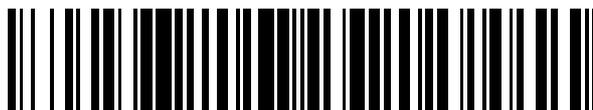


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 452**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2013 E 13756524 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2877590**

54 Título: **Método de diagnóstico in vitro de una micosis invasiva por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF**

30 Prioridad:

26.06.2012 FR 1201796

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

15.07.2016

73 Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER REGIONAL
UNIVERSITAIRE DE LILLE (25.0%)
2, avenue Oscar Lambret
59037 Lille Cédex, FR;
UNIVERSITÉ DE DROIT ET SANTÉ DE LILLE
(25.0%);
UNIVERSITÉ SCIENCES TECHNOLOGIES LILLE
(25.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**POULAIN, DANIEL;
SENDID, BOUALEM;
GUERARDEL, YANN y
FRANCOIS, NADINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 577 452 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

Método de diagnóstico *in vitro* de una micosis invasiva por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de una micosis invasiva por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF. El método de la invención permite, de igual forma, cuantificar un compuesto de interés que esté contenido en la muestra y utilizarlo como marcador para el diagnóstico de una micosis invasiva. Las levaduras como *C. albicans* a menudo están presentes en las mucosas de los individuos sanos sin que les acarree habitualmente ninguna enfermedad ni síntoma particular. Cuando el organismo está debilitado, las levaduras proliferan y pasan al torrente circulatorio: entonces se habla de una infección invasiva o sistémica. En el caso de *C. albicans*, el 40% de las candidemias (fungemias ocasionadas por *C. albicans*) son mortales en los humanos. Las micosis invasivas (MI) son afecciones frecuentes y graves en el medio hospitalario. A pesar de los tratamientos eficaces en los que el coste constituye una carga cada vez más difícil de soportar por los hospitales, la morbimortalidad de las MI no disminuye. Los métodos micológicos convencionales (aislamiento o identificación) a menudo resultan infructuosos, ya que el acceso, sin riesgo para el paciente, a los sitios de infección localizados para retirar el hongo resulta con frecuencia imposible. Por otra parte, los hemocultivos dan negativo en casi la mitad de los casos de MI. Los métodos que se basan en la biología molecular (PCR) no resuelven estos problemas. Además, al final se ha acabado estableciendo que la precocidad a la hora de emplear el tratamiento antimicótico —basándose en un diagnóstico— condiciona la supervivencia del paciente. Entre los métodos de diagnóstico complementarios o alternativos a la micología convencional, los médicos ya reconocen la utilidad de los métodos de detección de glucanos que circulan (es decir, los glucanos fúngicos contenidos en el suero de los pacientes infectados) por el suero de los pacientes. Estos glucanos proceden de la pared de los micromicetos o de sus precursores, y se pueden detectar mediante pruebas inmunitarias comerciales. Así pues, el kit Platelia® Candida Antigen permite detectar los mananos y los galactomananos que proceden, respectivamente, de *Candida* y de *Aspergillus*. Los kits de las pruebas bioquímicas, tales como el comercializado con la marca Fungitell®, por ejemplo, permiten detectar los glucanos habituales de *Candida* y de *Aspergillus*.

Cada «kit» de los dos tipos anteriormente dichos comprende numerosos reactivos y estándares internos diferentes. La necesidad de realizar curvas de calibración en cada serie lleva a un consumo creciente de reactivos que se suelen destinar a analizar los sueros. Esta calibración necesaria puede, a veces, llevar a aplazar las evaluaciones por razones económicas (por falta de una cantidad suficiente de reactivos). Por ejemplo, es difícil, en cuanto a lo que respecta al Fungitell®, justificar la utilización de 9 pocillos para la calibración y que se monopolice a un técnico a media jornada para analizar un suero. De igual forma, para realizar estas pruebas es necesario acceder a robots programados específicamente que presentan interfaces para el sistema informático, lo que complica aún más su práctica unitaria de urgencia, cuando deberían incluso responder en los plazos más cortos posibles desde su prescripción.

Por lo tanto, todas estas pruebas son particularmente costosas en tiempo y/o en reactivos. Además, siempre existe un cierto número de positivos falsos que confunden el diagnóstico. Esto es particularmente cierto para las dosis de glucano(s) por la vía bioquímica que se ven alterados por la presencia de hemoglobina (sueros que sufren hemólisis al recogerlos) o alteraciones metabólicas frecuentes en los pacientes con riesgo de MI, tales como una hipertrigliceridemia, la presencia de bilirrubina o una hiperproteinemia. Por último, se ha descrito en repetidas ocasiones la presencia de falsos positivos en los pacientes hospitalizados en reanimación y con infecciones múltiples por otros microorganismos además de los hongos. Todavía se desconoce la naturaleza de los mecanismos que conducen a esta falsa positividad de la detección de los β -D-glucanos por no haberse caracterizado la naturaleza molecular de los productos que circulan por el suero de estos pacientes. Debido a la presencia de estos positivos falsos, algunos pacientes que no necesitarían ningún tratamiento ven cómo se les administra una antibioterapia antimicótica que prolonga su estancia en el hospital. En el caso de los negativos falsos que también se dan, se considera que no hay micosis, sino una infección bacteriana; el paciente ve, por lo tanto, cómo se le administra un tratamiento antibacteriano que le es nefasto y puede resultarle mortal.

Por otra parte, el kit Fungitell® utiliza sangre de cangrejo herradura, un animal que comienza a escasear. De hecho, en el momento actual es imposible criar los cangrejos herradura. Así pues, los cangrejos herradura se capturan en su medio natural. Se les retira una fracción de sangre antes de devolverles la libertad. El 15% de los cangrejos herradura liberados no logran sobrevivir.

Un objeto de la presente invención es proponer un nuevo método de diagnóstico *in vitro* para una micosis invasiva.

Otro objeto es proponer un método *in vitro* como el que se acaba de comentar que sea más fiable, en particular, un método que permita evitar los negativos falsos y/o los positivos falsos descritos más arriba.

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de una micosis invasiva ocasionada por un microorganismo fúngico patógeno, según la reivindicación 1.

Cada uno de los documentos WO 2005/111627 A2, US 2010/003699 A1 y MASS SPECTROMETRY LETTERS, vol. 2, n.º 3, de 15 de setiembre de 2011, páginas 61-64, XP055059988, ISSN 2233-4203, describe un procedimiento

para diagnosticar una enfermedad y, sobre todo, el cáncer, mediante la determinación de la presencia o ausencia de glucanos biomarcadores en una muestra de líquido biológico por medio de la espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF. Pero hay que destacar que los biomarcadores detectados en la técnica anterior proceden del sujeto en evaluación y son, entonces, endógenos.

- 5 Un mérito de los inventores es, así pues, haber podido demostrar que era posible, mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF, detectar, en un líquido biológico complejo, la presencia de un compuesto elegido entre los azúcares, en particular los polisacáridos, los oligosacáridos y los monosacáridos que proceden del microorganismo patógeno y no del mamífero hospedador. Otro mérito de los inventores es el haber demostrado que este compuesto de interés resulta ser un marcador para el diagnóstico de las micosis invasivas. La presencia del
- 10 compuesto de interés (marcador) corresponde a un máximo visible en el espectro obtenido mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF. De hecho, no era evidente que un compuesto como el citado procedente de un microorganismo fúngico patógeno se pudiera detectar por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF en un líquido biológico. Era aún menos evidente que este compuesto de interés pueda indicar una micosis invasiva. De hecho, se podía pensar que la cantidad de compuesto de interés sería demasiado baja para ser detectada, o que la
- 15 señal que corresponde a este compuesto de interés estaría enmascarada entre las miles de señales que se pueden observar en un medio biológico, en especial sérico. Además, en los líquidos biológicos, los azúcares (polisacáridos, oligosacáridos y monosacáridos) forman complejos con los lípidos, las proteínas y las sales, y son, así pues, difícilmente detectables.

