

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 205**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10834668 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2508617**

54 Título: **Kit y método para la identificación de la bacteria causante de la tiña de las uñas**

30 Prioridad:

04.12.2009 JP 2009276711

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2015

73 Titular/es:

**HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.
(100.0%)
408, Tashirodaikanmachi Tosu-shi
Saga 841-0017, JP**

72 Inventor/es:

**MAKIMURA, KOICHI;
MIYAJIMA, YOSHIHARU y
WATANABE, SHINICHI**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 542 205 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

Kit y método para la identificación de la bacteria causante de la tiña de las uñas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un kit y a un método para la identificación de los hongos causantes de la tiña ungueal (dermatofitosis de la uña), usando PCR en tiempo real.

Técnica anterior

10 La tiña ungueal está provocada por una infección fúngica de las uñas en más del 90% de los casos y, cuando es grave, conduce a una alteración de la coloración de las uñas a blanco o marrón amarillento, engrosamiento y separación del lecho de la uña. Existen varios hongos causantes de la tiña ungueal, la mayoría de los cuales son de dos especies, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (documento no de patente 1). El tratamiento de la tiña ungueal emplea fármacos antifúngicos orales tales como terbinafina, itraconazol y griseofulvina, y fármacos antifúngicos tópicos tales como fármacos a base de imidazol, a base de allilamina, a base de bencilamina y a base de ácido tiocarbámico. Sin embargo, la tiña ungueal es generalmente más difícil de curar que la tiña del pie (dermatofitosis del pie) o la tiña corporal (dermatofitosis del cuerpo), y un problema particular es que los fármacos antifúngicos tópicos existentes tienen una baja eficacia. Con el fin de mejorar el efecto curativo para la tiña ungueal, es esencial identificar rápidamente los hongos causantes y seleccionar de manera precisa un agente antifúngico.

15 Los métodos para el diagnóstico de la tiña, incluyendo la tiña ungueal, incluyen examen microscópico directo con KOH en el que se toma una muestra de la zona afectada de la uña o cutícula y se observa bajo un microscopio para confirmar la presencia o ausencia de elementos fúngicos, y métodos de cultivo en los que se cultiva la muestra durante varias semanas en un medio selectivo y se identifican las especies fúngicas observando la microestructura de colonias o células. Sin embargo, el diagnóstico mediante examen microscópico directo con KOH requiere destreza y básicamente no permite la identificación de especies fúngicas. Por otro lado, los métodos de cultivo permiten la identificación de especies fúngicas pero requieren largos periodos de tiempo, tales como varias semanas, tienen tasas de cultivos positivos bajas y requieren destreza para la identificación morfológica.

25 Otro método de diagnóstico para la tiña es, por ejemplo, uno en el que ARNm de actina de dermatofitos extraído de la lámina ungueal de un paciente con tiña ungueal se cuantifica mediante PCR en tiempo real y se intenta detectar el hongo de la tiña y estimar su volumen (documento no de patente 2). Sin embargo, este método no es conveniente desde el punto de vista de la manipulación porque la diana de detección es ARNm.

30 Como aún otro método de diagnóstico que permite una detección precisa de los hongos causantes de la enfermedad fúngica de la uña, se ha dado a conocer un método en el que se llevan a cabo una primera PCR y una PCR anidada (documento de patente 1). Sin embargo, este método requiere electroforesis y no es adecuado para el tratamiento de grandes cantidades de espécimen.

Lista de documentos citados

Bibliografía de patentes

35 [Documento de patente 1] Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada n.º 2008-067605

Bibliografía no de patente

[Documento no de patente 1] Nishimoto, S.: Shinkinshi (Japanese Journal of Medical Mycology) 47:103-111, 2006

[Documento no de patente 2] Tsuboi, R.: Rinpi (Japanese Journal of Clinical Dermatology) 57(5):94-97, 2003

40 Bergmans *et al.* (Clinical Microbiology And Infection 16(6):704-710, 2009) dan a conocer una PCR en tiempo real en un solo tubo para la detección e identificación de 11 especies de dermatofitos en material clínico.

Sumario de la invención

Problema técnico

45 La PCR en tiempo real puede usarse para la detección de virus y organismos patógenos. La PCR en tiempo real es un método en el que se llevan a cabo una amplificación de ADN mediante PCR y una detección del producto de amplificación mediante fluorescencia simultáneamente usando un dispositivo que integra tanto un termociclador como un detector de fluorescencia. El método es ventajoso porque no requiere confirmación del producto de amplificación mediante electroforesis, permitiendo obtener resultados de manera conveniente y rápida, y también tiene un riesgo bajo de contaminación. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún método para la detección e identificación sensibles y cuantitativas de los hongos causantes de la tiña ungueal mediante PCR en tiempo real.

50 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un kit y un método para la identificación de los hongos

causantes de la tiña ungueal, que permite una identificación rápida y precisa de un hongo causante mediante PCR en tiempo real usando un conjunto de cebadores y una sonda específicos para una especie fúngica.

Solución al problema

5 Como resultado de una investigación concienzuda dirigida hacia solucionar los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores han encontrado que pueden identificarse de manera rápida y precisa los hongos causantes de la tiña ungueal mediante PCR en tiempo real usando un conjunto de cebadores y sondas específicos para la región ITS1 en el ADN ribosómico de los hongos causantes de la tiña ungueal, y han completado esta invención.

