

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 547**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2000 PCT/EP2000/04714**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2000 WO00073499**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2000 E 00940266 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 1185702**

54 Título: **Sondas de ácido nucleico y métodos para detectar patógenos fúngicos clínicamente importantes**

30 Prioridad:

**28.05.1999 EP 99870109
11.06.1999 US 138621 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2017

73 Titular/es:

**FUJIREBIO EUROPE N.V. (33.3%)
Technologiepark 6
9052 Gent , BE;
ENTERPRISE IRELAND (TRADING AS
BIORESEARCH IRELAND) (33.3%) y
NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND GALWAY
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**SMITH, TERRY;
MAHER, MAJELLA;
MARTIN, CARA;
JANNES, GEERT;
ROSSAU, RUDI y
VAN DER WEIDE, MARJO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 621 547 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

Sondas de ácido nucleico y métodos para detectar patógenos fúngicos clínicamente importantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la detección e identificación de hongos clínicamente importantes. Más particularmente, la presente invención se refiere a sondas específicas de especie que se originan a partir de la región espaciadora transcrita interna (ITS) 1 de ADNr para la detección de especies fúngicas tales como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans* en muestras clínicas, y a métodos que usan dichas sondas.

10 Antecedentes de la invención

Las infecciones fúngicas están convirtiéndose en una causa cada más significativa de morbimortalidad. En el transcurso de los años 1980, la tasa de infección en el torrente sanguíneo por *Candida albicans* creció en un 48%. Los pacientes que corren un riesgo particular de micosis son aquellos con defensas inmunitarias reducidas, no solamente pacientes con trasplantes de órganos o aquellos que reciben tratamiento intensivo para el cáncer, sino también diabéticos o personas con catéteres permanentes.

15 Las infecciones fúngicas representan un gran número de diagnósticos definitivos de SIDA y complican la evolución de la mayor parte de pacientes con enfermedad por VIH. La OMS estima que en el año 2000 habrá más de 20 millones de adultos infectados por VIH vivos. El impacto de la enfermedad fúngica en pacientes con SIDA es inmenso debido a su naturaleza recurrente. De los 25 estados que componen la definición de caso para el SIDA, siete están provocados por patógenos fúngicos. De las enfermedades indicadoras de SIDA más frecuentes que se producen entre hombres homosexuales/bisexuales, el 70% fueron infecciones fúngicas, siendo la neumonía por *Pneumocystis carinii* (NPC) la más común de todas las enfermedades.

20 Los hongos aparecen en una amplia variedad de formas, desde levaduras (organismos unicelulares que se reproducen por gemación) y mohos (que aparecen como filamentos largos conocidos como hifas) hasta los hongos dimórficos que tienen una capacidad camaleónica para comportarse como levaduras en un entorno y como mohos en otro.

25 De los muchos tipos diferentes de hongos, solamente unos pocos tienen el potencial para provocar enfermedad, y la intensidad de sus efectos varía ampliamente. Las micosis superficiales, provocadas por un hongo tal como *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton* o *Sporothrix* que crecen sobre la superficie corporal (piel, uñas o pelo) son infecciones desagradables pero habitualmente leves.

30 Las micosis profundas, que afectan a los órganos internos, a menudo son potencialmente mortales. Los hongos *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* son responsables de micosis profundas, y plantean enormes retos para los médicos clínicos. Clínicamente, las candidiasis y aspergilosis representan entre el 80% y el 90% de las infecciones fúngicas sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. Recientemente, se encuentran con más frecuencia infecciones provocadas por *Pneumocystis carinii* en pacientes con SIDA.

35 *Pneumocystis carinii* es un agente infeccioso oportunista importante en pacientes inmunocomprometidos, que provoca neumonía que tiene una alta tasa de mortalidad si el paciente no se trata apropiadamente (Stringer J.R., 1996). Por tanto, el diagnóstico oportuno de neumonía por *P. carinii* (NPC) es crítico para el tratamiento del paciente. Actualmente, el diagnóstico de NPC se realiza habitualmente mediante la demostración morfológica de organismos en líquido de lavado broncoalveolar (LBA), esputo inducido o muestras obtenidas mediante biopsia de pulmón a cielo abierto (Cregan *et al.*, 1990). Aunque el diagnóstico morfológico es rápido, requiere personal sumamente experimentado y buenas muestras. Dada la incapacidad para cultivar *P. carinii in vitro*, se han usado métodos basados en biología molecular para la detección de este patógeno y para estudiar la epidemiología de *P. carinii* (Lu *et al.*, 1995).

40 Las candidiasis comprenden una gama de infecciones oportunistas en seres humanos que pueden producirse en formas o bien agudas o bien crónicas. Las infecciones por *Candida* surgen frecuentemente en las superficies mucosas de la boca o la vagina. Las candidiasis hiperplásicas crónicas de la mucosa oral son de particular importancia puesto que se han asociado con el desarrollo de carcinoma de células escamosas. Además de lesiones superficiales, pueden producirse infecciones por *Candida* más profundas, tales como esofagitis y endocarditis, particularmente en individuos inmunocomprometidos (Heimdahl *et al.*, 1990).

45 En el pasado, muchos estudios de candidiasis no han identificado aislados candidiásicos a nivel de especie. En efecto, en el caso de candidiasis hiperplásicas crónicas, la notificación se limita habitualmente a la presencia de estructuras que concuerdan con hifas candidiásicas tras el examen histológico de tejido con lesión. Sin embargo, cada vez se reconoce más que ambas especies y subespecies de *Candida* difieren en su capacidad para provocar enfermedad. Los métodos tradicionales usados para la identificación y tipificación de aislados clínicos de *Candida*

5 incluyen análisis morfológico y bioquímico (Williamson *et al.*, 1986), morfotipificación de colonias (Soll, D.R., 1992), tipificación con resistogramas (Sobczak, H., 1985) y serotipificación (Brawner, D.L., 1991). Estas técnicas llevan mucho tiempo y el hecho de que se basen en la expresión fenotípica hace que sean potencialmente poco fiables. Un método alternativo sería uno basado en propiedades genotípicas. Se han usado métodos genotípicos para la detección y tipificación de cepas de *Candida* (Bart-Delabese *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1994), pero se han usado con menos frecuencia para la diferenciación de especies.