- El máximo o los máximos significativos y que corresponden a uno o a varios compuestos de interés que permiten
- 20 diagnosticar una micosis invasiva ocasionada por un microorganismo dado han sido puestos de manifiesto por adelantado al reproducir, por ejemplo, el protocolo experimental descrito en la presente solicitud con las muestras de líquido biológico que proceden de los mamíferos infectados por el o los microorganismos fúngicos patógenos dados.

El método de la invención permite detectar los compuestos de interés como los anteriormente dichos sin necesidad de marcarlos.

- 25 Es posible, según el método de la invención, detectar por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF la presencia simultánea de varios compuestos de interés de los que uno al menos forma parte de los polisacáridos, oligosacáridos o monosacáridos. Todos los compuestos de interés pueden, de igual forma, según la invención, ser azúcares como los anteriormente dichos. Ventajosamente, para extraer dicho compuesto de interés, se disocian dichos complejos contenidos en dicha muestra de líquido biológico mediante precipitación o coagulación de la
- 30 mayoría de dichas proteínas y/o de dichos lípidos;

- se centrifuga dicha muestra y se separa el sobrenadante de la fracción sólida;
 - se recupera el sobrenadante;
 - se separa dicho compuesto de interés contenido en el sobrenadante, las posibles proteínas residuales y los posibles lípidos residuales, en especial por cromatografía de fase inversa, y se separa dicho compuesto de
- 35 interés de dichas sales, en especial mediante una cromatografía de absorción.

Según la invención, es posible separar primero el compuesto de interés de las sales, y después separarlo de las posibles proteínas residuales y/o lípidos residuales, o efectuar estas dos etapas en orden inverso.

- Ventajosamente, para disociar dichos complejos se añade un agente complejante a dicha muestra, en especial una base, en particular EDTA, y se calienta dicha mezcla obtenida hasta la ebullición, y en particular a una temperatura
- 40 superior o igual a 100 °C e inferior o igual a 140 °C, y en especial, sensiblemente igual a 120 °C.

La duración del calentamiento la puede ajustar el experto en la técnica en función del tamaño de la muestra, de la técnica utilizada para el calentamiento y del recipiente que contiene la muestra. Se debe llevar a la ebullición todo el volumen de la muestra. La duración del calentamiento se adapta para no degradar la muestra, en particular los azúcares que contiene. A modo de ejemplo, la duración del calentamiento está comprendido entre los 3 y 7 minutos.

- 45 El método de la invención es particularmente robusto y tiene un coste muy pequeño en lo que se refiere a los reactivos; en términos de compatibilidad analítica, el tiempo del técnico no es superior al que se necesita para la utilización de los kits existentes. El agente complejante, por ejemplo, EDTA, asociado al calentamiento, permite disociar los complejos que existen en el líquido biológico bruto. El agente complejante permite en especial liberar los azúcares de las lectinas dependientes de cationes divalentes.

- 50 Según un modo de realización concreto, se efectúa primero la cromatografía en fase inversa y luego la cromatografía de absorción.

Ventajosamente, se utiliza una columna que comprende una fase sólida hidrófoba para la cromatografía de fase inversa y una columna que contiene carbón activo para la cromatografía de absorción. La columna hidrófoba puede

ser una columna llena de cualquier soporte sólido sobre el que se incorporan, por ejemplo, grupos de tipo octadecilo (C18). El soporte puede ser un polímero o sílice poroso. La longitud y el volumen de estas columnas serán variables en función del volumen de suero a tratar.

- 5 La columna que contiene carbón activo contiene una mezcla en peso que lleva la misma cantidad de carbón activo y de Célite® (tierra de diatomeas), lo que permite recuperar en el eluido los monosacáridos y los disacáridos, mientras que los otros sacáridos se quedan retenidos en la columna.

- 10 El tamaño y la masa molecular del compuesto de interés no están limitados por la invención. El compuesto de interés puede, por ejemplo, presentar una relación m/z inferior a 1000. El compuesto de interés puede ser un disacárido, en concreto un dímero de hexosas que corresponde a una señal de $m/z = 365$. Este compuesto de interés que es marcador de una micosis invasiva puede ser, por ejemplo, la trehalosa.

Ventajosamente, después de añadirle dicho agente complejante, se le añade al menos una enzima capaz de degradar los polisacáridos y/o oligosacáridos y/o se efectúa un tratamiento químico con objeto de cortar las cadenas de dichos polisacáridos y/o oligosacáridos, por medio de lo cual se aumenta posiblemente la cantidad de dicho compuesto de interés.

- 15 La utilización de las endomanosidasas permite liberar los oligomanósidos libres con el objeto de aumentar la intensidad de su señal en la espectrometría de masas (MALDI-TOF). En este caso también se puede contemplar un tratamiento químico, por ejemplo la acetólisis. También es posible actuar del mismo modo sobre los galactomananos, los glucanos, incluso la quitina (tres compuestos mayoritarios en el seno de la pared de los hongos), para liberar cadenas cortas a partir de estos polímeros.
- 20 Así pues, un aumento de la intensidad de la señal de un trisacárido después de la manosidasa permite atribuir la señal a los mananos circulantes.

Esta estrategia analítica se puede completar con la acción de las exoglucosidasas para las cuales las conclusiones se basarán en lo contrario, o sea, en la desaparición de la señal. También se puede llegar a determinar el microorganismo patógeno implicado en función del tipo de oligosacáridos presente en la muestra de líquido biológico.

- 25 Ventajosamente, dicho compuesto de interés se elige entre los monosacáridos y los oligosacáridos siguientes: [*N*-acetilglucosamina- β -(1,4)-*N*-acetilglucosamina]_n donde *n* es un entero superior o igual a 1 e inferior o igual a 10, los oligosacáridos comprenden de 2 a 10 monosacáridos, en especial los oligómeros de hexosas, en particular los dímeros de hexosas, los glucanos, en especial los glucanos de tipo [glucosa- β -(1,3)-glucosa]_n, [glucosa- β -(1,6)-glucosa]_n donde *n* es un entero superior o igual a 1 e inferior o igual a 10; los mananos, en especial los mananos de tipo [manosa- α -(1,2)-manosa]_n, [manosa- α -(1,3)-manosa]_n, [manosa- α -(1,6)-manosa]_n, [manosa- β -(1,2)-manosa]_n donde *n* es un entero superior o igual a 1 e inferior o igual a 10, los galactomananos, los galactanos, los arabinogalactanos y los glucuronoxilomananos.
- 30

Según un modo de realización concreto del método de la invención, el compuesto de interés es un compuesto producido por el microorganismo fúngico patógeno, y más particularmente la trehalosa.

- 35 El compuesto de interés que sirve de marcador puede ser un dímero de hexosas, en concreto la trehalosa ($m/z = 365$). Tal tipo de compuesto de interés resulta ser un buen marcador de una infección por un microorganismo patógeno, en particular de una infección por *Candida albicans*.

- 40 El microorganismo fúngico patógeno se puede elegir entre los microorganismos fúngicos patógenos capaces de producir trehalosa bajo la acción del sistema inmunitario de dicho mamífero, *Candida* spp., en particular, *Candida albicans*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* y *Pneumocystis jirovecii*.

Ventajosamente, el microorganismo fúngico patógeno se elige entre los microorganismos fúngicos patógenos anteriormente dichos que, bajo la acción del sistema inmunitario de los mamíferos, producen trehalosa.