10 Específicamente, la invención proporciona un kit de identificación para la identificación de los hongos causantes de la tiña ungueal usando PCR en tiempo real, que comprende un conjunto de cebadores y sondas, en el que el conjunto de cebadores es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, y en el que las sondas comprenden una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 y una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6.

20 Con un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, es posible amplificar la longitud completa de la región ITS1 de ADN ribosómico (aproximadamente 350 pb) que es universal para los hongos, y con un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4 es posible amplificar específicamente una parte de la región ITS1 de ADN ribosómico (aproximadamente 150 pb) de los principales hongos causantes, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

25 Con una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5, es posible detectar específicamente la región ITS1 de ADN ribosómico de *Trichophyton mentagrophytes*, y con una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6 es posible detectar específicamente la región ITS1 de ADN ribosómico de *Trichophyton rubrum*.

30 Por tanto, con un kit de identificación de la invención es posible identificar de manera rápida y precisa *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, que son los principales hongos causantes de la tiña ungueal.

35 La invención también proporciona un método para identificar los hongos causantes de la tiña ungueal, que comprende una etapa de extraer ADN total de una muestra de uña tomada de un sujeto, una etapa de preparar un conjunto de cebadores y sondas específicos para la región ITS1 de ADN ribosómico de un hongo causante de la tiña ungueal, y una etapa de amplificar la región ITS1 de ADN ribosómico de los hongos causantes de la tiña ungueal a partir del ADN total extraído usando PCR en tiempo real mediante el conjunto de cebadores, al tiempo que se detecta simultáneamente el ADN amplificado mediante las sondas, e identificar las especies fúngicas. Según el método de identificación de la invención, es posible identificar de manera rápida y precisa hongos causantes de la tiña ungueal.

40 En el método de identificación de la invención, el conjunto de cebadores es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4. Con un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, es posible identificar una gama más amplia de los hongos causantes, y con un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, es posible identificar de manera precisa y eficaz los 2 principales hongos causantes de la tiña ungueal, concretamente *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. El conjunto de cebadores también puede usarse como una combinación de 2 tipos diferentes, dependiendo del propósito.

50 En el método de identificación de la invención, las sondas comprenden una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 y una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6. Las sondas son una combinación de 2 tipos diferentes con los que es posible identificar simultáneamente 2 especies fúngicas diferentes mediante un único procedimiento de PCR en tiempo real.

55 Efectos ventajosos de la invención

El kit de identificación y el método de identificación de la invención no requieren un alto nivel de destreza ni un tiempo de cultivo de varias semanas, a diferencia del examen microscópico directo con KOH o los métodos de

cultivo convencionales, y por tanto permiten una identificación más conveniente y rápida de los hongos causantes de la tiña ungueal. Además, se mejoran la eficacia cuantitativa, la precisión de detección y la especificidad de especies fúngicas incluso en comparación con la identificación mediante PCR anidada convencional y, dado que no es necesaria una electroforesis, es posible acortar significativamente el tiempo requerido.

5 Descripción de realizaciones

El método de identificación de la invención comprende una etapa de extraer ADN total de una muestra de uña tomada de un sujeto, una etapa de preparar un conjunto de cebadores y una sonda específicos para la región ITS1 de ADN ribosómico de un hongo causante de la tiña ungueal, y una etapa de amplificar la región ITS1 de ADN ribosómico del hongo causante de la tiña ungueal a partir del ADN total extraído usando PCR en tiempo real mediante el conjunto de cebadores, al tiempo que se detecta simultáneamente el ADN amplificado mediante las sondas, e identificar las especies fúngicas.

Los hongos causantes de la tiña ungueal incluyen *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Arthroderma vanbreuseghemii*, *Arthroderma benhamiae*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum*. Dado que *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* constituyen más del 90% de los hongos causantes de la tiña ungueal aislados, la capacidad para identificar estas 2 especies fúngicas es altamente significativa para el tratamiento de la tiña ungueal.

El método de identificación de la invención usa como espécimen una uña humana de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene tiña ungueal. El espécimen de uña puede tomarse cortando, usando unas pinzas o un cortaúñas. La cantidad de espécimen de uña puede ser tal como para permitir la extracción de una cantidad suficiente de ADN como molde para PCR en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real). El grosor y la humedad de la uña pueden variar, pero puede tomarse un área de aproximadamente 2 x 2 mm o una cantidad de aproximadamente 5-10 mg.

La extracción del ADN total del espécimen de uña puede realizarse mediante un método común, tal como pulverización de la uña con un triturador de perlas y esterilización mediante ebullición a 100°C durante 10 minutos, seguido por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Si es necesario, el ADN total extraído puede cuantificarse usando un kit de cuantificación de ácido nucleico disponible comercialmente.