Otras especies de *Candida* médicamente importantes, junto al patógeno aislado más frecuentemente *C. albicans*, son *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. Estas últimas especies son mucho menos susceptibles a los fármacos antifúngicos clásicos.

10 El género *Cryptococcus* contiene muchas especies, en las que *Cryptococcus neoformans* se considera el único patógeno humano. La infección criptocócica inicial comienza mediante la inhalación del hongo en los pulmones, habitualmente seguido por la propagación hematológica al cerebro y las meninges. Se observa la afectación de la piel, los huesos y las articulaciones, y *Cryptococcus neoformans* se cultiva a menudo a partir de la orina de pacientes con infección diseminada. En pacientes sin infección por VIH, habitualmente se observa criptococosis, particularmente meningitis criptocócica, en asociación con estados subyacentes tales como lupus eritematoso, sarcoidosis, leucemia, linfomas y síndrome de Cushing (Chuck *et al.*, 1989).

15 La criptococosis es una de las enfermedades definitorias asociadas con el SIDA. Se considera que los pacientes con criptococosis y evidencia serológica de infecciones por VIH tienen SIDA. Casi en el 45% de los pacientes con SIDA, se notificó criptococosis como la primera enfermedad definitoria de SIDA. Debido a que ninguno de los signos o síntomas representativos de la meningitis criptocócica (tales como cefalea, fiebre y malestar) son suficientemente característicos como para distinguirla de otras infecciones que se producen en pacientes con SIDA, la determinación de los títulos de antígeno criptocócico y el cultivo de sangre y líquido cefalorraquídeo son útiles al realizar un diagnóstico (Chuck *et al.*, 1989).

20 El diagnóstico clínico de criptococosis pulmonar en pacientes sin enfermedades subyacentes generalmente es difícil. Puesto que el diagnóstico se establece a menudo solamente mediante el examen de tejido obtenido a partir de muestras de biopsia de pulmón, son necesarios otros métodos más sensibles y específicos para la detección simple y rápida del hongo. Un enfoque de este tipo implica la detección de antígenos fúngicos en suero (Kohn *et al.*, 1993). Sin embargo, las evaluaciones de ensayos serológicos para detectar antígeno criptocócico mostraron reacciones de falso positivo con sueros de pacientes infectados con *Trichosporon beigeli* (Kohn *et al.*, 1993).

25 La aspergilosis se considera ahora la segunda infección fúngica más común que requiere hospitalización. En pacientes con cultivos positivos para el hongo, las especies de *Aspergillus* son el segundo aislado más común después de las especies de *Candida* (Goodwin *et al.*, 1992). Las respuestas patológicas provocadas por miembros del género *Aspergillus* varían en cuanto a intensidad y evolución clínica y pueden producirse como infecciones tanto primarias como secundarias (Rinaldi, M.G., 1988).

30 La aspergilosis invasiva (AI) es un estado potencialmente mortal en pacientes inmunocomprometidos, particularmente aquellos tratados con quimioterapia para tumores malignos hematológicos o aquellos que reciben corticosteroides a altas dosis (Fisher *et al.*, 1981). Un diagnóstico temprano de aspergilosis es de gran importancia porque el tratamiento temprano puede resolver esta infección potencialmente mortal. Desafortunadamente, el diagnóstico de AI sigue siendo difícil y a veces se confirma solamente en la autopsia. En la actualidad, se establece un diagnóstico firme mediante examen histológico de muestras de tejido obtenidas durante biopsia de pulmón a cielo abierto así como mediante la detección de los hongos patógenos causales en muestras clínicas. Pruebas serológicas tales como las que implican la detección de anticuerpos para especies de *Aspergillus* son menos útiles dadas las escasas respuestas de anticuerpos en pacientes inmunocomprometidos. Además, los métodos usados para detectar antígenos de *Aspergillus* circulantes, tales como radioinmunoensayo, ensayo de inmunotransferencia, inmunoensayo enzimático y la prueba de aglutinación en látex, tienen escasa sensibilidad (Rogers *et al.*, 1990; Sabetta *et al.*, 1985).

Recientemente, para el diagnóstico de AI, se ha usado PCR para detectar ADN específico para especies de *Aspergillus* en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con AI (Bretage *et al.*, 1995).

35 El diagnóstico en laboratorio de infecciones fúngicas es a menudo problemático. A menudo los hongos son difíciles de cultivar a partir de muestras fácilmente accesibles, tales como orina, sangre o esputo del paciente. Y debido a que los hongos son de naturaleza ubicua, un único cultivo positivo de orina o esputo es de valor clínico limitado. La posibilidad de contaminación es siempre una consideración muy real cuando se interpretan resultados analíticos. Un hallazgo de *Aspergillus* en esputo, por ejemplo, de manera aislada es de valor limitado y debe evaluarse en el contexto de los signos y síntomas clínicos del paciente. A menudo son necesarias biopsias de tejido (de pulmón o cerebro) para el diagnóstico definitivo y deben llevarse a cabo cultivos de sangre para todos los pacientes. El aislamiento de levaduras, tales como *Candida*, de la sangre es sumamente predictivo de enfermedad fúngica invasiva. Sin embargo, se cultiva *Candida* a partir de sangre en menos del 20% de pacientes con candidiasis diseminada.

Debido a la limitación de las técnicas de cultivo, muchos investigadores han intentado encontrar anticuerpos específicos frente a *Candida* y *Aspergillus* en suero usando el título de anticuerpos como criterio de diagnóstico. Sin embargo, la sensibilidad de estos ensayos es muy baja, a menudo de menos del 50%, ya que muchos pacientes inmunocomprometidos tienen dificultad para producir una respuesta inmunitaria adecuada. Debido a su escasa sensibilidad, el inmunodiagnóstico de infección fúngica no es rentable. A menudo proporciona un resultado de falso negativo, y también puede conducir a que se diagnostiquen infecciones fúngicas cuando no existe ninguna, lo que conduce a la administración inapropiada de fármacos antifúngicos.