- 45 Ventajosamente, se añade a dicha muestra una cantidad conocida de al menos un compuesto de referencia, mediante lo cual, al comparar la intensidad de la señal obtenida por dicho compuesto de interés dado con la señal obtenida por dicho compuesto de referencia, se puede determinar la cantidad de dicho compuesto de interés dado que contiene dicha muestra. El compuesto de referencia se puede añadir a la muestra antes del tratamiento de ésta. Es posible, según la invención, utilizar a modo de compuesto de referencia los compuestos que presentan unos valores de m/z cercanos a los de los oligosacáridos a analizar. Se considera que los valores de m/z que pertenecen a un margen [m/z del compuesto de interés - 5; m/z del compuesto de interés + 5] o iguales a los límites de este
- 50

margin están cercanos al valor de m/z del compuesto de interés.

Ventajosamente, el compuesto de referencia presenta un comportamiento cromatográfico en las columnas utilizadas que es idéntico al del compuesto a detectar. En ese caso, se podría añadir después de la etapa de calentamiento y antes de pase por las dos columnas, El compuesto de referencia no debe ser un compuesto que esté presente en

los líquidos biológicos, tanto si están sanos como enfermos. El compuesto de referencia no debería poderse identificar de resultados de una contaminación microbiana. Se utilizarán de forma especialmente ventajosa con estos fines disacáridos o trisacáridos, facultativamente marcados con un radioisótopo. La trehalosa deuterada (MM 2H trehalosa = 356 + Na + 379) se puede, por ejemplo, utilizar como compuesto de referencia.

- 5 Según otro modo de realización, se determina la relación de la intensidad de la señal que corresponde al compuesto de interés dado en función la intensidad de una señal endógena ubicua, en donde dicha señal endógena se ha identificado anteriormente y es facultativamente específica del tipo de líquido biológico del que procede la muestra, por medio de lo cual se puede cuantificar dicho compuesto de interés dado que está contenido en dicha muestra.

- En efecto, es otro mérito de los inventores el haber identificado una señal constante (la dicha señal ubicua) presente en cualquier muestra de suero que puede servir para la cuantificación del compuesto de interés en este tipo de líquido biológico. El experto en la técnica puede determinar con facilidad una señal ubicua al realizar el análisis de varias muestras por MALDI-TOF (preferiblemente muestras sin infectar o que no se sospecha que lo estén) de un tipo de líquido biológico dado. La señal ubicua corresponde a una señal constante que se encuentra en todas las muestras de este tipo de líquido. La intensidad de la señal tal como la anteriormente dicha corresponde a la altura del máximo que aparece en el espectrograma obtenido mediante el análisis de tipo MALDI-TOF.

- Así pues, según la invención, el líquido biológico se puede elegir entre la sangre venosa y arterial, el suero, los líquidos de las mucosas genitales, los líquidos de las vías aéreas, en especial el líquido que procede del lavado broncoalveolar, de la aspiración bronquial, de la aspiración traqueal, de la expectoración, los esputos, los líquidos que han servido para recoger los fragmentos de piel y las faneras, los líquidos de derrame, los líquidos de las cavidades cerradas, en especial el líquido cefalorraquídeo, los líquidos del aparato digestivo o urinario, y los líquidos obtenidos a partir del aplastamiento de fragmentos de biopsia.

La presente invención se refiere de igual forma a un kit que permite la realización del procedimiento según la reivindicación 14.

- El relleno se puede preparar con el mezclado de una cantidad igual de carbón activo comercial y de Céélite® (tierra de diatomeas) según un principio bien conocido por el experto en la técnica y descrito en la publicación siguiente: Whistler y Durso, *Journal of American Chemical Society*, 1950.

- La fase sólida hidrófoba se presenta en forma disjunta y comprende un material magnético, por medio del cual es posible retirar la fase sólida con ayuda de un imán después de ponerlo en contacto con dicho líquido biológico. Tales materiales se conocen en el documento *CLINICAL CHEMISTRY*, vol. 53, n.º 3, de 1 de marzo de 2007, páginas 421-428, XP002505366, ISSN 0009-9147. Por ejemplo, la fase sólida hidrófoba se puede presentar en forma de muchas perlas que contienen un material ferroso o magnético, y que están recubiertas por un material hidrófobo. Se pone en contacto la fase sólida hidrófoba en forma disjunta con la muestra del líquido biológico. Facultativamente, se mezcla. Las perlas ofrecen una gran superficie de contacto. Después de un cierto tiempo de contacto, se retira la fase sólida hidrófoba con un imán, por ejemplo, al sumergir este último en la mezcla de líquido biológico y perlas de fase sólida hidrófoba. Las perlas se recogen con el imán, lo que permite separar con facilidad el líquido biológico tratado.

Según otro modo de realización, el kit comprende, además, una cantidad dada de un compuesto de referencia elegido entre monosacáridos, disacáridos y trisacáridos, facultativamente marcados con un isótopo radiactivo, en especial la trehalosa deuterada.

- Ventajosamente, el kit puede comprender, además, una cantidad dada de una enzima apta para reaccionar con los complejos formados por los polisacáridos y/o los oligosacáridos y/o los monosacáridos contenidos en un líquido biológico.

El soporte que está formado por una fase sólida hidrófoba que permite la realización de una cromatografía de fase inversa como la anteriormente dicha puede ser una placa, un pocillo, una columna, un tubo, una placa que comprende muchos pocillos.

- 45 El recipiente que contiene el relleno de carbón activo sólido puede ser un pocillo, una columna, un tubo, una placa que comprende muchos pocillos, independientemente de la elección del soporte anteriormente dicho.

Ventajosamente, el kit según la invención comprende además una placa MALDI.

- La presente invención se refiere también a la utilización de un compuesto de interés elegido entre los polisacáridos, los oligosacáridos y los monosacáridos, en particular la trehalosa, para el diagnóstico *in vitro* de una micosis invasiva mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF.

La presente invención, sus características, particularidades y las diversas ventajas que aporta se harán evidentes con más claridad con la lectura de la descripción que sigue y que hace referencia a un modo concreto de realización, presentado a modo de ejemplo no limitante y que hace referencia a las figuras adjuntas en las cuales:

- 5 – Las figuras 1a a 1d representan, respectivamente, los espectros de masas (MALDI-TOF) obtenidos según el método de la invención mediante el análisis de las placas de MALDI preparadas a partir de los sueros G25, G32, G42 y G49 representados en la tabla I, un compuesto que esté presente en la muestra de suero está representado sobre el espectro por un máximo de señal (o pico), el eje de las abscisas del espectro indica la relación m/z (en unidad de masa m.u.) del compuesto representado por el máximo, el eje de las coordenadas indica la intensidad de la señal (altura del máximo) que corresponde a la cantidad de compuesto representado que está contenido en la muestra, en donde el valor 100% se atribuye a una señal ubicua endógena en todos los sueros; y
- 10 – la figura 2a representa en el eje vertical la cantidad de mananos (en ng/ml) contenidos en las muestras de los sueros identificados en la tabla I y que se indican en la abscisa, en donde dicha cantidad se ha obtenido mediante la utilización del kit Platélia® Candida Antigen;
- la figura 2b representa la cantidad de glucanos (en ng/ml) contenidos en las muestras de suero de la tabla I, la cantidad de glucanos se indica en el eje de coordenadas, mientras que el número del suero está indicado en la abscisa, en donde dicha cantidad se mide mediante la utilización del kit Fungitell®; y
- 15 – la figura 2c representa la cantidad de oligómeros de hexosas (oligómero formado por dos hexosas más ampliamente explicitado más adelante) contenida en cada una de las muestras de la tabla I, la cantidad del oligómero anteriormente dicho en % de la señal ubicua se representa en las ordenadas, los grupos se indican en la abscisa, en donde dicha cantidad se obtiene mediante la utilización del procedimiento de la invención y que corresponde a la relación de la altura del máximo obtenido para el oligómero anteriormente dicho en función de la altura del máximo obtenido para una señal ubicua $\times 100$;
- 20

Definiciones

Según la invención, el mamífero no es una limitación; se puede tratar de un humano o de cualquier otro mamífero. La presente invención encuentra, por lo tanto, una aplicación en la medicina humana y en la medicina veterinaria.