El conjunto de cebadores que va a usarse para el método de identificación de la invención es específico para la región ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*, espaciador transcrito interno 1) en ADN ribosómico de los hongos causantes de la tiña ungueal. La región ITS1 es una región no transcrita que tiene una secuencia de ADN más diversificable en la evolución de la especie que otras regiones que se transcriben (tales como la región 28S) y, por tanto, se cree que es una secuencia que mantiene una alta especificidad para las especies fúngicas. Un experto en la técnica puede diseñar apropiadamente un conjunto de cebadores basándose en la secuencia de nucleótidos de la región ITS1 en ADN ribosómico de los hongos causantes de la tiña ungueal, usando el método descrito en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª Ed.) Cold Spring Harbor University Press, por ejemplo. La longitud de los cebadores es preferiblemente de 15-30 pb y más preferiblemente de 18-25 pb, y el contenido en GC es preferiblemente del 40-60% y de manera más preferible aproximadamente del 50%. El valor de Tm se ajusta preferiblemente para que sea de 5°C a 10°C mayor que la temperatura de apareamiento por PCR deseada y, puesto que la temperatura de apareamiento es preferiblemente de 60°C a 65°C para el método de identificación de la invención, el valor de Tm es preferiblemente de 65°C a 70°C. La longitud de la secuencia de ADN que va a amplificarse mediante el conjunto de cebadores puede ser de 50-400 pb, y preferiblemente no es mayor de aproximadamente 150 pb.

Con el fin de identificar una gama amplia de especies fúngicas, se prefiere usar un conjunto de cebadores que es complementario a una secuencia específica en la región ITS1 de ADN ribosómico fúngico, y que amplifica específicamente la región ITS1 de ADN ribosómico que es universal para los hongos. Un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 (dermaF) y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2 (dermaR) permite la amplificación de la longitud completa (aproximadamente 350 pb) de la región ITS1 de ADN ribosómico de la mayoría de los hongos.

Por otro lado, para una detección e identificación eficaces dirigidas hacia *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, que son los principales hongos causantes que constituyen más del 90% de los hongos causantes de la tiña ungueal, se prefiere usar un conjunto de cebadores específico limitado a estas especies fúngicas. Un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 (dermaF2) y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4 (dermaR2) permite la amplificación específica de una parte (aproximadamente 150 pb) de la región ITS1 de ADN ribosómico de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Además, *Arthroderma vanbreuseghemii* y *Arthroderma simii*, que pertenecen al mismo grupo I en el sistema filogenético que *Trichophyton mentagrophytes*, también se amplifican mediante este conjunto de cebadores. Dado que el producto de amplificación de este conjunto de cebadores tiene una secuencia más corta que el producto de amplificación de un conjunto de cebadores universal, puede acortarse el tiempo requerido para una PCR en tiempo real, y puede realizarse una identificación de los principales hongos

causantes de la tiña ungueal de manera precisa y eficaz.

SEQ ID NO: 1: 5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3'

SEQ ID NO: 2: 5'-TCGCTGCGTTCTTCATCGA-3'

SEQ ID NO: 3: 5'-SSCCCCATTCTTGTCTACMTYAC-3'

5 SEQ ID NO: 4: 5'-AACGCTCAGACTGACAGCTCTTC-3'

Las sondas que van a usarse para el método de identificación de la invención son específicas para la región ITS1 en ADN ribosómico de los hongos causantes de la tiña ungueal. Un experto en la técnica puede encontrar y diseñar una sonda específica para una especie fúngica basándose en la secuencia de la región ITS1 en ADN ribosómico de diferentes hongos causantes de la tiña ungueal, usando un método conocido tal como el método de Wootton *et al.*, por ejemplo (Federhen S., Analysis of compositionally biased regions in sequence databases. Methods Enzymol. 1996; 266:554-71). La longitud de la sonda no está restringida particularmente y puede variar dependiendo de la longitud de la secuencia de nucleótidos de la región específica y del contenido en GC y el valor de Tm, pero es preferiblemente un 10-50-mero. La Tm de la sonda es preferiblemente mayor que la Tm del cebador, y más preferiblemente es aproximadamente 10°C mayor. Para una mayor Tm y mayor especificidad, puede unirse a la misma un MGB (*Minor Groove Binder*, agente de unión al surco menor, producto de Applied Biosystems, Japón).

Una sonda que se hibrida específicamente con la región ITS1 en ADN ribosómico de *Trichophyton mentagrophytes* es la que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5. Con esta sonda es posible identificar de manera precisa si una especie es *Trichophyton mentagrophytes* o no. *Arthroderma vanbreuseghemii*, que es una generación sexual de *Trichophyton mentagrophytes*, también puede detectarse con esta sonda, y dado que ambas tienen los mismos síntomas clínicos y el mismo método de tratamiento, no existe la necesidad de una diferenciación e identificación adicionales entre las mismas en la práctica clínica. Una sonda que se hibrida específicamente con la región ITS1 en ADN ribosómico de *Trichophyton rubrum* es la que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6. Con esta sonda es posible identificar de manera precisa si una especie es *Trichophyton rubrum* o no. *Trichophyton violaceum* también se hibrida con esta sonda. Estas dos especies pueden diferenciarse comparando las secuencias de nucleótidos de las regiones ITS1 (n.ºs de registro de GeneBank AB520840 y AB194246) (por ejemplo, secuenciando los productos de amplificación por PCR), pero dado que *Trichophyton violaceum* es un hongo causante de la tiña ungueal muy poco frecuente, esencialmente no es necesario distinguirlos e identificarlos en la práctica clínica. Además, una sonda que se hibrida específicamente con la región ITS1 en ADN ribosómico de todos los hongos es la que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7. Esta sonda permite la detección de hongos superficiales entre una gama amplia y la cuantificación permite confirmar la cantidad total de hongos superficiales o la proporción de los hongos causantes de la tiña ungueal de los hongos totales.

