de Bio-Rad en placas de 96 pocillos con el siguiente programa:

95°C	2 min	}	x 45 ciclos
95°C	5 seg	}	
60°C	25 seg		

10 Lectura placa al final de cada uno de los 45 ciclos

En cada programa de amplificación se incluyó un control negativo, en el que se añadió a la mezcla de reacción agua en lugar de ADN.

15 1.2.6 PCR múltiple a Tiempo Real

Se ensayó una reacción de PCR a tiempo real múltiple para la posible detección e identificación de los miembros de las secciones para las que se diseñaron sondas de hibridación específicas, en la colección de hongos incluida en el apartado 1.2. Se utilizó como control positivo *A. fumigatus* (miembro representativo de la sección *Fumigati*), *A. flavus* (miembro representativo de la sección *Flavi*) y *A. niger* (miembro representativo de la sección *Nigri*). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

20

La mezcla de reacción y el programa de amplificación fueron idénticos a los utilizados en la PCR a tiempo real, apartados 1.2.4 y 1.2.5, excepto por la concentración de las sondas, que fue de 0,2 µM para la destinada a distinguir los hongos pertenecientes a la sección *Fumigati*, y de 0,15 µM para las otras dos. El volumen final ha sido en todos los casos de 20 µl, completando con la cantidad de agua necesaria para ello.

25

30 1.2.7 Análisis de los resultados

Mediante el software de análisis CFX Manager (Bio-rad) se detectó la fluorescencia de la sonda correspondiente en cada reacción o pocillo, y se representó como fluorescencia normalizada respecto al número de ciclos. El software calculó la línea de base para cada muestra, que indica la ausencia de amplificación detectable.

35

Además, el software calculó el Ct o ciclo umbral para cada pocillo, que es el ciclo en el que la fluorescencia de una muestra supera el nivel umbral, en la escala logarítmica de la amplificación. Posteriormente se calculó el Ct promedio y la desviación estándar para cada muestra.

5

2. RESULTADOS

2.1 PCR a tiempo real con la sonda específica de la sección *Fumigati*

Los datos de Ct medio (valor medio de ciclo umbral) y desviaciones estándar obtenidas en la aplicación de la reacción de PCR a tiempo real utilizando la sonda Taqman que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 diseñada para discriminar *Aspergillus* sp. de la sección *Fumigati* para los ADN extraídos de las distintas especies analizadas se muestran en la Tabla 6.

15

Tabla 6

Resumen de los datos de Ct medio y desviaciones estándar obtenidas en la aplicación de la reacción de PCR a tiempo real utilizando la sonda Taqman que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 diseñada para discriminar *Aspergillus* sp. de la sección *Fumigati* para los ADN extraídos de las distintas especies analizadas

20

Muestra	Ct (media)	Desv. estándar
<i>A. fumigatus</i> Af-293	18,18	0,636
<i>A. flavus</i>	-	-
<i>A. niger</i>	-	-
<i>A. nidulans</i>	-	-
<i>A. terreus</i> CECT 2808	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-
<i>A. clavatus</i>	-	-
<i>A. oryzae</i>	-	-
<i>A. lentulus</i>	15,39	0,406
<i>C. albicans</i>	-	-
<i>N. udagawae</i>	17,59	0,785
<i>P. crhysogenum</i>	-	-
<i>S. prolificans</i>	-	-
<i>C. parasilopsis</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-
<i>M. hiemalis</i>	-	-
<i>M. indicus</i>	-	-
<i>M. racemosus</i>	-	-
<i>M. ramosissimus</i>	-	-

<i>M. circinelloides</i>	-	-
<i>R. oryzae</i>	-	-
<i>R. rhyzopodiformis</i>	-	-
<i>R. pusillus</i>	-	-
<i>R. irregularis</i>	-	-
Control negativo ^a	-	-

^aControl negativo de la reacción realizado con agua sustituyendo el ADN molde

2.2 PCR a tiempo real con la sonda específica de la sección *Flavi*

- 5 Los datos de Ct medio (valor medio de ciclo umbral) y desviaciones estándar obtenidas en la aplicación de la reacción de PCR a tiempo real utilizando la sonda Taqman que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 diseñada para discriminar *Aspergillus* sp. de la sección *Flavi* para los ADN extraídos de las distintas especies analizadas se muestran en la Tabla 7.