- 25 Según la invención, los oligosacáridos y los polisacáridos se definen como polímeros de monosacáridos unidos entre sí por enlaces glucosídicos. Los oligosacáridos están constituidos por 2 a 10 monosacáridos y los polisacáridos por más de 10 monosacáridos.

Un espectrómetro de tipo MALDI-TOF es un espectrómetro de masas que acopla una fuente de ionización láser asistida por una matriz (MALDI, desorción/ionización láser asistida por matriz) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF, espectrometría de masas de tiempo de vuelo). Este tipo de aparato está hoy en día bastante extendido, incluso en el entorno hospitalario.

- 35 Según la invención, se define la presencia del compuesto de interés por la presencia de un máximo visible en el espectro de masas obtenido por espectrometría de tipo MALDI-TOF. El experto en la técnica es capaz por sí mismo de reconocer sobre tal espectro la presencia de un máximo visible y, por lo tanto, significativo. En particular, un máximo significativo puede corresponder, según la invención, a un máximo de intensidad superior o igual al 1%, ventajosamente superior o igual al 3% y más ventajosamente al menos sensiblemente igual al 5%, con respecto a la intensidad de un máximo de referencia.

- 40 Según la invención, los términos de «micosis invasiva» hacen referencia a las infecciones provocadas por la presencia de levaduras (hongos) en la sangre periférica del mamífero y las infecciones que acaban afectando a la sangre y a al menos un tejido. En el caso de una infección por *C. albicans*, por ejemplo, en la que pueden haber afectaciones hepáticas y renales que proceden de una diseminación hematógena y extravascular de las levaduras, los términos de «micosis invasiva» hacen referencia a la candidemia y la candidosis invasiva.

- 45 Según la invención, se define un compuesto que procede de un microorganismo fúngico patógeno como cualquier residuo de microorganismo fúngico patógeno presente en los líquidos biológicos del hospedador, que se libera espontáneamente o de resultados de una despolimerización o de una degradación, realizada por el propio microorganismo o por la acción de las enzimas del hospedador. De igual forma, el compuesto de interés puede proceder de los polisacáridos o de parejas glucánicas de glucoproteínas o de glucolípidos que proceden del microorganismo fúngico patógeno. El compuesto de interés puede proceder de la pared del microorganismo fúngico patógeno, de un producto de degradación de este último, de un compuesto secretado o excretado por este último, o expresado por este último y liberado tras la destrucción de dicho microorganismo por las células del hospedador. Se puede tratar de un compuesto que procede de una interacción entre el sistema inmunitario del mamífero infectado y dicho microorganismo fúngico patógeno.
- 50

- 55 Por «microorganismo fúngico patógeno» se hace referencia a los hongos (levaduras) cuya dotación genética permite construir secuencias de polisacáridos o de oligosacáridos que son diferentes de las que sintetizan los mamíferos, o de producirlas en una cantidad no fisiológica presente en sus organismos. De acuerdo con la invención, se define mediante los términos «líquido biológico» cualquier líquido que procede de un organismo vivo, en particular de un

mamífero, y más en particular de un humano, y que contiene agua, al menos un tipo de proteína y/o al menos un tipo de lípido y/o al menos un tipo de sal mineral, presente en forma de ion, tal como, por ejemplo, sodio, potasio, en donde el ion puede ser metálico. En el sentido de la presente invención, se define una sal como una sal mineral en forma de ion.

- 5 Los experimentos descritos a continuación en referencia con una micosis ocasionada por *C. albicans* se pueden reproducir con mamíferos infectados de modo artificial por uno, dos o varios microorganismos fúngicos patógenos a estudiar. Los experimentos que vienen a continuación pueden entonces servir para determinar el compuesto o los compuestos de interés aptos para servir de marcadores de la micosis invasiva ocasionada por el o los microorganismos fúngicos patógenos a estudiar, para caracterizar dicho o dichos compuestos de interés, y para
- 10 conocer su relación con la infección.

Parte experimental

Primera etapa: tratamiento de las muestras biológicas para la detección de los glucanos. Procedimiento aplicado a los sueros.

- Distribuir 300 μ l de las muestras a analizar en microtubos estériles de 1,5 ml.
- 15 • Añadir 100 μ l de la solución del tratamiento (solución ácida EDTA) en cada tubo.
- Homogeneización vorticial.
 - Colocar los microtubos cerrados herméticamente con grapas de sellado durante 6 min a 120 °C en un bloque calefactor.
 - Retirar los tubos y centrifugarlos 10 min a 10.000 g.
- 20 • El sobrenadante (150 μ l) se transfiere a un microtubo de 1,5 ml estéril.

Los tratamientos posteriores para la detección de los glucanos mediante espectrometría de masas se efectúan sobre este sobrenadante. Este tratamiento libera o disocia los mananos y los galactomananos de los complejos proteicos coagulados en el sedimento; no altera en absoluto la dosis colorimétrica del glucano (kit Fungitell®) para el cual da unos resultados que concuerdan con la misma muestra sin tratar. En cambio, este tratamiento permite eliminar las

25 interferencias relacionadas con el exceso de proteínas, de triglicéridos, de bilirrubina y/o de hemoglobina.

Segunda etapa: tratamiento de los sobrenadantes para purificar y concentrar los oligosacáridos antes de la espectrometría de masas.

Se depositan 100 μ l del sobrenadante en un cartucho de extracción de fase sólida (SPE) (referencia SPE-C18: C18 Sep-Pak cartridge (Waters)) (1 volumen) (columna con un relleno hidrófobo) que se ha acondicionado previamente

30 con 5 volúmenes de una solución de acetonitrilo (ANC) y agua (75:25, vol/vol) y que se ha lavado con 10 volúmenes de agua. Después de que penetre en el cartucho el volumen del sobrenadante recogido, el cartucho se enjuaga con dos volúmenes de agua que se recogen. El eluido de la columna de C18 se deposita sobre un cartucho SPE que contiene una mezcla en peso con la misma cantidad de carbón activo comercial y de Célite® (volumen equivalente) acondicionada anteriormente con 5 volúmenes de una solución ANC/H₂O (75:25, vol/vol), y luego se enjuaga con

35 volúmenes de agua. Después de que penetre en el cartucho el volumen del sobrenadante, el cartucho se enjuaga con 20 volúmenes de agua. Se desecha el eluido. La columna se enjuaga con dos volúmenes de una solución ANC/H₂O (25:75, vol/vol). Se desechan los primeros 100 μ l. Se recogen los 300 μ l siguientes. Se seca el eluido (ACN/H₂O).

Tercera etapa: Análisis de los oligosacáridos por espectrometría de masas.

40 El espectrómetro de masas utilizado es un espectrómetro de tipo MALDI-TOF Voyager Elite DE-STR (Perspective Biosystems Framingham, MA). El eluido seco se solubiliza en agua. A 1 μ l de solución se le añade 1 μ l de una solución de ácido dihidrobenzoico (10 mg/ml en ACN/H₂O 50:50). Se deposita 1 μ l de la solución en una placa de MALDI-TOF (placa de Applied Biosystems, acero inoxidable, 96 depósitos, cercada) y se cristaliza a 50 °C. El análisis por MALDI-TOF se realiza en modo positivo-refletrón según los parámetros de adquisición optimizados

45 para la observación de los oligosacáridos neutros que presentan una relación m/z inferior a 1000. Después de la adquisición de los datos, se establece la presencia de los oligoglucanos en la mezcla mediante la observación de los aductos [M+Na]⁺ generados. Las masas (M) de interés para el diagnóstico se calculan según la fórmula $M \text{ Hex}_n = 180 + [162]_{(n-1)} + 23$. La cuantificación relativa de las especies moleculares se efectúa mediante el cálculo de la relación de las señales $M \text{ Hex}_n$, bien en función de una señal ubicua endógena, bien en función de una referencia

50 externa introducida en la muestra durante la primera fase de la segunda etapa. Este día, la señal que presenta un interés para el diagnóstico es $M \text{ Hex}_2 = 365$. Los ejemplos de análisis presentados en el resto del texto se basan en el cálculo de la relación de las señales 365/361.