Debido a las deficiencias de la detección de anticuerpos, se ha prestado mucha atención a pruebas que detecten antígenos o metabolitos fúngicos en líquidos corporales. Un problema importante es la naturaleza transitoria de los antígenos en suero. Para la mayor parte de las pruebas de detección de antígenos, la sensibilidad global es inaceptablemente baja, aunque múltiples muestras de suero mejoran algo la detección de antigenemia.

Además, ninguno de los métodos citados anteriormente permite la identificación del hongo hasta el nivel de especie. Los regímenes de tratamiento eficaces de enfermedades fúngicas requieren una identificación correcta del hongo a nivel de especie. Por ejemplo, determinadas especies de *Candida* tales como *C. glabrata* y *C. krusei* son menos susceptibles a los fármacos de azol clásicos.

El diagnóstico de micosis es un área en la que existe una gran necesidad de nuevas técnicas sofisticadas. Tal como se ha observado ya en virología y en cierta medida en bacteriología, el uso de sondas de ADN específicas, acompañadas por sistemas de amplificación de ADN o ARN, para el diagnóstico de infección fúngica puede demostrar ser útil, y puede revolucionar el diagnóstico en laboratorio y el tratamiento de pacientes con enfermedad fúngica grave.

Recientemente, se han descrito varios métodos para la detección de patógenos fúngicos usando tecnología de ADN. Frecuentemente se han usado genes que codifican para el ARNr, especialmente los genes de ARNr 18S y 28S, como diana para desarrollar sondas específicas de especie (por ejemplo, el documento US 5.827.651; Einsele *et al.* 1997). Otros informan sobre el uso de la región espaciadora transcrita interna (ITS), ubicada entre los genes de ARNr 18S y 28S, como región diana para la detección específica de hongos. Lu *et al.* (1995) describen la subtipificación de cepas de *Pneumocystis carinii* usando sondas que se originan a partir de la región ITS. Williams *et al.* (1995) demuestran la identificación de especies de *Candida* mediante amplificación por PCR y análisis de polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción de las regiones amplificadas de ITS. Kumeda y Asao (1996) usan amplificación por PCR y análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (sscp) de la región ITS para diferenciar especies de *Aspergillus*. El documento US 5.693.501 describe cebadores específicos que se originan a partir de la región ITS-1 para la detección de *Histoplasma capsulatum*. Varias solicitudes de patente (documentos WO98/50584; WO95/29260; US 5.814.463; US 5.955.274) describen la detección y diferenciación de diferentes patógenos fúngicos de plantas basándose en la amplificación específica de o hibridación con secuencias de la región ITS.

Se ha descrito la detección de especies de *Candida* basándose en secuencias de la región ITS-2 por varios grupos. Fujita *et al.* (1995) describen sondas de ITS-2 para diferentes especies de *Candida* y métodos para la detección y diferenciación después de una etapa de amplificación general con cebadores universales ITS3 e ITS4. Elie *et al.* (1998) y varias solicitudes de patente relacionadas (documentos WO98/11257; WO99/06596; US 5.426.027) describen un conjunto de 18 sondas de especies de *Candida* que se originan a partir de la región ITS-2. Shin *et al.* (1999) describen la detección y diferenciación de tres especies de *Candida* en un único tubo de reacción, usando amplificación con los cebadores universales ITS3 e ITS4 e hibridación con las sondas de ITS-2. Botelho y Planta (1994) describen sondas para *Candida albicans*, derivadas de las regiones ITS-1 o ITS-2. Las sondas de región ITS-2 muestran una mejor especificidad de especie.

No se han descrito aún sondas específicas de especie que se originan a partir de la región ITS de otras especies fúngicas médicamente importantes, tales como especies pertenecientes a *Aspergillus*, *Cryptococcus* o *Pneumocystis*. Además, no se han descrito aún métodos para la detección y diferenciación simultáneas de una amplia variedad de especies fúngicas con importancia clínica. Tales métodos proporcionarían una respuesta a la necesidad de la detección rápida, sumamente sensible y específica de especie de patógenos fúngicos en muestras clínicas, permitiendo una aplicación rápida de regímenes de tratamiento eficaces, y la monitorización estrecha de la progresión de un paciente.

Sumario y objetivos de la invención

La presente descripción describe moléculas de ácido nucleico (sondas de oligonucleótidos) que hibridan específicamente con la región ITS de diferentes especies fúngicas con importancia clínica. Más particularmente, se describen sondas que hibridan selectivamente con la región ITS-1 y/o ITS-2 de varias especies de *Candida*, especies de *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocystis carinii*. Las sondas más preferidas de la presente invención están ubicadas en la región ITS-1, que separa los genes de ARNr 18S y 5.8S.

Además, se describen métodos para la detección y diferenciación rápidas, sensibles y específicas de estas especies fúngicas patógenas. En particular, se describen métodos para la detección y diferenciación simultáneas de

diferentes especies fúngicas en un único ensayo de hibridación. Tales métodos de detección multiparamétricos pueden ser particularmente útiles en la detección de infecciones oportunistas en pacientes con sistemas inmunitarios afectados, tales como pacientes con trasplantes de órganos, pacientes que reciben tratamientos intensivos contra el cáncer, diabéticos o pacientes con SIDA.

- 5 Los métodos y las sondas descritos son herramientas útiles en el diagnóstico clínico de infecciones fúngicas. Además, pueden usarse para monitorizar la enfermedad y para guiar una terapia antifúngica apropiada. Las sondas y los métodos descritos también pueden usarse como herramientas de investigación en laboratorio para estudiar los diferentes organismos fúngicos y su relación filogenética.