10

Tabla 7

15 **Resumen de los datos de Ct medio y desviaciones estándar obtenidas en la aplicación de la reacción de PCR a tiempo real utilizando la sonda Taqman que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 diseñada para discriminar *Aspergillus* sp. de la sección *Flavi* para los ADN extraídos de las distintas especies analizadas**

Muestra	Ct (media)	Desv. Estándar
<i>A. fumigatus</i> Af-293	-	-
<i>A. flavus</i>	11,17	0,06
<i>A. niger</i>	-	-
<i>A. nidulans</i>	-	-
<i>A. terreus</i> CECT 2808	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-
<i>A. clavatus</i>	-	-
<i>A. oryzae</i>	14	0,095
<i>A. lentulus</i>	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-
<i>N. udagawae</i>	-	-
<i>P. crhysogenum</i>	-	-
<i>S. prolificans</i>	-	-
<i>C. parasilopsis</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-
<i>M. hiemalis</i>	-	-
<i>M. indicus</i>	-	-
<i>M. racemosus</i>	-	-

<i>M. ramosissimus</i>	-	-
<i>M. circinelloides</i>	-	-
<i>R. oryzae</i>	-	-
<i>R. rhizopodiformis</i>	-	-
<i>R. pusillus</i>	-	-
<i>R. irregularis</i>	-	-
Control negativo	-	-

2.3 PCR a tiempo real con la sonda específica de la sección *Nigri*

Los datos de Ct medio (valor medio de ciclo umbral) y desviaciones estándar obtenidas en la aplicación de la reacción de PCR a tiempo real utilizando la sonda Taqman que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 diseñada para discriminar *Aspergillus* sp. de la sección *Nigri* para los ADN extraídos de las distintas especies analizadas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Resumen de los datos de Ct medio y desviaciones estándar obtenidas en la aplicación de la reacción de PCR a tiempo real utilizando la sonda Taqman que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 diseñada para discriminar *Aspergillus* sp. de la sección *Nigri* para los ADN extraídos de las distintas especies analizadas

Muestra	Ct (media)	Desv. estándar
<i>A. fumigatus</i> Af-293	-	-
<i>A. flavus</i>	-	-
<i>A. niger</i>	7,62	0,173
<i>A. nidulans</i>	-	-
<i>A. terreus</i> CECT 2808	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-
<i>A. clavatus</i>	-	-
<i>A. oryzae</i>	-	-
<i>A. lentulus</i>	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-
<i>N. udagawae</i>	-	-
<i>P. crhysogenum</i>	-	-
<i>S. prolificans</i>	-	-
<i>C. parasilopsis</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-
<i>M. hiemalis</i>	-	-
<i>M. indicus</i>	-	-

<i>M. racemosus</i>	-	-
<i>M. ramosissimus</i>	-	-
<i>M. circinelloides</i>	-	-
<i>R. oryzae</i>	-	-
<i>R. rhizopodiformis</i>	-	-
<i>R. pusillus</i>	-	-
<i>R. irregularis</i>	-	-
Control negativo	-	-

2.4 Resultados de la PCR a tiempo Real

Los resultados obtenidos mediante aplicación de la técnica de PCR convencional y a tiempo real se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9
Resumen de los resultados obtenidos con la aplicación de la técnica de PCR convencional y a tiempo real

10

Identificación	Amplificación ITS ⁽¹⁾	Sonda <i>Fumigati</i> ⁽²⁾	Sonda <i>Flavi</i> ⁽³⁾	Sonda <i>Nigri</i> ⁽⁴⁾
<i>A. fumigatus</i> (Af-293)	+	+	-	-
<i>A. flavus</i>	+	-	+	-
<i>A. niger</i>	+	-	-	+
<i>A. nidulans</i>	+	-	-	-
<i>A. terreus</i> (CECT 2808)	+	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	+	-	-	-
<i>A. clavatus</i>	+	-	-	-
<i>A. oryzae</i>	+	-	+	-
<i>A. lentulus</i>	+	+	-	-
<i>N. udagawae</i> (UPV 06-091)	+	+	-	-
<i>P. crhysogenum</i>	+	-	-	-
<i>S. prolificans</i>	+	-	-	-
<i>C. neoformans</i>	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	-
<i>C. albicans</i>	+	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-
<i>M. hiemalis</i>	+	-	-	-

<i>M. indicus</i>	+	-	-	-
<i>M. racemosus</i>	+	-	-	-
<i>M. ramosissimus</i>	+	-	-	-
<i>M. circinelloides</i>	+	-	-	-
<i>R. oryzae</i>	+	-	-	-
<i>R. rhizopodiformis</i>	+	-	-	-
<i>R. pusillus</i>	+	-	-	-
<i>R. irregularis</i>	+	-	-	-

5 (1) Reacción de PCR convencional con los cebadores diseñados para la amplificación de la región ITS estudiada y posterior observación de los resultados obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa. La obtención de un fragmento amplificado se considera resultado positivo (+), y se consideran resultados negativos (-) aquellos casos en los que no se obtuvo ningún producto de amplificación.