Análisis de los sueros humanos

El método de la invención se ha aplicado a 12 sueros de pacientes hospitalizados en el CHRU de Lille y se han seleccionado con los siguientes criterios:

- 5 i) haber desarrollado en el transcurso de su hospitalización una candidosis sistémica demostrada, al menos, mediante un hemocultivo de *C. albicans*.
- ii) Haberse beneficiado de la prescripción de una prueba de detección de la glucanemia o de la mananemia que haya dado positiva por separado o conjuntamente, y que haya orientado o confirmado el diagnóstico en un suero extraído en la semana que precede, o en las 2 semanas que siguen, a la extracción para el hemocultivo que ha resultado positivo, y
- 10 iii) la disposición de un volumen mínimo de 1 ml de suero residual almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un año por razones legales.

La tabla I que viene a continuación recapitula los resultados obtenidos por la utilización de los kits Platelia® Candida Antigen y Fongitell® sobre los doce sueros de pacientes que responden a los criterios anteriormente dichos y, por lo tanto, están afectados por una MI.

15 Tabla I

Muestra de suero	Mananos detectados con Platelia Candida Antigen® (pg/ml)	Glucanos detectados con la prueba Fungitell® (pg/ml)
G3		11
G4	0	0
G5		62
G6		11
G10	>500	126
G12	0	178
G15	0	0
G21	216	232
G25	610	43
G32	0	>500
G42		1272
G49	>500	388

El método de acuerdo con la invención se ha aplicado a las muestras de los sueros anteriormente dichos. Los resultados se pueden ver en las figuras 1a a 1d y en las figuras 2a a 2c.

- 20 Tal y como se representa en las figuras 1a a 1d, el análisis de las placas de MALDI realizadas a partir de los sueros G25, G32, G42 y G49 de la tabla I sometidos al procedimiento de la invención demuestra, por una parte, que existe una señal de gran intensidad que corresponde a una masa de $m/z = 361$ cualquiera que sea el suero. Esta señal corresponde a un compuesto desconocido del suero y sirve de calibración para la intensidad de la señal. Por otra parte, aparece una señal en el espectro de todos los sueros citados en una posición que corresponde a una relación de $m/z = 365$. Esta señal corresponde a un dímero de hexosas. Esta señal está cercana a la señal ubicua anteriormente dicha, la cual puede, de hecho, utilizarse como una señal de calibración.
- 25

- Por otra parte, los espectros de las placas de MALDI preparados de acuerdo con el procedimiento de la invención a partir del suero de los pacientes sanos (resultados no representados) no comprenden la señal que corresponde a una relación de $m/z = 365$, sino que comprenden la señal ubicua que corresponde a una relación de $m/z = 361$. En consecuencia, es posible deducir que el dímero de hexosas que está en cantidad suficiente para ser detectable por espectrometría de masas del tipo MALDI-TOF procede, directamente o no, del patógeno *Candida albicans*.
- 30

Las figuras 2a a 2c muestran los resultados obtenidos con los kits comerciales y los resultados obtenidos por la utilización del procedimiento según la invención.

La tabla II que viene a continuación recoge los resultados cuantitativos obtenidos para las muestras de suero con la

puesta en práctica del método de la invención.

- El método según la invención se puede considerar que equivale a la detección de los mananos presentes en la muestra de suero, así como de la de los glucanos. En otras palabras, la señal que corresponde al dímero de hexosas anteriormente dicho ($m/z = 365$) se puede considerar que es al menos característico de la presencia de mananos y de glucanos en la muestra de suero analizado. Además, llama la atención que para los pacientes que presentan a la vez una glucanemia y una mananemia, la relación de la altura del máximo que corresponde a $m/z = 365$ en función de la altura del máximo que corresponde a $m/z = 361$ está relativamente correlacionado con la cantidad de mananos y de glucanos detectados. Para el suero G4, negativo con las dos pruebas comerciales, los resultados son negativos según el procedimiento de la invención (ninguna señal a $m/z = 365$). En cambio, para los pacientes G5, G6 y G15 para los cuales no ha sido posible detectar mananos y para los cuales las tasas de glucanos detectados eran muy bajas o nulas, se consigue identificar una señal clara que corresponde a una relación de $m/z = 365$.

Tabla II

Muestra de suero	(altura del máximo a $m/z = 365$) / (altura del máximo a $m/z = 361$) $\times 100$
G3	25
G4	0
G5	15
G6	10
G10	11
G12	30
G15	5
G21	35
G25	10
G32	33
G42	63
G49	20

- 15 El procedimiento de la invención puede, por lo tanto, sustituir tanto al Platelia® Candida Antigen como al Fungitell® a la hora de detectar los productos cuya presencia es concomitante a la positividad de estas pruebas. Además, el procedimiento según la invención permite detectar una señal que corresponde a $m/z = 365$ incluso en los sueros que, con el uso de los kits comerciales, resultaba que estaban desprovistos de glucanos y de mananos. El procedimiento de la invención resulta ser, por lo tanto, más sensible y más fiable que los kits comerciales anteriormente dichos.
- 20 Los resultados presentados se han adquirido con un aparato de MALDI-TOF/MS en modo de análisis llamado «reflectrón». El modo de análisis «lineal» en el MALDI-TOF/MS permite obtener los mismos resultados.

Caracterización del compuesto de interés que da una señal a $m/z = 365$

- Para determinar la estructura del compuesto de interés que sirve de marcador para el diagnóstico de una micosis invasiva y que corresponde al máximo de $m/z = 365$, se ha realizado la permetilación del sobrenadante del suero de los pacientes que padecen una candidosis invasiva. El suero de los pacientes que padecen candidosis invasiva se trata, por lo tanto, según las etapas una y dos, definidas más arriba. A continuación se efectúa la permetilación de los azúcares contenidos en el eluido seco obtenido después de la segunda etapa y se solubiliza en agua. La técnica de permetilación utilizada la conoce el experto en la técnica y se describe en especial en la publicación siguiente: Ciucanu I, Kerek F. 1984 «A simple and rapid method for the per méthylation of carbohydrates». *Carbohydr. Res.* 131: 209-217. A continuación se realizan las placas de MALDI según el protocolo descrito en la tercera etapa anteriormente dicha. La señal $[M+Na]^+$ obtenida para el azúcar permetilado aparece en un valor de $m/z = 477$, lo que encaja perfectamente con un disacárido de hexosas permetilado.