10 Las especies fúngicas detectadas e identificadas por las sondas y los métodos de la descripción incluyen *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocystis carinii*. Los métodos de la presente descripción permiten detectar cualquiera de las especies mencionadas anteriormente o bien solas o bien en combinación entre sí, dependiendo del conjunto de sondas aplicado en el método. Todas las sondas se diseñan de tal manera que sean funcionales en condiciones de hibridación idénticas, permitiendo por tanto cualquier posible combinación. El conjunto particular de sondas combinadas en un método dado puede depender de varios parámetros *ad hoc*, tales como: el tipo de muestra (vías respiratorias, aparato genitourinario, tracto gastrointestinal, líquido cefalorraquídeo, muestras de sangre, biopsias de piel o tejido...), los síntomas clínicos del paciente, el nivel de especificidad deseado (género, especies, cepa), el tipo de aplicación (ensayo de selección, ensayo de confirmación, monitorización de terapia, herramienta de investigación para caracterización de cepas, epidemiología...).

15 Por tanto, es un objeto de la presente descripción proporcionar sondas de ácido nucleico y cebadores para la detección e identificación específicas de varios patógenos fúngicos de importancia clínica.

Más particularmente, es un objeto de la presente descripción proporcionar sondas de ácido nucleico que hibridan específicamente con la región ITS (espaciador transcrito interno) de diferentes patógenos fúngicos. Las sondas dadas a conocer en la presente invención hibridan con la región ITS-1 o ITS-2, lo más preferiblemente con la región ITS-1.

25 En particular, es un objeto de la presente descripción proporcionar sondas para la detección e identificación de varias especies de *Candida*, incluyendo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*, de varias especies de *Aspergillus*, incluyendo *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. nidulans* y *A. fumigatus*, de *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocystis carinii*.

30 Además, es un objeto de la presente descripción proporcionar métodos rápidos, sensibles y específicos para detectar e identificar estos patógenos fúngicos en muestras clínicas o en cultivos.

También es un objeto de la presente descripción proporcionar un método de tratamiento rápido y eficaz de muestras de sangre, que dé como resultado una liberación de los ácidos nucleicos de células fúngicas presentes en la muestra de sangre, y una retirada de posibles inhibidores de PCR presentes en la muestra de sangre.

35 Además, es un objeto de la presente descripción proporcionar métodos que permitan una detección e identificación simultáneas de estas especies fúngicas presentes posiblemente en una muestra, en un único ensayo.

También es un objetivo de la presente descripción proporcionar métodos para el diagnóstico clínico, la monitorización y el tratamiento terapéutico de enfermedades fúngicas.

40 Estos y otros objetos, incluyendo ventajas y características específicas de la presente invención resultarán evidentes en la descripción detallada de las varias realizaciones más adelante en el presente documento.

Definiciones

45 El término "sonda" se refiere a oligonucleótidos específicos de secuencia monocatenarios aislados que tienen una secuencia que es complementaria a la secuencia diana que va a detectarse. La complementariedad de la secuencia de la sonda con la secuencia diana es esencial y completa para la parte central de la sonda (= núcleo de la sonda), en la que no se permiten apareamientos incorrectos con la secuencia diana. Hacia los extremos (3' o 5') de la sonda, pueden producirse a veces variaciones menores en la secuencia de la sonda, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda. La "secuencia de núcleo" de la sonda es la parte central, y representa más del 70%, preferiblemente más del 80%, con la mayor frecuencia más del 90% de la secuencia de la sonda total.

50 Las sondas de la presente invención hibridan específicamente con las especies fúngicas para las que están diseñadas. Este comportamiento de hibridación específica de especie se ilustrará ampliamente en la sección de ejemplos. En la totalidad de esta invención, las secuencias de las sondas se representan siempre desde el extremo 5' hasta el extremo 3'. Se representan como moléculas de ADN monocatenario. Sin embargo, debe entenderse que estas sondas también pueden usarse en su forma de ARN (en la que se reemplaza T por U) o en su forma complementaria.