10 (2), (3) y (4) Resultado de la reacción de PCR a tiempo real utilizando las sondas diseñadas para discriminar *Aspergillus* sp. de las secciones *Fumigati* (2), *Flavi* (3) y *Nigri* (4) En todos los casos la detección de fluorescencia durante la amplificación se consideró un resultado positivo (+), y la no detección un resultado negativo (-).

15 Como se observa cada una de las sondas diseñadas solo reacciona de forma específica con las especies del género *Aspergillus* pertenecientes a la sección para la que fue diseñada.

2.5 Resultados con la PCR múltiple diseñada

Los resultados obtenidos durante la amplificación mediante la técnica de PCR a tiempo real se resumen en la Tabla 10.

20 **Tabla 10**
Resumen de los resultados obtenidos durante la amplificación mediante PCR múltiple a tiempo real

Identificación	Nº Cepa	Ct (media)	Desy. estándar
<i>A. fumigatus</i>	Af-293	15,44	0,597
	CECT 2071	14,23	0,495
	ATCC 204305	14,45	0,417
<i>N. udagawae</i>	UPV 06-091	14,52	0,357
	UPV 06-092	14,47	0,250
<i>A. lentulus</i>	UPV 10-610	13,27	0,082
<i>A. clavatus</i>	CECT 2674	-	-
<i>A. flavus</i>	ATCC 204304	14,52	0,048
<i>A. oryzae</i>	CECT 2094	13,60	0,056
<i>A. niger</i>	CECT 2091	14,31	0,435
<i>A. nidulans</i>	CECT 2544	-	-
<i>A. versicolor</i>	UPV 99-071	-	-
<i>A. terreus</i>	CECT 2663	-	-

	CECT 2808	-	-
<i>P. crhysogenum</i>	CECT 20272	-	-
<i>S. prolificans</i>	UPV 99-059	-	-
<i>C. neoformans</i>	ATCC 90113	-	-
<i>C. albicans</i>	NCPF 3153	-	-
<i>C. parasilopsis</i>	ATCC 22019	-	-
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	UPV 99-162	-	-
<i>M. hiemalis</i>	CBS 201.65	-	-
<i>M. indicus</i>	CBS 226.29	-	-
<i>M. racemosus</i>	CBS 260.68	-	-
<i>M. ramosissimus</i>	CBS 135.65	-	-
<i>M. circinelloides</i>	CBS 195.68	-	-
<i>R. oryzae</i>	CBS 112.07	-	-
<i>R. rhizopodiformis</i>	FMR 9899	-	-
<i>R. pusillus</i>	FMR 10383	-	-
<i>R. irregularis</i>	CBS 103.93	-	-
Control negativo	-	-	-

Nota: Los resultados de Ct expuestos han sido el resultado de la detección por parte del termociclador del fluoróforo correspondiente a cada sonda, que ha sido capaz de discriminar en cada caso la sección para la que fue diseñada.

5

En la Figura 3 se observan algunos resultados obtenidos con una combinación de sondas y el ADN extraído de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*. Aunque no se indica en la Tabla 10, al estar marcadas cada una de las sondas diseñadas con un fluoróforo diferente, en la RT-PCR también se detecta que cada una de las sondas diseñadas solo reacciona de forma específica con las especies del género *Aspergillus* que pertenecen a la sección para la que fue diseñada.

10

EJEMPLO 2

Aplicación de la PCR múltiple a tiempo real a los aislados ambientales

15

1. Materiales y Métodos

Los materiales y métodos de obtención de levaduras, conidios y micelios para el aislamiento de DNA, y para la PCR múltiple, fueron iguales que en el Ejemplo 1.

20

1.1 Toma de muestras ambientales y aislamiento de hongos

Se procedió a la toma de muestras en tres puntos de muestreo diferentes, donde se desarrollan actividades agrarias de distinta índole. En cada uno de ellos se estableció el cultivo y cosecha de una determinada especie vegetal: trigo (*Triticum spp.*), vid (*Vitis vinifera*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*). En la Figura 4 se recogen los puntos de muestreo utilizados.