SEQ ID NO: 5: 5'-CTCTCTTTAGTGGCTAAAC-3'

SEQ ID NO: 6: 5'-CGCGCTCCCCCTGC-3'

SEQ ID NO: 7: 5'-TTYAACAAAYGGATCTCT-3'

Las sondas que van a usarse en el método de identificación de la invención deben marcarse para la detección mediante PCR en tiempo real. Un experto en la técnica puede seleccionar la sonda marcada según lo desee dependiendo del sistema de PCR en tiempo real, pero preferiblemente se usa la sonda TaqMan™. La sonda TaqMan™ es una sonda marcada con un colorante fluorescente en el extremo 5' y con un extintor y MGB (agente de unión al surco menor) en el extremo 3', de la secuencia de nucleótidos que se hibrida específicamente con el ADN diana. El colorante fluorescente puede ser FAM™, VIC™, NED™, JOE™, TAMRA™, Cy-3, ROX™, Texas Red™, Cy-5 o similares.

La sonda TaqMan™, en su estado original, tiene un extintor en la sonda, y por tanto se inhibe la emisión de fluorescencia incluso cuando se irradia con luz de excitación. Sin embargo, en la reacción de amplificación por PCR en tiempo real, la sonda TaqMan™ se hibrida específicamente con ADN de molde en la etapa de apareamiento, y cuando la sonda TaqMan que se ha hibridado con el molde se descompone por la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq ADN polimerasa durante la etapa de reacción de extensión, el colorante fluorescente se libera de la sonda y se elimina la inhibición por el extintor dando como resultado emisión de fluorescencia, que se detecta con el sistema de PCR en tiempo real. Dado que la intensidad de fluorescencia detectada depende del número de copias de ADN diana en la muestra, el ADN del hongo en el espécimen puede cuantificarse de este modo.

Según la invención, es posible seleccionar un conjunto de cebadores y sondas adecuados para el propósito. Para confirmar los principales hongos causantes, se prefiere el uso de una combinación de un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, y sondas que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Para la identificación de una gama amplia de hongos incluyendo hongos causantes poco frecuentes, se prefiere el uso de una combinación de un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia

de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y sondas que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. En lugar de un sistema que usa un conjunto de cebadores y una sonda (sistema sencillo), puede realizarse una identificación simultánea de múltiples especies fúngicas usando un sistema con múltiples conjuntos de cebadores y múltiples sondas (sistema múltiple). Con este tipo de sistema múltiple, los cebadores y las sondas pueden interferir potencialmente unos con otros y reducir la sensibilidad de detección, y por tanto deben investigarse las razones de mezclado y las concentraciones de los cebadores y las sondas usados.

La identificación de las especies de los hongos causantes puede llevarse a cabo de la siguiente manera. Para un sistema sencillo, cuando se ha detectado el colorante fluorescente liberado de la sonda, se considera que el hongo causante que está sometándose a prueba es una especie fúngica para la que es específica la sonda, y cuando no se ha detectado el colorante fluorescente, se considera que el hongo causante que está sometándose a prueba no es una especie fúngica para la que es específica la sonda. Para un sistema múltiple, dado que las diferentes sondas se marcan con diferentes colorantes fluorescentes, el tipo de colorante fluorescente detectado se usa como base para determinar que el hongo causante sometido a prueba es una especie fúngica para la que es específica la sonda marcada con ese colorante fluorescente. También puede usarse una sustancia patrón interna (control interno) para excluir falsos negativos debido a un fallo de extracción o purificación de ADN. Un experto en la técnica puede seleccionar y modificar de manera apropiada el control interno y, por ejemplo, un control interno para ARN, desarrollado por Vollmer *et al.* (Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. J Clin Microbiol. Junio de 2008; 46(6): 1919-26. Publicación electrónica del 2 de abril de 2008) puede modificarse para dar uno para ADN.

El kit de identificación de la invención es un kit de identificación que comprende un conjunto de cebadores y sondas, para la identificación de los hongos causantes de la tiña ungueal usando PCR en tiempo real. El conjunto de cebadores es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de cebadores que comprenden un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y conjuntos de cebadores que comprenden un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, y las sondas comprenden la sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 y la sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6.

El kit de identificación de la invención también puede incluir, además del conjunto de cebadores y la sonda específicos mencionados anteriormente, reactivos incluidos generalmente en kits de PCR en tiempo real, tales como ADN polimerasa, dNTP, tampón y molde de control positivo. Desde el punto de vista de la conveniencia de uso, los reactivos para PCR y detección de fluorescencia se proporcionan preferiblemente como una mezcla con todos en cantidades apropiadas.

El kit de identificación de la invención contiene una combinación de un conjunto de cebadores y sondas adecuados para el objeto de identificación. Un kit usado para la identificación de los principales hongos causantes de la tiña ungueal es una combinación de un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, y sondas que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Un kit usado para la identificación de hongos causantes poco frecuentes contiene un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

Se prefiere un kit de identificación que contiene múltiples conjuntos de cebadores y sondas ya que permite la identificación de múltiples hongos causantes mediante un único procedimiento de PCR en tiempo real. En este caso, con el fin de evitar la reducción en la sensibilidad de detección por una interferencia entre los conjuntos de cebadores o sondas, el kit contiene preferiblemente los conjuntos de cebadores y sondas en las razones de mezclado y las concentraciones óptimas determinadas mediante un control positivo.

Ejemplos

Ahora se explicará la presente invención más detalladamente con referencia a ejemplos, entendiendo que no pretende limitarse la invención a estos ejemplos.