- El suero de los pacientes que padecen candidosis invasiva, tratados según las dos primeras etapas citadas más arriba y que han experimentado una permetilación presentan un máximo cromatográfico (cromatografía en fase gaseosa con detector por ionización de llama GC-FID: columna capilar apolar Alltech ECONO-CAP EC-1 [30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m]). Tiempo de ejecución = 28,8 min con un gradiente de temperatura que va de 180 °C a 330 °C)

que se corresponde con un tiempo de retención idéntico al de la trehalosa (α Glc1-1 α Glc) permitilada. El análisis por GC/EI-MS (cromatografía en fase gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas de tipo impacto electrónico, columna SGE SolGel-1ms [30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m]; condiciones experimentales idénticas a las de GC/FID) del suero de los pacientes que tienen diagnosticada candidosis invasiva, tratados según las dos primeras etapas

- 5 anteriormente dichas y que han experimentado una permitilación, presentan un espectro de fragmentación por EI-MS idéntico al de la trehalosa (α Glc1-1 α Glc) permitilada. Sobre esta base, se ha concluido que el compuesto de interés detectado por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF y que corresponde a una señal en $m/z = 365$ es un disacárido, y más en concreto, trehalosa. Este compuesto de interés puede, así pues, utilizarse como marcador para el diagnóstico de una micosis invasiva, más en concreto, una micosis invasiva ocasionada por *C. albicans*.
- 10 Determinación del origen fúngico del compuesto de interés y de su relación con una micosis invasiva

Experimentos *in vitro*

- Se han recogido granulocitos neutrófilos de ratones en la cavidad abdominal de los ratones que han recibido una inyección intraperitoneal de tioglucolato, de acuerdo con el método descrito por Pluskota et al. (*J. Immunol.* 1 de septiembre de 2008, 181 (5): 3609-19). Seis horas después de la inyección que se acaba de describir, los ratones se sacrifican por inhalación de dióxido de carbono. Se abrió la cavidad abdominal y se recogieron los granulocitos mediante el lavado de la cavidad abdominal con 5 ml de una solución de PBS (solución tamponante de fosfato salino) fía. Para reducir la posible contaminación con macrófagos, se han cultivado las células en placas de Petri que contienen el tejido de cultivo recubierto de suero de ternera fetal en un incubador a 37 °C en una atmósfera que contiene el 5% de dióxido de carbono, durante una hora. Los granulocitos que no están adheridos se han recogido a partir del sobrenadante, se han centrifugado durante 10 minutos a 2.250g, se han contado con un hematímetro y luego se han vuelto a suspender en una solución de sales equilibrada de Hank (HBSS, comercializada por la sociedad Invitrogen, Francia). Se aislaron los granulocitos humanos a partir de las células sanguíneas de la sangre de voluntarios sanos con una solución ácida de citrato de dextrosa (1 volumen de citrato a 145 mM y 7 volúmenes de dextrosa al 2%, pH = 4,6). El aislamiento se realizó por centrifugación con un aparato de tipo Ficoll-Hypaque, seguido por una sedimentación de los eritrocitos en dextrano y una lisis hipotónica de los eritrocitos residuales.
- 15
- 20
- 25

Evaluación de la destrucción de *C. albicans* por los granulocitos

- Levaduras (10^6 unidades) de la cepa SC5314 de *C. albicans* se han suspendido en 0,25 ml de solución con HEPES a 0,1 M (ácido *N*-2-hidroxiethylpiperazin-*N*-2'-etanosulfónico), pH 7,8, se han mantenido en agitación a 1640 rpm y se han mezclado con 3×10^6 granulocitos humanos a una proporción de 1:3. La mezcla de granulocitos y levaduras se ha incubado a 37 °C con una agitación suave durante 1 a 2 horas. Cada 30 minutos se extrae de la mezcla un volumen de alícuota de 300 μ l y se utiliza para detectar la presencia o no del compuesto de interés que corresponde a $m/z = 365$. La detección del compuesto de interés anteriormente dicho se realiza por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF en las mismas condiciones que se han descrito más arriba.
- 30

- Tanto si son granulocitos humanos como si lo son murinos, la señal que corresponde al compuesto de interés a $m/z = 365$ aparecía después de aproximadamente dos horas, lo que demuestra que el compuesto de interés surge probablemente por la interacción entre *C. albicans* y los granulocitos, que son las células de la primera línea de defensa de los mamíferos contra los patógenos fúngicos.
- 35

Experimentos *in vivo* con ratonas

- Animales: se han utilizado ratonas C57BL/6 con 6 a 8 semanas de edad para todos los experimentos descritos en la presente solicitud. Todas las ratonas han sido suministradas por los laboratorios Charles River Laboratories (Francia). Todos los experimentos con animales se han llevado a cabo según los protocolos aprobados por el comité de ética para la experimentación animal del Centro Regional Hospitalario Universitario de Lille y según la directriz europea (86/609/CEE) relativa a la protección de los animales utilizados con fines experimentales o con otros fines científicos.
- 40

- Se han creado cuatro grupos de 10 ratonas cada uno. Todos los grupos de ratonas se han alimentado durante 14 días a partir del $d = 1$ que es el día en el que comienza el experimento. El $d = 14$ se han sacrificado todas las ratonas por luxación de las vértebras cervicales. Se les ha recogido la sangre mediante punción cardíaca. Las muestras de suero se han realizado a partir de estas extracciones de sangre y se han conservado a -20 °C antes de su utilización para la detección del compuesto de interés que corresponde a la $m/z = 365$. El grupo 0 es el grupo testigo, es decir, que está formado por 10 ratonas que no reciben ningún tratamiento. La ratona no resulta colonizada (normalmente) de forma natural por *C. albicans*.
- 45
- 50

El grupo 1 es el grupo de ratonas en las cuales se ha inducido una inflamación intestinal por adición de DSS (sulfato de sodio de dextrano, MM 36-50 kDa; MP Biomedicals, LLC, Alemania) al 1,5% en el agua de bebida dada desde el $d = 1$ al $d = 14$. Este grupo no resulta colonizado por *C. albicans*.

- Las ratonas del grupo 2 reciben por vía oral, el $d = 1$, 200 ml de PBS que contiene 10^7 unidades de *C. albicans*. A las
- 55

5 ratonas del grupo 2 se les induce también una inflamación intestinal por adición de DSS (sulfato de sodio de dextrano, MM 36-50 kDa; MP Biomedicals, LLC, Alemania) al 1,5% en el agua de beber dada desde el d = 1 al d = 14. La administración de DSS que provoca una inflamación intestinal vuelve tolerante a la ratona ante el establecimiento de grandes cantidades de levaduras en su tubo digestivo. Este modelo imita a los pacientes hospitalizados y muy colonizados por las *Candida*. Se trata de pacientes sometidos a radioterapias o quimioterapias, y que presentan una alteración de las paredes intestinales.

10 Las 10 ratonas del grupo 3 reciben el d = 1 una inyección intravenosa en la vena de la cola de 10^4 unidades de *C. albicans* de la cepa SC5314 contenidas en 0,1 ml de solución salina estéril. Este grupo imita una candidemia masiva que induce una candidosis invasiva, que resulta mortal para la ratona. Este modelo corresponde a una candidemia (micosis invasiva) en el paciente hospitalizado cuyo resultado es casi siempre mortal en ausencia de tratamiento. La presencia o no de mananos en el suero de los cuatro grupos de ratonas se ha probado con el kit Platelia® Candida Antigen. La tabla III que viene a continuación recoge los valores medios de las dosis de los mananos presentes en el suero de cada uno de los grupos 0 a 3 anteriormente dichos.

Tabla III

Grupo de ratonas	Valor medio de la concentración de mananos contenidos en el suero (pg/ml)
0	<1000
1	2800
2	4200
3	8400

15

Los resultados de la tabla III demuestran que la prueba Platelia® Candida Antigen resulta ser positiva igualmente en el caso de ratonas colonizadas, pero que no están afectadas por una candidemia, como es el caso de las ratonas del grupo 3.