La toma de muestras se realizó mediante la sedimentación de esporas presentes en el aire en dos placas de agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol que permanecieron abiertas durante 30 minutos en cada punto de muestreo. En cada una de las placas utilizadas se obtuvieron más de 90 colonias de hongos. Posteriormente, se seleccionaron 10 colonias distintas al azar de cada zona muestreada y se sembraron en aislamiento en placas de agar de dextrosa y patata. A partir de este crecimiento en placa se siguieron los mismos pasos de obtención de micelio y levaduras que se utilizaron para los microorganismos de colección (apartados 1.2.1.2 y 1.2.1.3 del Ejemplo 1). Asimismo, la extracción de ADN se realizó siguiendo lo indicado en el apartado 1.2.2 (Ejemplo 1).

2. RESULTADOS

A pesar de que se pudo comprobar que ninguna de las 30 colonias seleccionadas pertenecían al género *Aspergillus*, con todas ellas se siguieron los pasos descritos en los apartados 1.2.1.2 y 1.2.1.3 del Ejemplo 1 para la obtención de micelio o levaduras por crecimiento en medio líquido y apartado 1.2.2 (Ejemplo 1) para la extracción de ADN de cada uno de los aislados ambientales. Se ensayó la reacción de PCR múltiple a tiempo real desarrollada con los ADN extraídos a partir de los aislados de las muestras recogidas en el ambiente.

Como se observa en la Figura 5, sólo se detectó fluorescencia en el control positivo en el que se utilizó ADN extraído a partir de *A. niger*, con la sonda destinada a la discriminación de la sección *Nigri*, caso del control positivo efectuado con él. Como era de esperar, ninguna de las 30 muestras provenientes del ambiente reaccionó en la PCR múltiple a tiempo real con las sondas específicas de las secciones *Fumigati*, *Flavi* o *Nigri*.

REIVINDICACIONES

1. Método para la identificación de secciones del género *Aspergillus* en una muestra biológica que comprende
 - 5 (a) extraer el ADN de dicha muestra biológica; y
 - (b) poner en contacto el ADN obtenido en la etapa (a) con una sonda seleccionada del grupo formado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, un polinucleótido que
10 comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, o cualquier combinación de dichas sondas,
en donde
 - (i) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 con dicho ADN es indicativa
15 de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Fumigati*;
 - (ii) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Flavi*; y
 - (iii) la hibridación de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de
20 nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 con dicho ADN es indicativa de que el hongo pertenece al género *Aspergillus*, sección *Nigri*.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende, además, entre las etapas (a) y
25 (b), la amplificación enzimática de un polinucleótido que comprende la totalidad o parte de la región ITS de *Aspergillus* sp. a partir del ADN extraído de la etapa (a).
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de la pareja de cebadores cuyas secuencias de nucleótidos se
30 muestran en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra ambiental, una muestra clínica y una muestra alimentaria.
- 5
6. Una pareja de oligonucleótidos formada por un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 5.
- 10
7. Una sonda seleccionada del grupo formado por
- i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, y un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3,
 - 15 ii) un polinucleótido que hibrida específicamente con un polinucleótido como el definido en i); y
 - iii) cualquier combinación de polinucleótidos definidos en i) o ii).
8. Un kit que comprende, al menos, una sonda según la reivindicación 7, y, opcionalmente, una pareja de cebadores que amplifica específicamente un polinucleótido que comprende la totalidad o parte de la región ITS de *Aspergillus* sp.
- 20
9. Kit según la reivindicación 8, en el que dicha pareja de cebadores está formada por los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
- 25
10. Kit según la reivindicación 8 ó 9, en el que dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher.
- 30
11. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para la identificación de las secciones *Fumigati*, *Flavi* y *Nigri* del género *Aspergillus* en una muestra biológica.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra ambiental, una muestra clínica y una muestra alimentaria.