(Ejemplo 1) Especificidad para especies fúngicas de conjuntos de cebadores y sondas

Se usaron conjuntos de cebadores y sondas específicos para la secuencia de la región ITS1 en el ADN ribosómico de los hongos causantes de la tiña ungueal para PCR en tiempo real, para examinar la especificidad para especies fúngicas. Se usaron dos conjuntos de cebadores diferentes, (1) un conjunto de cebadores que consistía en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2 (dermaF/dermaR), y (2) un conjunto de cebadores que consistía en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4 (dermaF2/dermaR2). El conjunto de cebadores usado para el control interno era un conjunto de cebadores que consistía en un cebador que comprende la

secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 8 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9 (MS2-TM3-F/MS2-TM3-R). Todos los cebadores se adquirieron de Sigma Aldrich Japan, KK.

dermaF: 5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3'

5 dermaR: 5'-TCGCTGCGTTCTTCATCGA-3'

dermaF2: 5'-SSCCCCATTCTTGTCTACMTYAC-3'

dermaR2: 5'-AACGCTCAGACTGACAGCTCTTC-3'

MS2-TM3-F: 5'-GGCTGCTCGCGGATACCC-3'

MS2-TM3-R: 5'-TGAGGGAATGTGGGAACCG-3'

10 Se usaron tres sondas diferentes, (1) sonda TaqMan™ marcada con colorante fluorescente FAM™ en el extremo 5' y con NFQ y MGB en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 (TME-ITS1F), (2) sonda TaqMan™ marcada con colorante fluorescente VIC™ en el extremo 5' y con NFQ y MGB en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6 (TRU-ITS1V) y (3) sonda TaqMan™ marcada con colorante fluorescente NED™ en el extremo 5' y con NFQ y MGB en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 7 (FU-ITS1N). (4) Como sonda para el control interno se usó sonda TaqMan™ marcada con colorante fluorescente Cy5 en el extremo 5' y con BHQ3 en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10 (MS2-TM2-Cy5). NFQ (Non-fluorescent Quencher™) y BHQ3 (Black Hole Quencher 3™) son ambos extintores no fluorescentes. Se adquirieron las sondas de Applied Biosystems, Japón y Sigma Aldrich Japan, KK.

TME-ITS1F: 5'-[FAM]-CTCTCTTTAGTGGCTAAAC-[NFQ-MGB]-3'

20 TRU-ITS1V: 5'-[VIC]CGCGCTCCCCCTGC-[NFQ-MGB]-3'

FU-ITS1N: 5'-[NED]TTYAACAAYGGATCTCT-[NFQ-MGB]-3'

MS2-TM2-Cy5: 5'-[Cy5]-ACCTCGGGTTTCCGTCTTGCTCGT-[BHQ3]-3'

25 Se obtuvo una variedad de flora residente que incluía dermatofitos de diferentes colecciones microbianas. Se cultivaron las cepas fúngicas mediante métodos de cultivo comunes y se extrajo el ADN total mediante el método de fenol/cloroformo. Se cuantificó el ADN total con un kit de cuantificación Qubit de Invitrogen Corp., y se usaron 0,3 pg (una cantidad correspondiente a aproximadamente 100 copias del gen de ADN ribosómico) como molde para PCR en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real 7500Fast (Applied Biosystems, Japón). La composición de la mezcla de reacción (19 µl x 50 porciones de reacción) era la siguiente. Se dispensó una porción de 19 µl en cada pocillo y se añadió en cada caso 1 µl del ADN extraído.

Agua	357 µl
Cebadores (30 µM) x 4	6,5 µl x 4
Colorante de referencia ROX II	20 µl
Sondas (aproximadamente 15 µM) x 4	20 µl x 4
Premezcla	500 µl
Total	950 µl

30 Se llevó a cabo el procedimiento para el sistema de PCR en tiempo real según el manual del fabricante. El mantenimiento inicial fue a 95°C durante 30 segundos y la reacción de PCR se llevó a cabo durante 60 ciclos de 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 30 segundos. Los resultados de la PCR en tiempo real se muestran en la tabla 1. Los resultados con amplificación (positivos) se indican mediante "+" y los resultados sin amplificación (negativos) se indican como "-".

35 [Tabla 1]

Pares de cebadores	DermaF/dermaR			DermaF2/dermaR 2	
	FU-ITS1N	TRU-ITS1V	TME-ITS1F	TRU-ITS1V	TME-ITS1F
Sondas					
Dermatofitos					
<i>Trichophyton rubrum</i> T99	+	+	-	+	-
<i>Trichophyton rubrum</i> T108	+	+	-	+	-
<i>Trichophyton rubrum</i> 4-21 (Hasegawa)	+	+	-	+	-
<i>Trichophyton rubrum</i> 4-23 (Hasegawa)	+	+	-	+	-
<i>Trichophyton rubrum</i> 4-25 (Hasegawa)	+	+	-	+	-
<i>Trichophyton rubrum</i> 4-26 (Hasegawa)	+	+	-	+	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> T7	+	-	+	-	+