55

- Las sondas de la presente invención pueden formarse mediante la clonación de plásmidos recombinantes que contienen insertos que comprenden las secuencias de nucleótidos correspondientes, si fuese necesario mediante la escisión de estos últimos de los plásmidos clonados usando las nucleasas adecuadas y recuperándolos, por ejemplo mediante fraccionamiento según el peso molecular. Las sondas según la presente invención también pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo mediante el método de fosfo-triéster convencional.
- Preferiblemente, las sondas de la presente invención tienen una longitud de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 nucleótidos. Son posibles variaciones en la longitud de las sondas y debe quedar claro que, puesto que la parte central de la sonda es esencial para sus características de hibridación, pueden ser admisibles posibles desviaciones de la secuencia de la sonda frente a la secuencia diana hacia la cabeza y la cola de la sonda, especialmente cuando se usan secuencias de sonda más largas. Estas sondas variantes, que pueden diseñarse a partir del conocimiento común en la técnica, deben sin embargo evaluarse siempre experimentalmente, con el fin de comprobar si dan como resultado características de hibridación equivalentes a las de las sondas originales.
- El término "aislado" tal como se usa en el presente documento significa que los oligonucleótidos de la presente invención están aislados del entorno en el que se producen de manera natural. En particular, significa que ya no forman parte del genoma de la especie fúngica respectiva, y por tanto se liberan de los nucleótidos flanqueantes restantes en la región ITS de dicha especie fúngica. Por el contrario, pueden añadirse nuevas (= heterólogas) regiones flanqueantes al extremo 3' y/o 5' de la sonda, con el fin de potenciar su funcionalidad. Características funcionales proporcionadas posiblemente por dichas secuencias flanqueantes heterólogas son, por ejemplo, facilidad de unión a un soporte sólido, facilidad de síntesis, facilidad de purificación, función de marcaje, etc.
- El término ácido nucleico "complementario" tal como se usa en la presente invención significa que las secuencias de ácido nucleico pueden formar una doble hélice con apareamiento perfecto de bases.
- El término "hibridación específica de especie" se refiere a una hibridación selectiva de las sondas de la invención con los ácidos nucleicos de la especie que va a detectarse (= organismo diana), y no con ácidos nucleicos que se originan a partir de cepas pertenecientes a otras especies (= organismos no diana). La hibridación específica de especie en el contexto de la presente invención también implica una hibridación selectiva de las sondas de la invención con la región ITS (= región diana) del organismo que va a detectarse, y limita la hibridación "al azar" ocasional con otras secuencias genómicas. La especificidad de especie es una característica que tiene que determinarse experimentalmente. Aunque a veces pueda predecirse teóricamente, la especificidad de especie puede referirse solamente a aquellos organismos no diana que se han sometido a prueba experimentalmente.
- El término "cebador" se refiere a una secuencia de oligonucleótido monocatenario aislado que puede actuar como punto de inicio para la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a la hebra de ácido nucleico que va a copiarse. La longitud y la secuencia del cebador deben ser tales que permitan cebar la síntesis de los productos de extensión. Preferiblemente, el cebador tiene aproximadamente 5-50 nucleótidos de largo, más preferiblemente desde 10 hasta 40 nucleótidos de largo. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, así como de las condiciones de uso de cebadores tales como temperatura y fuerza iónica.
- Los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas también pueden comprender análogos de nucleótidos tales como fosforotiatos (Matsukura *et al.*, 1987), alquilfosforotiatos (Miller *et al.*, 1979) o ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1993) o pueden contener agentes intercalantes (Asseline *et al.*, 1984).
- Como la mayor parte de las demás variaciones o modificaciones introducidas en las secuencias de ADN originales de la invención, estas variaciones requerirán adaptaciones con respecto a las condiciones en las que debe usarse el oligonucleótido para obtener la especificidad y sensibilidad requeridas. Sin embargo, los resultados finales de la hibridación serán esencialmente los mismos que los obtenidos con los oligonucleótidos sin modificar.
- La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa con el fin de influir positivamente sobre características tales como cinética de hibridación, reversibilidad de la formación de híbridos, estabilidad biológica de las moléculas oligonucleotídicas, etc.
- El término "muestra" representa cualquier material que contiene posiblemente ácidos nucleicos fúngicos, que puede que tengan que liberarse de las células. Preferiblemente, el término "muestra" se refiere a una muestra clínica, tal como una muestra tomada de la sangre, de las vías respiratorias (esputo, lavado broncoalveolar (LBA)), del líquido cefalorraquídeo (LCR), del aparato genitourinario (secreciones vaginales, orina), del tracto gastrointestinal (saliva, heces) o biopsias tomadas de órganos, tejido, piel cada una. El término "muestra" también puede referirse a una muestra de células fúngicas en cultivo, o bien en cultivo en medio líquido o bien sobre medios de cultivo sólidos. El ADN fúngico presente en dichas muestras puede prepararse o extraerse según cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica.
- El término "ITS" es el término abreviado para la región espaciadora transcrita interna ubicada entre los genes de ARNr 18S y 28S en el operón de ARNr del ADN nuclear de la especie fúngica (para una revisión, véase White *et al.* 1990). La región ITS se subdivide en la región ITS-1, que separa los genes de ARNr 18S y 5.8S, y la región ITS-2 que se encuentra entre los genes de ARNr 5.8S y 28S.

5 El material "diana" en estas muestras puede ser o bien ADN genómico o bien ARN ribosómico precursor del organismo que va a detectarse (= organismo diana) o versiones amplificadas de los mismos. Estas moléculas se denominan ácidos nucleicos diana. Más específicamente, el ácido nucleico diana en el genoma es la región espaciadora transcrita interna (ITS). Según una realización preferida, la región diana en el genoma es la región ITS-1. La secuencia diana es aquella parte de la secuencia de ITS que es totalmente complementaria a la parte de núcleo de la sonda.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona un método para la detección y diferenciación simultáneas de las diferentes especies fúngicas patógenas siguientes *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans* en combinación entre sí, en un único ensayo, que incluye:

(i) liberar, aislar y/o concentrar los ácidos nucleicos de los patógenos fúngicos presentes posiblemente en la muestra,

15 (ii) si es necesario, amplificar la región espaciadora transcrita interna (ITS) de dichos ácidos nucleicos con al menos un par de cebadores universales fúngicos,

(iii) hibridar los ácidos nucleicos de la etapa (i) o (ii) con las siguientes sondas de oligonucleótidos específicas de especie de ITS-1, seleccionándose estas sondas para detectar y diferenciar dichas diferentes especies fúngicas patógenas, que comprende:

- para *Candida albicans*:

20 al menos una de GTCTAAACTTACAACCAATT (SEQ ID NO 1)

TGTCACACCAGATTATTACT (SEQ ID NO 2) o

TATCAACTTGTCACACCAGA (SEQ ID NO 3),

- para *Candida parapsilosis*:

TGCCAGAGATTAAACTCAAC (SEQ ID NO 5),

25 - para *Candida tropicalis*:

GGTTATAACTAAACCAAAC (SEQ ID NO 6),

- para *Candida krusei*:

GGAATATAGCATATAGTCGA (SEQ ID NO 9),

- para *Candida glabrata*:

30 GAGCTCGGAGAGAGACATC (SEQ ID NO 10),

- para *Cryptococcus neoformans*:

CATCTACACCTGTGAACTGT (SEQ ID NO 15),

- para *Aspergillus flavus*:

GTTTACTGTACCTTAGTTGCT (SEQ ID NO 18),

35 - para *Aspergillus versicolor*:

CCTCTCGGGGGCGAGCC (SEQ ID NO 21),

- para *Aspergillus nidulans*:

CCGAGTGCGGCTGCCTC (SEQ ID NO 22),

- para *Aspergillus fumigatus*

40 GTTGATTATCGTAATCAGT (SEQ ID NO 26)

o variantes de dichas sondas, difiriendo dichas variantes de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de uno o dos nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia de nucleótidos, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda,

- o los equivalentes de ARN de dichas sondas, en los que se reemplaza T por U,
- o los ácidos nucleicos complementarios de dichas sondas, y
- (iv) detectar los complejos de hibridación formados en la etapa (iii).