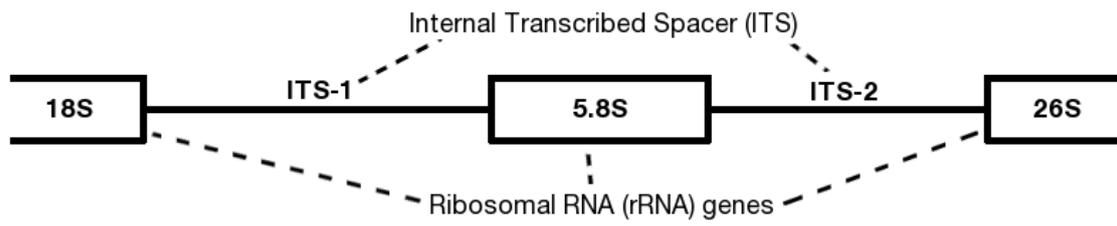
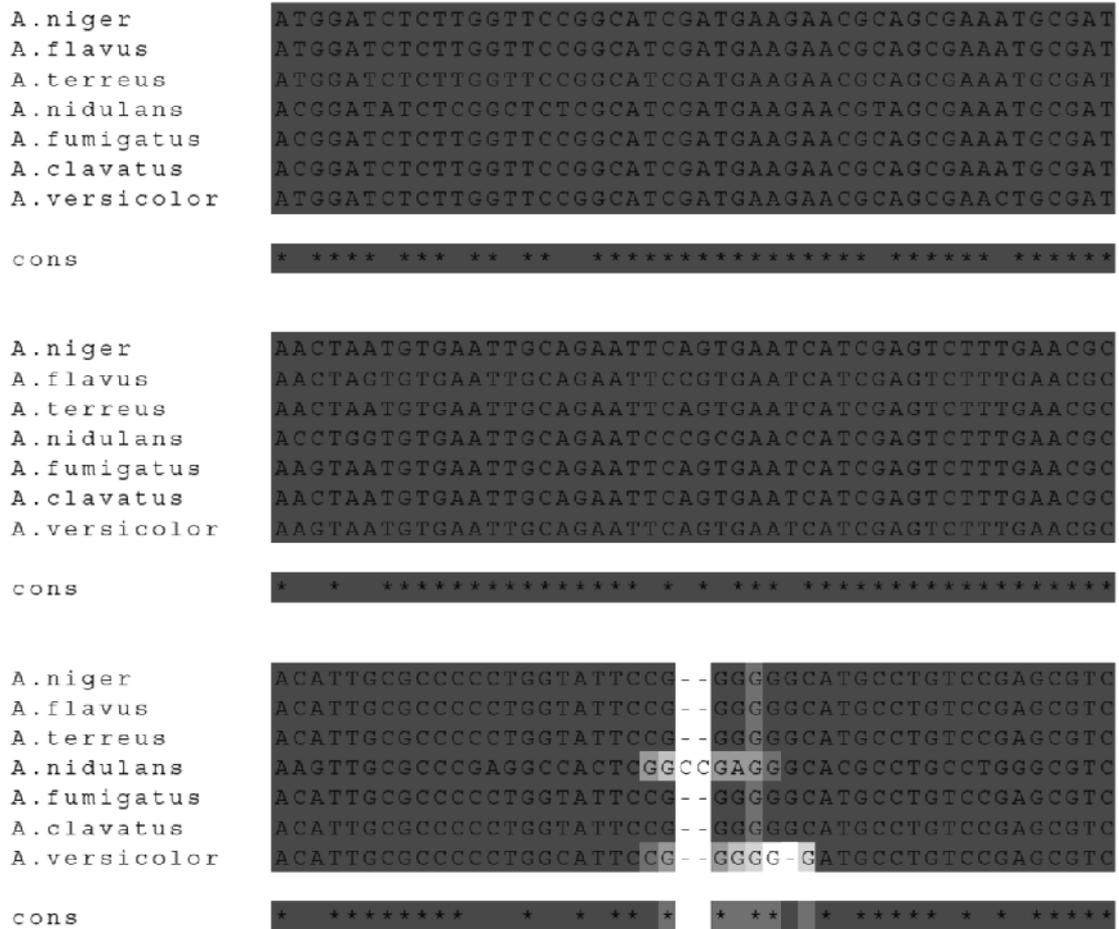


FIG. 1



Zona de homología

FIG. 2



FIG. 2 (cont.)