<i>Trichophyton mentagrophytes</i> T9	+	-	+	-	+
<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> TIMM2789	+	-	+	-	+
<i>Trichophyton tonsurans</i> T117	+	-	-	-	-
<i>Arthroderma benhamiae</i> SM103	+	-	-	-	-
<i>Microsporum canis</i> TDGS945	+	-	-	-	-
<i>Microsporum canis</i> TDGS0222	+	-	-	-	-
<i>Microsporum canis</i> TDGS0223	+	-	-	-	-
<i>Microsporum canis</i> TDGS0269	+	-	-	-	-
<i>Microsporum gypseum</i> TDGS0009	+	-	-	-	-
<i>Microsporum gypseum</i> TDGS0012	+	-	-	-	-
<i>Epidermophyton floccosum</i> 5-14 (Hasegawa)	+	-	-	-	-
<i>Epidermophyton floccosum</i> 5-22 (Hasegawa)	+	-	-	-	-
Otros hongos patógenos					
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	+	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> TIMM1768	+	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC90028	+	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i> ATCC90030	+	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i> CBS138	+	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> ATCC750	+	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> TLCS S 9/1	+	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC2209	+	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC90018	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> TIMM0108	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> JCM10253	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> TIMM2920	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i> TIMM0059	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i> TIMM2935	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> TIMM0113	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> TIMM2915	+	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i> TIMM3182	+	-	-	-	-
<i>Pseudallescherichia boydii</i> TIMM0886	+	-	-	-	-
<i>Fusarium oxisporum</i> TSY-0351	+	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i> TSY-0403	+	-	-	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i> TSY-0219	+	-	-	-	-
<i>Chaetomium globosum</i> TSY-0369	+	-	-	-	-
<i>Exophiala jeanselmei</i> TSY-0396	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC90113	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> TJane	+	-	-	-	-
<i>Trichosporon asahii</i> CBS2479	+	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i> TIMM0921	+	-	-	-	-

Basándose en la tabla 1, se detectaron una gama amplia de hongos en este sistema de detección con los cebadores dermaF/dermaR y la sonda FU-ITS1N, que amplifican la longitud completa de la región ITS1. También, con dermaF/dermaR o dermaF2/dermaR2 y el conjunto de sondas, se detectaron específicamente tanto *Trichophyton mentagrophytes* como *Trichophyton rubrum*. Las sondas específicas para especies fúngicas sólo reaccionaron con las especies fúngicas específicas y no reaccionaron en absoluto con otras especies fúngicas (100% específicas para especies).

5

(Ejemplo 2) Sensibilidad de detección en PCR en tiempo real

Se usaron un conjunto de cebadores y una sonda específicos para la secuencia de la región ITS1 en el ADN ribosómico de los hongos causantes de la tiña ungueal para examinar la sensibilidad de detección del método de identificación de la invención. Como controles positivos se usaron las regiones ITS1 de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus fumigatus*, clonadas en el vector pCR2.1 incluido en el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen Corp. Se diluyó la concentración del molde para determinar el límite inferior de sensibilidad de detección.

10

En el sistema de detección, se confirmó la reproducibilidad mediante 4 repeticiones repetidas para cada concentración. Los resultados se muestran en la tabla 2. Una única amplificación se indica mediante “+” y amplificaciones que se produjeron para las 4 mediciones se indican mediante “++++”.

15

[Tabla 2]

Pares de cebadores	DermaF/dermaR			DermaF2/dermaR2	
Sondas	FU-ITS1N	TRU-ITS1V	TME-ITS1F	TRU-ITS1V	TME-ITS1F

Número de copias de ADN					
400	++++	++++	++++	++++	++++
200	++++	++++	++++	++++	++++
100	++++	++++	++++	++++	++++
50	++++	++++	++++	++++	++++
25	++++	+	++++	++++	++++
13	++++	++	++++	+++	++++
6	+++	+	+++	+	++++
3	+++	-	+++	-	+++

En regiones con molde muy diluido, se aplica un modelo de amplificación por PCR probabilístico (proceso de Poisson) que implica un tiempo limitado y un pequeño número de moléculas, y esto se muestra mediante un valor probabilístico, o factor de detectabilidad, en lugar de negativo/positivo. Aunque el valor variará dependiendo del sistema de detección y la situación, se aplica un 90-95% como el límite para la sensibilidad de detección en un sistema de detección por PCR en tiempo real común y, por tanto, en este sistema de detección, se tomó la concentración de molde detectada al 100% como la sensibilidad de detección mínima. En este sistema de detección, de 3 a 50 copias de molde de ADN ribosómico produjeron resultados del 100% de amplificación. Dado que esto corresponde a 1-2 células de hongos tales como las especies *Trichophyton*, se presupone que es una sensibilidad adecuada para su uso en la práctica. Además, se encontró que esta sensibilidad de detección era una sensibilidad de 2 a 166 veces mayor que con PCR anidada, que requiere 100-500 copias.

(Ejemplo 3 Ensayo clínico usando el método de identificación de la invención)

Se observaron directamente pacientes de dermatología con onicomicosis no tratada por parte de un médico especialista usando un microscopio y se confirmó la presencia o ausencia de infección. Se desinfectaron con etanol las uñas de pacientes que se había confirmado que tenían infección y luego se tomó una muestra del extremo distal de cada uña cortando con pinzas o un cortaúñas. Se trituraron las muestras de uñas con un triturador de múltiples perlas (disruptor celular) (Yasui Kikai Corp.) y se sometieron a ebullición durante 10 minutos a 100°C en tampón para hongos filamentosos (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 25 mM, SDS al 0,5%, NaCl 250 mM), y luego se sometieron a extracción con fenol/cloroformo seguido por precipitación con etanol para la extracción del ADN. Se disolvió una porción de 50 µl del ADN en agua ultrapura y se almacenó. Se usó una porción de 25 µl de la disolución que contenía ADN obtenida como muestra de ADN de molde para PCR en tiempo real de la misma manera que en el ejemplo 1, junto con un control positivo de concentración conocida.