20 A continuación se ha detectado la presencia o no del compuesto de interés que corresponde a la $m/z = 365$ en cada uno de los sueros de las ratonas de cada grupo. Se ha utilizado el mismo protocolo experimental que se ha citado más arriba en referencia a los sueros de los pacientes. No se ha podido detectar ninguna señal a $m/z = 365$ que corresponda al compuesto de interés en los sueros de las ratonas de los grupos 0, 1 y 2. Solo se ha podido detectar en las ratonas del grupo 3 una señal a $m/z = 365$ por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF en cada uno de los sueros anteriormente tratados según las dos primeras etapas del método de la invención. Resulta que el método de la invención permite diagnosticar de manera fiable una micosis invasiva y permite diferenciar una micosis invasiva de una colonización masiva del tubo digestivo, lo que no es el caso para los kits comerciales anteriormente mencionados.

25

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico *in vitro* de una micosis invasiva ocasionada por un microorganismo fúngico patógeno, caracterizado por:
- 5
- proporcionar una muestra de un líquido biológico que procede de un mamífero, en donde dicho líquido biológico contiene en especial proteínas y/o lípidos y/o sales y/o polisacáridos y/o oligosacáridos y/o monosacáridos capaces de formar complejos con dichas proteínas y/o lípidos y/o sales;
 - tratar dicha muestra de líquido biológico para extraer dichos polisacáridos y/o oligosacáridos y/o monosacáridos;
- 10
- determinar por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF la presencia o no, entre dichos polisacáridos, oligosacáridos y/o monosacáridos extraídos, de al menos un compuesto de interés dado que procede de dicho microorganismo fúngico y elegido entre los polisacáridos, los oligosacáridos y los monosacáridos;
 - deducir que si dicho compuesto de interés dado está presente en dicha muestra, dicho mamífero está afectado por una micosis invasiva.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que para extraer dichos polisacáridos y/o oligosacáridos y/o monosacáridos de dicha muestra biológica:
- se disocian dichos complejos contenidos en dicha muestra de líquido biológico por precipitación o coagulación de la mayoría de dichas proteínas y/o de dichos lípidos;
 - se centrifuga dicha muestra y se separa el sobrenadante de la fracción sólida;
- 20
- se recupera el sobrenadante;
 - se separa dichos polisacáridos y/o oligosacáridos y/o monosacáridos contenidos en el sobrenadante, las posibles proteínas residuales y los posibles lípidos residuales, en especial, por cromatografía de fase inversa, y se separan dichos polisacáridos y/o oligosacáridos y/o monosacáridos de dichas sales, en particular, mediante la realización de una cromatografía de absorción.
- 25 3. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que para disociar dichos complejos, se añade un agente complejante, en especial una base, en particular EDTA, y se calienta dicha mezcla obtenida hasta la ebullición, y en especial a una temperatura comprendida entre 100 °C y 140 °C, y en particular, sensiblemente igual a 120 °C.
4. Método según una de las reivindicaciones 2 y 3, caracterizado por efectuarse primero la cromatografía en fase inversa y luego la cromatografía de absorción.
- 30 5. Método según una de las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado por utilizar una columna que comprende una fase sólida hidrófoba para la cromatografía de fase inversa y una columna que contiene carbón activo para la cromatografía de absorción.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por presentar dicho compuesto de interés una relación m/z inferior a 1000.
- 35 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por añadir al menos una enzima capaz de actuar con dichos complejos y/o efectuar un tratamiento químico para cortar las cadenas de dichos polisacáridos y/o oligosacáridos que proceden de la disociación de dichos complejos, por medio de lo cual se aumenta posiblemente la cantidad de dicho compuesto de interés.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicho compuesto de interés se elige entre los monómeros y oligómeros siguientes: $[N\text{-acetilglucosamina-}\beta\text{-(1,4)-}N\text{-acetilglucosamina}]_n$, donde n es un entero superior o igual a 1 e inferior o igual a 10, las osas, los oligosacáridos que comprenden de 2 a 10 osas, en especial los oligómeros de hexosas, en especial los dímeros de hexosas, los glucanos, en especial los glucanos de tipo $[\text{glucosa-}\beta\text{-(1,3)-glucosa}]_n$, $[\text{glucosa-}\beta\text{-(1,6)-glucosa}]_n$ donde n es un entero superior o igual a 1 e inferior o igual a 10; los mananos, en especial los mananos de tipo $[\text{manosa-}\alpha\text{-(1,2)-manosa}]_n$, $[\text{manosa-}\alpha\text{-(1,3)-manosa}]_n$, $[\text{manosa-}\alpha\text{-(1,6)-manosa}]_n$, $[\text{manosa-}\beta\text{-(1,2)-manosa}]_n$ donde n es un entero superior o igual a 1 e inferior o igual a 10, los galactomananos, los galactanos, los arabinogalactanos y los glucuronoxilomananos.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, caracterizada por ser dicho compuesto de interés un compuesto producido por dicho microorganismo fúngico patógeno por la acción del sistema inmunitario de dicho mamífero y en especial la trehalosa.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por elegir dicho microorganismo fúngico patógeno entre *Candida* spp., en particular *Candida albicans*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Scedosporium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* y *Pneumocystis jirovecii* y los microorganismos fúngicos patógenos que producen trehalosa por la acción del sistema inmunitario de dicho mamífero.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por añadir a dicha muestra una cantidad conocida de al menos un compuesto de referencia, por medio de lo cual y al comparar la intensidad de la señal obtenida para dicho compuesto de interés dado con la señal obtenida por dicho compuesto de referencia, se puede determinar la cantidad de dicho compuesto de interés dado que está contenido en dicha muestra.

10 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por determinar la relación de la intensidad de la señal que corresponde al compuesto de interés dado en función de la intensidad de una señal endógena ubicua, en donde dicha señal endógena se ha identificado antes y es facultativamente es específica del tipo de líquido biológico del cual procede la muestra, por medio de lo cual se puede cuantificar dicho compuesto de interés dado que está contenido en dicha muestra.

15 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por elegir dicho líquido biológico entre la sangre venosa y la arterial, el suero, los líquidos de las mucosas genitales, los líquidos de las vías aéreas, en especial el líquido que procede del lavado broncoalveolar, de la aspiración bronquial, de la aspiración traqueal, de la expectoración, los esputos, los líquidos que han servido para recoger los fragmentos de la piel y las faneras, los líquidos de derrame, los líquidos de las cavidades cerradas, en especial el líquido cefalorraquídeo, los líquidos del aparato digestivo o urinario, y los líquidos obtenidos a partir del aplastamiento de fragmentos de biopsia.

14. Kit que permite la realización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por comprender:

– al menos un primer soporte que comprende una fase sólida hidrófoba que permite la realización de una cromatografía de fase inversa;

25 – al menos un segundo recipiente que comprende una abertura de entrada, una abertura de salida y que contiene un relleno de carbón activo sólido, dispuesto entre dicha abertura de entrada y dicha abertura de salida,

por comprender dicho soporte una fase sólida hidrófoba que permite la realización de una cromatografía de fase inversa y dicho recipiente que contiene dicho relleno de carbón activo se eligen, independientemente el uno del otro, entre los elementos siguientes: una placa, un pocillo, una columna, un tubo y una placa que comprende muchos pocillos;

por comprender además una placa de MALDI,

por prepararse dicho relleno mediante la mezcla de una cantidad igual de carbón activo de tierra de diatomeas, y por presentarse preferiblemente dicha fase sólida hidrófoba en forma disjunta y comprender un material magnético.

35 15. Kit según la reivindicación 14, caracterizado por comprender una cantidad dada de un compuesto de referencia elegido entre los monosacáridos, los disacáridos y los trisacáridos, facultativamente marcados con un isótopo radiactivo, y en especial la trehalosa deuterada y/o además una cantidad dada de una enzima apta para reaccionar con los complejos formados por los polisacáridos y/o los oligosacáridos y/o los monosacáridos contenidos en un líquido biológico.