La presente invención también se refiere a un conjunto de moléculas oligonucleotídicas aisladas que comprende las moléculas oligonucleotídicas dadas a conocer en la reivindicación 5, o variantes de dichas sondas, difiriendo dichas variantes de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de uno o dos nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia de nucleótidos, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda, o los equivalentes de ARN de dichas sondas, en los que se reemplaza T por U, o las moléculas complementarias de dichas sondas.

Las sondas usadas en el método para la detección de patógenos fúngicos hibridan todas con la región espaciadora transcrita interna de especies fúngicas. Más particularmente, tal como se ilustra adicionalmente en la sección de ejemplos (véase la tabla 1), las sondas citadas anteriormente hibridan selectivamente con las siguientes regiones diana: región ITS-1 de *Candida albicans* (sondas representadas por SEQ ID NO 1, 2, 3, 33, 34, 35), región ITS-1 de *C. parapsilosis* (sondas representadas por SEQ ID NO 4,5), región ITS-1 de *C. tropicalis* (sondas representadas por SEQ ID NO 6, 36), región ITS-1 de *C. kefyr* (sondas representadas por SEQ ID NO 7, 8), región ITS-1 de *C. krusei* (sondas representadas por SEQ ID NO 9, 37), región ITS-1 de *C. glabrata* (sondas representadas por SEQ ID NO 10), región ITS-1 de *C. dubliniensis* (sondas representadas por SEQ ID NO 13, 38), región ITS-2 de *C. dubliniensis* (sondas representadas por SEQ ID NO 11, 12), región ITS-1 de *Cryptococcus neoformans* (sondas representadas por SEQ ID NO 14, 15, 16, 39), región ITS-2 de *Cryptococcus neoformans* (sondas representadas por SEQ ID NO 17), región ITS-1 de *Aspergillus flavus* (sondas representadas por SEQ ID NO 18, 19, 20, 42), región ITS-1 de *Aspergillus versicolor* (sondas representadas por SEQ ID NO 21, 43), región ITS-1 de *Aspergillus nidulans* (sondas representadas por SEQ ID NO 22, 23, 24, 25), región ITS-1 de *Aspergillus fumigatus* (sondas representadas por SEQ ID NO 26, 41), región ITS-2 de *Aspergillus fumigatus* (sondas representadas por SEQ ID NO 27, 40), región ITS-1 de *Pneumocystis carinii* (sondas representadas por SEQ ID NO 31, 32) y región ITS-2 de *Pneumocystis carinii* (sondas representadas por SEQ ID NO 28, 29, 30).

La expresión "variantes" de las sondas engloba sondas representadas por una secuencia variante que difiere de cualquiera de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de 1 ó 2 nucleótidos en el extremo 3' y/o 5' de la secuencia de la sonda, en la medida en que tal delección o adición no cambie el carácter específico de especie de la sonda respectiva. Se entenderá que la adición de 1 ó 2 nucleótidos en los extremos de las sondas se realizará habitualmente según la secuencia que flanquea la secuencia diana en la región ITS a partir de la que se aísla la sonda. Esto significa que normalmente se elegirá "cualquier" nucleótido para extender la secuencia de la sonda, sino solamente aquellos nucleótidos que flanquean la secuencia de la sonda en la región ITS. La información sobre las secuencias flanqueantes de las sondas puede obtenerse fácilmente alineando la secuencia de la sonda con la secuencia de ITS. La propia secuencia de ITS puede obtenerse secuenciando la región ITS, después de la clonación o, por ejemplo, amplificación por PCR de la región ITS con pares de cebadores universales fúngicos, o puede recuperarse a partir de fuentes disponibles para el público.

Las sondas y sondas variantes tal como se describieron anteriormente también pueden extenderse en el extremo 3' y/o 5' con secuencias flanqueantes distintas de ITS (= heterólogas). Sin afectar al comportamiento de hibridación intrínseco de la sonda, este proceso de adición de cola heteróloga puede proporcionar ciertas características adicionales a la molécula de la sonda, tales como por ejemplo adhesión a una superficie mediante adición de una cola de poli-T, tal como se describe más adelante en la sección de ejemplos.

El método descrito anteriormente puede aplicarse para la detección de una única especie fúngica, denominada "detección de un solo analito", por ejemplo en placas de microtitulación, o para la detección de varias especies fúngicas simultáneamente, denominada "detección multiparamétrica", por ejemplo en un ensayo de sonda en línea (LiPA, *line probe assay*). Las sondas descritas se han seleccionado de tal manera que pueden ser todas funcionales (es decir, muestran la especificidad de especie deseada) en las mismas condiciones de hibridación y lavado. Esto permite que se use el método para la detección y diferenciación simultáneas de varias especies fúngicas en un único ensayo de hibridación.

El término "par de cebadores universales fúngicos" significa que el par de cebadores amplifica la región espaciadora transcrita interna de la mayor parte de, si no de todas, las especies fúngicas. Las secuencias de "pares de cebadores universales fúngicos" se conservan filogenéticamente con el fin de permitir la amplificación dentro de diferentes especies de hongos. Están ubicados en los genes de ARNr que flanquean la región ITS, es decir en los genes de ARNr 18S, 5.8S o 28S. Puede preverse la amplificación de la región ITS completa, la región ITS-1 o la ITS-2. Se han descrito por White *et al.* (1990), entre otros, "pares de cebadores universales fúngicos" adecuados para los métodos descritos en la presente invención.

En una realización preferida, el método descrito anteriormente incluye una etapa de amplificación usando un par de cebadores universales fúngicos que se elige del siguiente grupo de pares de cebadores, tal como describen White *et al.* (1990):

ITS5 (directo): GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG e
ITS4 (inverso): TCCTCCGCTTATTGATATGC,

ITS5 (directo): GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG e
ITS2 (inverso): GCTGCGTTCTTCATCGATGC,

5 ITS1 (directo): TCCGTAGGTGAACCTGCGG e
ITS4 (inverso): TCCTCCGCTTATTGATATGC,

ITS1 (directo): TCCGTAGGTGAACCTGCGG e
ITS2 (inverso): GCTGCGTTCTTCATCGATGC,

10 ITS3 (directo): GCATCGATGAAGAACGCAGC e
ITS4 (inverso): TCCTCCGCTTATTGATATGC.

La región ITS completa puede amplificarse usando una combinación de los cebadores de ITS1 e ITS4, o los cebadores de ITS5 e ITS4. La región ITS-1 puede amplificarse usando una combinación de los cebadores de ITS1 e ITS2, o los cebadores de ITS5 e ITS2, mientras que la región ITS-2 puede amplificarse usando una combinación de los cebadores de ITS3 e ITS4.