Los resultados se muestran en la tabla 3. En la tabla, C_T son los datos obtenidos de la curva de amplificación y representan el número de ciclos de PCR correspondientes al valor umbral fijado. La cantidad de molde puede estimarse cuantitativamente a partir de C_T mediante o bien el método de la curva de calibración o el método de C_T comparativo. En este caso se usó el método de C_T comparativo, que es adecuado para grandes cantidades de espécimen, y se calculó el número de moldes a partir del mismo. El método de C_T comparativo asume una eficacia de PCR del 100% y se estima el número de moldes utilizando la diferencia en C_T con respecto a un control positivo conocido. Este método tiene la desventaja de un error cuantitativo debido a diferencias en la eficacia de amplificación, pero se considera que el problema es despreciable para PCR que presenta un comportamiento logarítmico. Tras confirmarse la eficacia de amplificación para los especímenes clínicos con software LinRegPCR (Ruijter JM *et al.*, Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic Acids Res. Abril de 2009; 37(6):e45. Publicación electrónica del 22 de febrero de 2009), no se encontró prácticamente ninguna diferencia, y por tanto se consideró que la eficacia de amplificación usando el método de C_T comparativo no era de un nivel problemático y permitía estimar el número de copias de molde.

Se aplicó el método de identificación de la invención para uñas de 7 individuos sanos y, dado que sólo se detectó un máximo de aproximadamente 100 copias de molde fúngico, se asumió que aproximadamente 100 copias residen normalmente y, por tanto, se usaron valores superiores a éste para el diagnóstico de la tiña ungueal. También se creía que este nivel era apropiado porque las cantidades de molde detectadas en especímenes clínicos reales estaban todas muy por encima de 100 copias.

Según la tabla 3, todos los especímenes de tiña ungueal en 33 casos que se consideraron positivos mediante observación microscópica directa por parte de un médico especialista se diagnosticaron como positivos mediante el método de identificación de la invención (precisión de detección: 100%). Por otro lado, se identificaron 15 especímenes como especies fúngicas mediante cultivo, de los que 13 coincidían con los resultados de determinación del método de identificación de la invención. Se cree que los 2 casos no coincidentes pueden haberse identificado erróneamente en el cultivo, dado que el método de identificación de la invención tiene una especificidad para especies del 100%. Por tanto, la identificación de especies fúngicas mediante cultivo fue del 39% mientras que la precisión de identificación según la invención fue del 100%. Además, los 16 casos restantes que no pudieron identificarse como especies fúngicas mediante cultivo se identificaron todos como especies fúngicas. Sin embargo, cuando se aplicó el método de identificación de la invención a uñas sanas, no se detectó absolutamente ninguna señal para especies *Trichophyton* (los 7 casos), lo que indica una ausencia de resultados falsos positivos. En la tabla 3, TR representa *Trichophyton rubrum*, TM representa *Trichophyton mentagrophytes*, ND representa "no detectado"

ES 2 542 205 T3

e ITS1 indica que no se hizo ninguna identificación a pesar de la aparición de una banda de amplificación.

[Tabla 3]

Especimen (n.º)	Observaciones del médico			Valoración en RT-PCR	DermaF/dermaR			DermaF2/dermaR2	
	Examen microscópico	Cultivo	PCR ordinaria		FU-ITS1N	TME-ITS1F	TRU-ITS1V	TME-ITS1F	TRU-ITS1V
47	+	-	ND	TR	64	-	195	-	6250
49	+	-	ND	TR	25000	-	200000	-	400000
54	+	no identificable	TR	TR	391	-	3125	-	6250
60	+	TR	TR	TR	50000	-	100000	-	400000
64	+	TR	TM	TM	3125	1563	-	50000	-
66	+	-	ITS1	TR	12500	-	25000	-	391
68	+	CA	ND	TR	12500	-	50000	-	200000
71	+	TM	TM	TM	3125	125000	-	100000	-
86	+	-	ND	TR	195	-	781	-	125000
95	+	-	ND	TR	391	-	781	-	125000
110	+	crecimiento escaso	TM	TM	49	98	-	3125	-
114	+	TR	TM	TM	3125	6250	-	100000	-
118	+	-	ND	TR TM	49	12	48	98	391
121	+	TR	TR TM	TR	24	-	98	-	781
130	+	-	ND	TR	98	-	781	-	125000
140	+	-	ND	TR	125000	-	12500	-	50000
142	+	TR	TR TM	TR	49	-	-	-	49
146	+	-	ND	TR	781	-	781	-	6250
154	+	-	ND	TR	20000	-	80000	-	20000
164	+	-	ND	TR	3125	-	6250	-	6250
167	+	TR	TR	TR	24	-	24	-	98
170	+	-	ND	TR	781	-	391	-	3125
172	+	TR	TR	TR	3125	-	3125	-	50000
175	+	TR	TR	TR	100000	-	100000	-	100000
178	+	TR	TR TM	TR	49	-	12	-	781
182	+	TR	TR TM	TR	25000	-	25000	-	100000
185	+	-	ND	TR TM	1563	-	1563	98	3125
191	+	-	ND	TR	98	-	98	-	391
195	+	TR	TR	TR	1563	-	3125	-	100000
206	+	-	ND	TR	3	-	-	-	391
210	+	TR	TR	TR	3125	-	3125	-	50000
230	+	-	ND	TR	50000	-	25000	-	25000
237	+	TR	TR	TR	25000	-	25000	-	25000
Negativo					-	-	-	-	-
Positivo					100000	100000	100000	100000	100000

Los resultados de identificación especímenes de hongos causantes de la tiña del pie mediante el mismo método se muestran en la tabla 4.