40

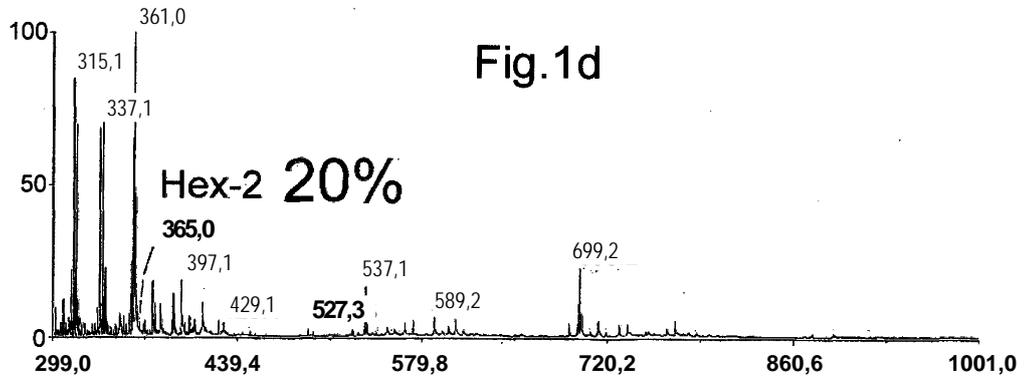
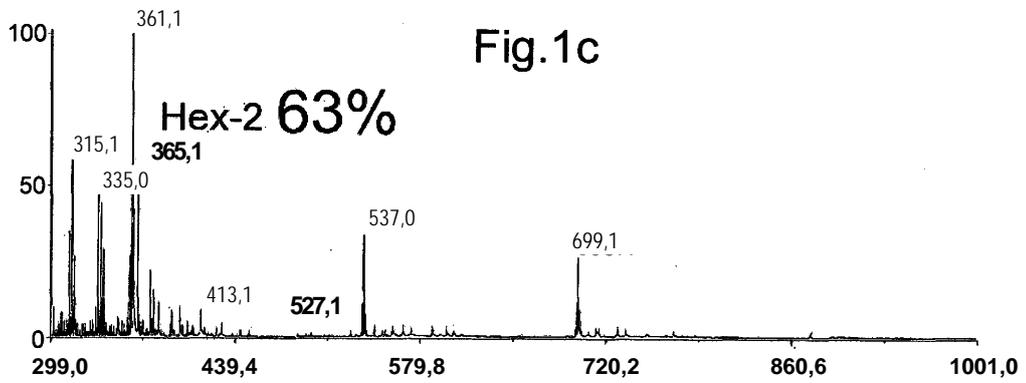
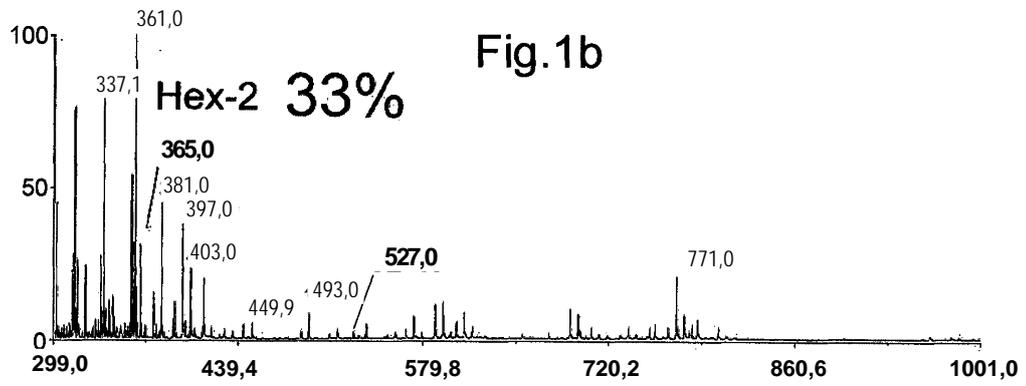
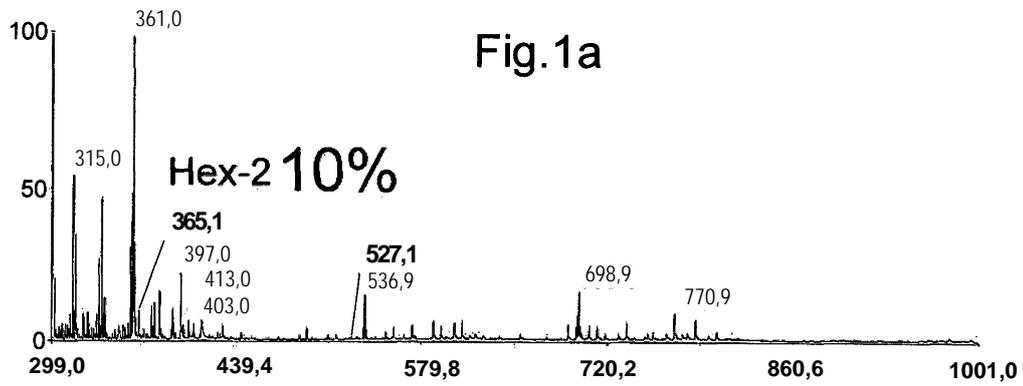


Fig.2a

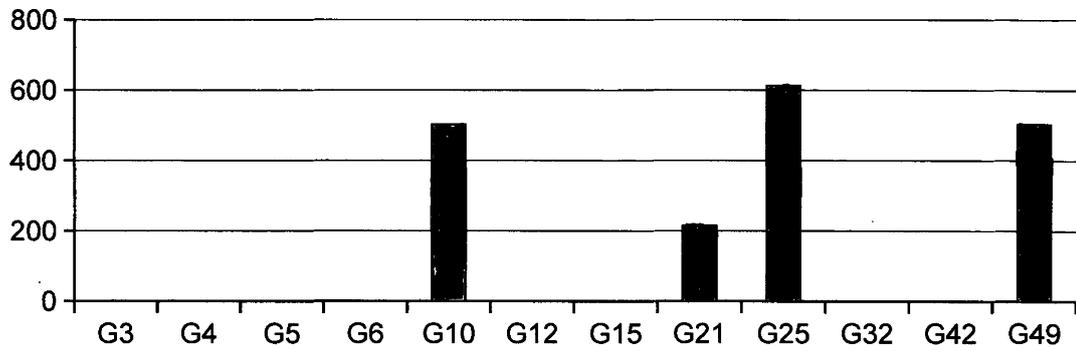


Fig.2b

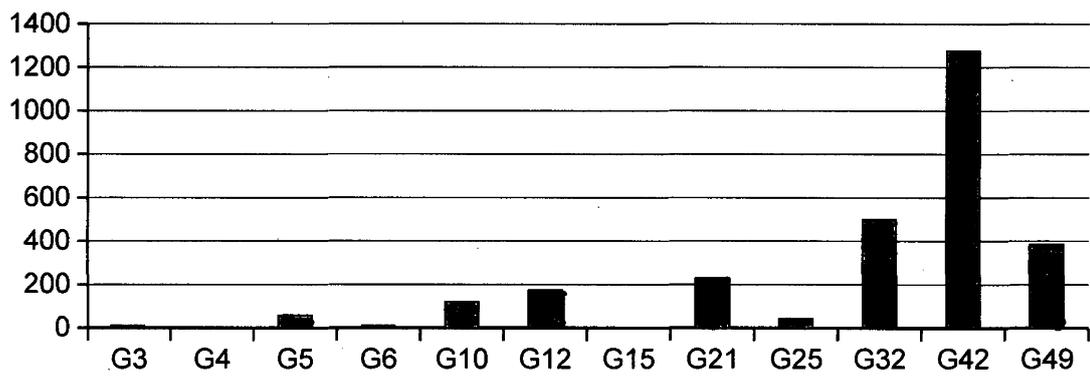


Fig.2c