15 Según una realización preferida, se prevé la amplificación de la región ITS-1, y se elegirán sondas de la región ITS-1. Tal como se muestra más adelante en la sección de ejemplos, la presente invención muestra que métodos basados en la amplificación de e hibridación con la región ITS-1 muestran habitualmente una mayor sensibilidad que métodos basados en la amplificación de e hibridación con la región ITS completa, o la región ITS-2 amplificada. La presente descripción muestra además que la identificación y diferenciación de la mayor parte de, si no todas, las
20 diferentes especies fúngicas enumeradas pueden lograrse usando las secuencias de sonda que se originan a partir de la región ITS-1 solamente.

Por tanto, según una realización preferida, la presente descripción proporciona un método para la detección e identificación de especies fúngicas patógenas en una muestra, que comprende al menos las siguientes etapas:

25 (i) liberar, aislar y/o concentrar los ácidos nucleicos de los patógenos fúngicos presentes posiblemente en la muestra,

(ii) amplificar la región ITS-1 de dichos ácidos nucleicos con al menos uno de los siguientes pares de cebadores según White *et al.* (1990): (ITS5 e ITS2) o (ITS1 e ITS2),

(iii) hibridar los ácidos nucleicos de la etapa (i) o (ii) con al menos una sonda seleccionada del siguiente grupo de sondas de oligonucleótidos específicas de especie:

30 GTCTAAACTTACAACCAATT (SEQ ID NO 1),

TGTCACACCAGATTACT (SEQ ID NO 2),
 TATCAACTTGTCACACCAGA (SEQ ID NO 3),
 GTAGGCCTTCTATATGGG (SEQ ID NO 4),
 TGCCAGAGATTAACCTCAAC (SEQ ID NO 5),
 GGTATAACTAAACCAAAC (SEQ ID NO 6),
 TTTCCCTATGAACTACTTC (SEQ ID NO 7),
 AGAGCTCGTCTCTCCAGT (SEQ ID NO 8),
 GGAATATAGCATATAGTCGA (SEQ ID NO 9),
 GAGCTCGGAGAGAGACATC (SEQ ID NO 10),
 GTTTTGTCTGGACAACTT (SEQ ID NO 13),
 CTTCTAAATGTAATGAATGT (SEQ ID NO 14),
 CATCTACACCTGTGAACTGT (SEQ ID NO 15),
 GGACAGTAGAGAATATTGG (SEQ ID NO 16),
 GTTACTGTACCTTAGTTGCT (SEQ ID NO 18),
 CCGCCATTCATGGCC (SEQ ID NO 19),
 CGGGGGCTCTCAGCC (SEQ ID NO 20),
 CCTCTCGGGGGCGAGCC (SEQ ID NO 21),
 CCGAGTGCGGCTGCCTC (SEQ ID NO 22),
 CCGAGTGCGGGCTGC (SEQ ID NO 23),
 GAGCCTGAATACCAAATCAG (SEQ ID NO 24),
 GAGCCTGAATACAAATCAG (SEQ ID NO 25),
 GTTGATTATCGTAATCAGT (SEQ ID NO 26),
 GCTTGCCTCGCCAAAGGTG (SEQ ID NO 31),
 TAAATTGAATTTTCAGTTTTAGAATT (SEQ ID NO 32),
 TTGTCACACCAGATTACTT (SEQ ID NO 33),
 GGTATCAACTTGTCACACCAGA (SEQ ID NO 34),
 GGTATCAACTTGTCACACCAGATT (SEQ ID NO 35),
 GGTATAACTAAACCAAACTTTT (SEQ ID NO 36),
 GGAATATAGCATATAGTCGA (SEQ ID NO 37),
 GGTTTTGTCTGGACAACTT (SEQ ID NO 38),
 CATCTACACCTGTGAACTGTTT (SEQ ID NO 39),
 GTTGATTATCGTAATCAGTT (SEQ ID NO 41),
 GAACTCTGTCTGATCTAGT (SEQ ID NO 42),
 GTCTGAATATAAAATCAGTCA (SEQ ID NO 43),

5 o variantes de dichas sondas, difiriendo dichas variantes de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de uno o dos nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia de nucleótidos, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda,

- o los equivalentes de ARN de dichas sondas, en los que se reemplaza T por U,
- o los ácidos nucleicos complementarios de dichas sondas, y
- (iv) detectar los complejos de hibridación formados en la etapa (iii).

5 La amplificación de los ácidos nucleicos puede llevarse a cabo según cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki *et al.*, 1988), la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren *et al.*, 1988), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA; Guatelli *et al.*, 1990), sistema de amplificación basado en transcripción (TAS; Kwoh *et al.*, 1989), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; Duck, 1990) o amplificación por medio de Q β replicasa (Lomeli *et al.*, 1989) o cualquier otro método adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico conocido en la técnica.

10 Por supuesto, la amplificación de los ácidos nucleicos que van a detectarse tiene la ventaja de aumentar la sensibilidad de detección. Además, usando pares de cebadores universales fúngicos, pueden desarrollarse métodos para la detección simultánea incluyendo amplificación simultánea de la región ITS de varias especies fúngicas, seguida por hibridación específica de especie. La amplificación también permite la incorporación de un marcador en los ácidos nucleicos amplificados, lo que abre diferentes vías para detectar los complejos de hibridación formados, y lo que puede aumentar de nuevo la sensibilidad de detección. El marcaje puede llevarse a cabo mediante el uso de nucleótidos marcados incorporados durante la etapa con polimerasa de la amplificación tal como se ilustra, por ejemplo, por Bej *et al.* (1990) o cebadores marcados, o mediante cualquier otro método conocido por el experto en la técnica. La naturaleza del marcador puede ser isotópica (^{32}P , ^{35}S , etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, fluoresceína, etc.). Alternativamente, por supuesto, pueden marcarse las sondas de la invención.