5 [Tabla 4]

Especimen (n.º)	Observaciones del médico			Valoración en RT-PCR	DermaF/dermaR			DermaF2/dermaR2	
	Examen microscópico	Cultivo	PCR ordinaria		FU-ITS1N	TME-ITS1F	TRU-ITS1V	TME-ITS1F	TRU-ITS1V
49 uña	+	TR	TR	TR	50000	-	100000	-	400000
49 piel	+	-	ND	TR	49	-	195	-	781
56 uña	+	TM	TM	TM	3125	125000	-	100000	-
56 piel	+	TM	TM	TM	25000	25000	-	100000	-
69 uña	+	-	ND	TR	195	-	781	-	12500
69 piel	+	-	ITS1	TR	3125	-	50000	-	200000

88 uña	+	crecimiento escaso	TM	TM	49	98	-	3125	-
88 piel	+	TM	TM	TM	195	195	-	1563	-
91 uña	+	TR	TM	TM	3125	6250	-	100000	-
91 piel	+	TM	TM	TM	6250	6250	-	25000	-
95 uña	+	-	ND	TR	391	-	781	-	125000
95 piel	+	TM	TM	TM	1563	1563	-	25000	-
121 uña	+	TR	TR TM	TR	24	-	98	-	781
121 piel	+	-	ND	TR	781	-	781	-	6250
127 uña	+	-	ND	TR	20000	-	80000	-	20000
127 piel	+	-	ND	TR TM	12500	12500	1563	100000	100000
143 uña	+	-	ND	TR	781	-	391	-	3125
143 piel	+	TR	TR	hongo	24	-	-	-	781
145 uña	+	TR	TR	TR	3125	-	3125	-	50000
145 piel	+	TR	TR	TR	3125	-	50000	-	400000
Negativo					-	-	-	-	-
Positivo					100000	100000	100000	100000	100000

Aplicabilidad industrial

Según el método de identificación de la invención, es posible identificar de manera rápida y precisa hongos causantes de la tiña ungueal, y proporcionar datos eficaces sobre los hongos causantes para el desarrollo de ciclos de tratamiento, y por tanto la aplicabilidad industrial es significativa.

5 Lista de secuencias

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Kit y método para identificar los hongos causantes de la tiña ungueal

10 <130> 1407-PCT

<150> documento JP 2009-276711

<151> 04-12-2009

15 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

20 <211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Cebador directo

<400> 1

taacaagggtt tccgtaggtg aacct

25

30 <210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Cebador inverso

<400> 2

tcgctgcggtt cttcatcga

19

40 <210> 3

<211> 23

<212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo	
5	<400> 3	
	ssccccattc ttgtctacmt yac	23
	<210> 4	
10	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador inverso	
	<400> 4	
	aacgctcaga ctgacagctc ttc	23
20	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> sonda para <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	
	<400> 5	
30	ctctcttttag tggctaaac	19
	<210> 6	
	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> sonda para <i>Trichophyton rubrum</i>	
	<400> 6	
40	cgcgctcccc ctgc	14
	<210> 7	
	<211> 17	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda universal para hongos	
50	<400> 7	
	ttyaacaayg gatctct	17
	<210> 8	
	<211> 18	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo	
60	<400> 8	
	ggctgctcgc ggataccc	18
	<210> 9	
65	<211> 19	
	<212> ADN	

<213> Artificial
<220>
<223> Cebador inverso
5
<400> 9
tgagggaatg tgggaaccg **19**

<210> 10
10 <211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
15 <223> sonda

<400> 10
acctcgggtt tccgtcttgc tcgt **24**

REIVINDICACIONES

1. Kit de identificación para la identificación de los hongos causantes de la tiña ungueal usando PCR en tiempo real, que comprende un conjunto de cebadores y sondas,
- 5 en el que el conjunto de cebadores es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, y
- 10 en el que las sondas comprenden una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 y una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6.
2. Método para identificar los hongos causantes de la tiña ungueal, que comprende:
- una etapa de extraer ADN total de una muestra de uña tomada de un sujeto,
- una etapa de preparar un conjunto de cebadores y sondas específicas para la región ITS1 de ADN ribosómico de un hongo causante de la tiña ungueal, y
- 15 una etapa de amplificar la región ITS1 de ADN ribosómico del hongo causante de la tiña ungueal a partir del ADN total extraído usando PCR en tiempo real mediante el conjunto de cebadores, al tiempo que se detecta simultáneamente el ADN amplificado mediante las sondas, e identificar las especies fúngicas;
- 20 en el que el conjunto de cebadores es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y un conjunto de cebadores que consiste en un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, y
- 25 en el que las sondas comprenden una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 que se hibrida específicamente con la región ITS1 en ADN ribosómico de *Trichophyton mentagrophytes*, y una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6 que se hibrida específicamente con la región ITS1 en ADN ribosómico de *Trichophyton rubrum*.