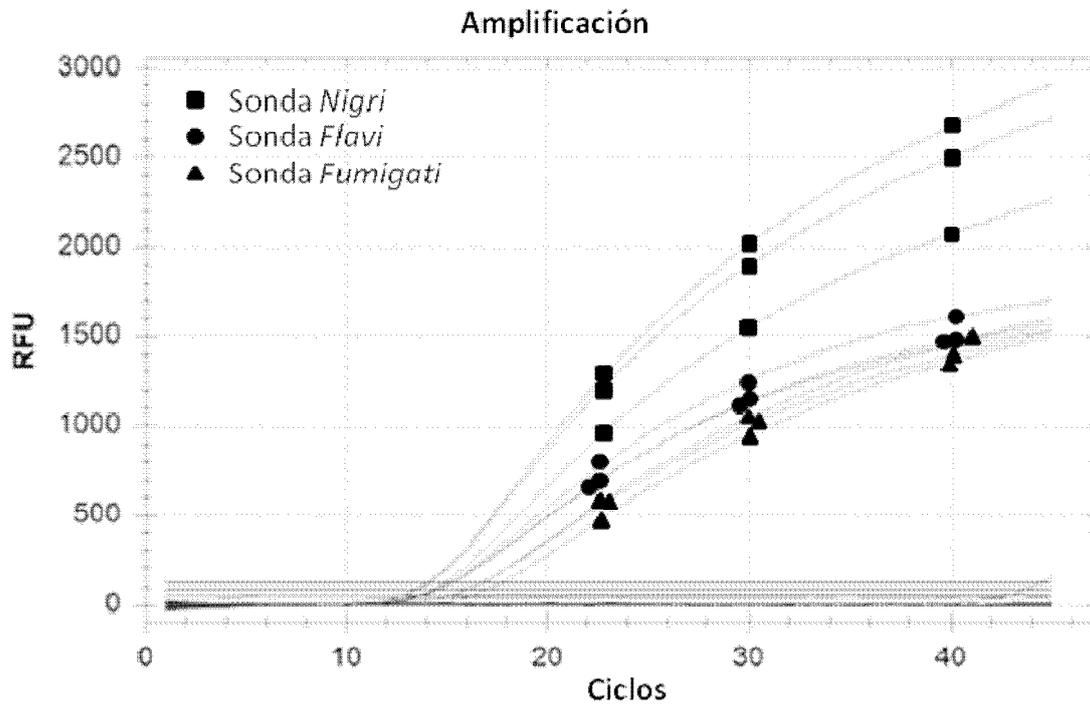


FIG. 3

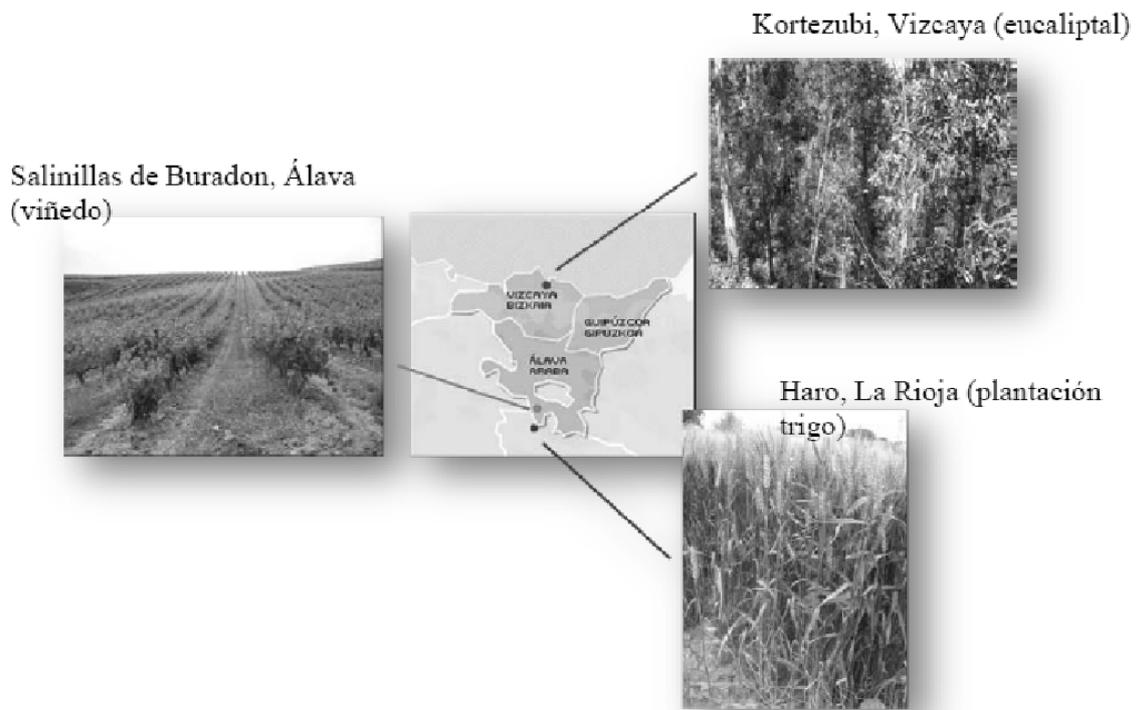


FIG. 4

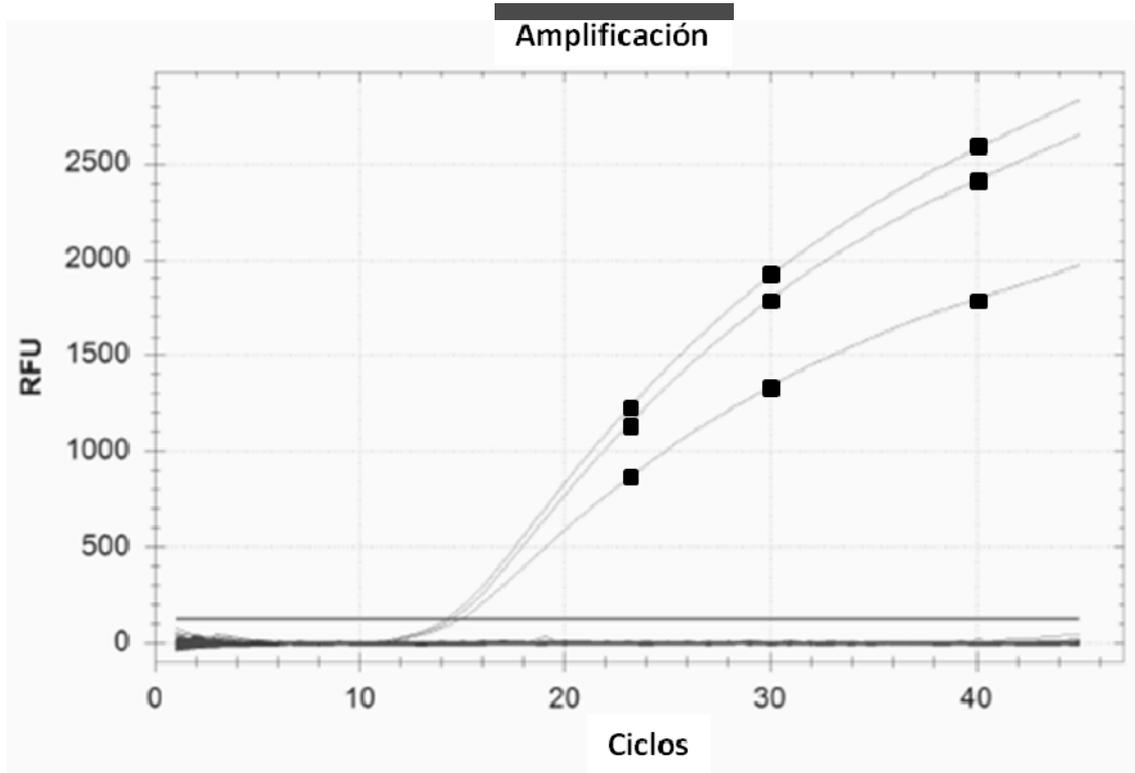


FIG. 5

ES 2 399 862 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad del País Vasco

<120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE ASPERGILLUS SP.

<130> P7490ES00

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda diseñada para identificar la sección Fumigati del género Aspergillus.

<400> 1
cagccgacac ccaactttat 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda diseñada para identificar la sección Flavi del género Aspergillus.

<400> 2
ttgccgaacg caaatcaatc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda diseñada para identificar la sección Nigri del género Aspergillus.

<400> 3
ctgccgacgt tttccaacca 20

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador directo diseñado para amplificar la región ITS del género Aspergillus.

ES 2 399 862 A1

<400> 4
aatcatcgag tctttgaa 18

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador inverso diseñado para amplificar la región ITS del género
Aspergillus.

<400> 5
cctccgctta ttgatatg 18



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131497

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.09.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q 1/04** (2006.01)
C12R 1/66 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 7906286 B2 (TOSHIFUMI FUKUI et al.) 15.03.2011, todo el documento.	1-12
X	JP 2008054563 A (MITSUBISHI CHEM MEDIENCE CORP) 13.03.2008, (resumen) World Patents Index [bases de datos en línea]. Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 06.03.2013]. Número de acceso 2008-D42448 [25].	1-12
X	US 6372430 B1 (MORRISON CHRISTINE J et al.) 16.04.2002, Secuencias SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 64.	6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
08.03.2013

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.03.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3, 4, 9, 10	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 5-8, 11, 12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 7906286 B2 (TOSHIFUMI FUKUI et al.)	15.03.2011
D02	JP 2008054563 A (MITSUBISHI CHEM MEDIENCE CORP)	13.03.2008
D03	US 6372430 B1 (MORRISON CHRISTINE J et al.)	16.04.2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-12, es un método para la identificación de secciones del género *Aspergillus*, en concreto, las secciones *Fumigati*, *Flavi* y *Nigri* (reiv. 1-5). Es también objeto de la invención una pareja de oligonucleótidos (reiv. 6), una sonda (reiv. 7), un kit (reiv. 8-10) y el uso del kit (reiv. 11 y 12).

1. Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

La secuencia SEQ ID NO: 1 está divulgada en el documento D01 (SEQ ID NO: 43)

La secuencia SEQ ID NO: 2 está divulgada en el documento D02 (SEQ ID NO: 6)

La secuencia SEQ ID NO: 3 está divulgada en el documento D01 (SEQ ID NO: 46) y en el documento D02 (SEQ ID NO: 7)

La secuencia SEQ ID NO: 4 está divulgada en el documento D03 (SEQ ID NO: 61)

La secuencia SEQ ID NO: 5 está divulgada en el documento D01 (SEQ ID NO: 82), en el documento D02 (SEQ ID NO: 2) y en el documento D03 (SEQ ID NO: 64)

El documento D01 divulga un método para la identificación de hongos. El método consta de varias etapas, en las cuales: se extrae ADN de una muestra biológica (tejido, fluido corporal, alimentos o muestra ambiental); se amplifica mediante el uso de una pareja de cebadores que amplifican las regiones ITS (SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82); y se identifican las distintas especies de hongos utilizando sondas marcadas, específicas para distintas especies/grupos/secciones de hongos (SEQ ID NO: 43 para *Aspergillus fumigati* y SEQ ID NO: 46 para *Aspergillus Nigri*). En este documento también se divulga un kit con las sondas, cebadores y reactivos necesarios para la realización del método.

El documento D02 divulga un método para la detección de hongos. El método consta de varias etapas, en las cuales: se extrae ADN de una muestra biológica; se amplifica mediante el uso de cebadores que amplifican las regiones ITS y las regiones IGS (SEQ ID NO: 1-4); y se identifican las distintas especies de hongos utilizando sondas específicas para distintas especies/grupos/secciones de hongos (SEQ ID NO: 5 para *Aspergillus fumigatus*, SEQ ID NO: 6 para *Aspergillus flavus* y SEQ ID NO: 7 para *Aspergillus niger*). En este documento también se divulga un kit con las sondas, cebadores y reactivos necesarios para la realización del método.

El documento D03 divulga un método para la detección de hongos. Al igual que en los documentos anteriores, el ADN se extrae de una muestra biológica (tejido, fluido corporal, alimentos o muestra ambiental); se amplifica mediante el uso de una pareja de cebadores que amplifican las regiones ITS (SEQ ID NO: 62 a SEQ ID NO: 64); y se identifican las distintas especies de hongos utilizando sondas marcadas, específicas para distintas especies/grupos/secciones de hongos (SEQ ID NO: 30 y 31 para *Aspergillus flavus*, SEQ ID NO: 32 para *Aspergillus fumigatus* y SEQ ID NO: 33 para *Aspergillus Niger*). En este documento también se divulga un kit con las sondas, cebadores y reactivos necesarios para la realización del método. En este documento, además se divulgan la pareja de oligonucleótidos reivindicados en la solicitud de patente, es decir, las SEQ ID NO: 4 y 5 de la solicitud que corresponden con las SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 64 del documento D03.

Las características de las reivindicaciones 1, 2, 5-8, 11 y 12 ya son conocidas de los documentos D01, D02 y D03, donde han sido divulgadas. Por lo tanto, a la vista del estado de la técnica, el objeto de la invención tal y como se recoge en dichas reivindicaciones, no es nuevo a la vista del estado de la técnica conocido en el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes y carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.

2. Actividad Inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

A la vista de lo que se conoce de los documentos D01 y D02 no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia utilizar la pareja de oligonucleótidos reivindicada (SEQ ID NO: 4 y 5) en el método de identificación de secciones del género *Aspergillus* para amplificar la región ITS de dichos hongos, ya que es conocido en el estado de la técnica el uso de dichos oligonucleótidos en este tipo de métodos. Por lo tanto, se considera que un experto en la materia utilizaría dichos oligonucleótidos en el método de la invención con una expectativa más que razonable de éxito.

Lo mismo sucede en el caso de que las sondas estén marcadas, de forma que presenten en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento *quencher*. El tipo de marcaje de la sonda reivindicado es simplemente una de varias posibilidades evidentes que un experto en la materia seleccionaría según las circunstancias, sin el ejercicio de actividad inventiva, para la detección de la hibridación de la sonda con la diana.

Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 3, 4, 9 y 10 no implica actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.