20 La hibridación de los ácidos nucleicos se lleva a cabo según métodos convencionales. Preferiblemente, se usan condiciones de hibridación rigurosas, es decir condiciones que permiten la diferenciación mediante hibridación entre ácidos nucleicos que difieren solamente en un único nucleótido. Ejemplos de condiciones rigurosas aplicables a las sondas de la presente invención son un tampón de hibridación de SSC (solución salina con citrato de sodio) 2x y SDS al 0,1% a una temperatura de hibridación de 50°C. Todas las sondas de la presente invención se diseñan de tal manera que muestren el comportamiento de hibridación deseado (= específica de especie) en condiciones de rigurosidad definidas por un medio de hibridación de SSC 2x y SDS al 0,1% y una temperatura de hibridación de 50°C. Por supuesto, también son adecuadas cualesquiera otras condiciones de hibridación (es decir, cualquier otra combinación de tampón de hibridación y temperatura de hibridación) que den como resultado el mismo grado de rigurosidad para las sondas de la presente invención. El diseño de las condiciones de hibridación para que cumplan determinados criterios de rigurosidad es conocimiento común en la técnica de hibridación.

La hibridación puede llevarse a cabo en disolución o sobre un soporte sólido, o bien inmovilizándose las sondas en el soporte sólido o bien inmovilizándose los ácidos nucleicos que van a detectarse. La inmovilización de los ácidos nucleicos en un soporte sólido puede realizarse covalentemente, o usando fuerzas de unión no covalentes.

35 Según una realización preferida, las sondas de oligonucleótidos de la descripción se inmovilizan en un soporte sólido, y se lleva a cabo hibridación inversa.

El término "soporte sólido" en la presente invención se refiere a cualquier sustrato al que puede acoplarse una sonda de oligonucleótido, siempre que sus características de hibridación se conserven y siempre que el fondo de la hibridación permanezca bajo. Habitualmente, el soporte sólido será una placa de microtitulación, una membrana (por ejemplo, de nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla). Antes de la aplicación a la membrana o la fijación puede resultar conveniente modificar la sonda de ácido nucleico con el fin de facilitar la fijación o mejorar la eficacia de hibridación. Tales modificaciones pueden englobar adición de cola de homopolímero, acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH₂, grupos SH, grupos carboxílicos, o acoplamiento con biotina, haptenos o proteínas.

45 Según una realización preferida, los oligonucleótidos usados en los métodos de detección descritos anteriormente se inmovilizan en un soporte sólido por medio de una secuencia de adición de cola de homopolímero (por ejemplo, poli-T) que se añade en el extremo 3' o 5' de la sonda. Dicha adición de cola puede realizarse durante la síntesis química del oligonucleótido, lo que da como resultado habitualmente una cola de poli-T en 5', o después de eso, por ejemplo mediante adición de cola enzimática usando desoxinucleotidil transferasa terminal (Pharmacia), lo que da como resultado una cola de poli-T en 3'.

50 La detección de los complejos de hibridación formados puede realizarse según cualquier método conocido en la técnica, dependiendo por supuesto el tipo de detección del tipo de marcador usado. Cuando se usa biotina como marcador, pueden usarse agentes de detección conjugados con estreptavidina, tales como por ejemplo fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, que produce una señal de precipitación de color azul, o peroxidasa del rábano conjugada con estreptavidina, que produce una reacción de color en disolución.

55 Según una realización especial, la invención proporciona un método de LiPA (ensayo de sonda en línea) para detectar e identificar patógenos fúngicos en una muestra, tal como se muestra a continuación en la sección de ejemplos. LiPA es un ensayo de hibridación inversa que usa sondas de oligonucleótidos inmovilizadas como líneas

paralelas sobre una tira de soporte sólido (tal como describen Stuyver *et al.* (1993) y el documento WO 94/12670). LiPA es particularmente ventajoso puesto que es rápido y sencillo de realizar. Además, este método es propicio para la automatización (Auto-LiPA, Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica) y, por tanto, particularmente adecuado para entornos clínicos en los que pueden procesarse simultáneamente múltiples muestras. Sin embargo, ha de entenderse que cualquier otro tipo de ensayo o formato de hibridación que use cualquiera de las sondas seleccionadas descritas adicionalmente, también está cubierto por la presente invención.

Según una realización preferida, el método descrito anteriormente puede aplicarse para la detección y diferenciación simultáneas de patógenos fúngicos presentes en un tipo de muestra particular. Por ejemplo, cuando la muestra es una muestra de sangre o suero, los métodos de la invención pueden comprender detectar y diferenciar especies de *Candida*, especies de *Aspergillus* y especies de *Cryptococcus*. Cuando la muestra se origina a partir de las vías respiratorias (por ejemplo, muestras de esputo, muestras de LBA) los métodos de la presente invención pueden comprender detectar y diferenciar especies de *Candida*, con la mayor frecuencia especies distintas de *Candida albicans*, especies de *Aspergillus*, especies de *Cryptococcus* y *Pneumocystis carinii*. Cuando la muestra se origina a partir de LCR, los métodos de la invención pueden comprender detectar y diferenciar especies de *Candida*, especies de *Aspergillus*, especies de *Cryptococcus* y *Pneumocystis carinii*. Cuando la muestra se origina a partir de piel o tejido de herida, los métodos de la invención pueden comprender detectar y diferenciar especies de *Aspergillus*, especies de *Candida*, especies de *Cryptococcus*. Cuando la muestra se origina a partir del aparato genitourinario, los métodos de la invención permiten detectar y diferenciar diferentes tipos de especies de *Candida*.

Según una realización más específica, la presente descripción proporciona un método tal como se describió anteriormente, en el que dicho patógeno fúngico es una especie de *Candida*, y en el que las sondas de la etapa (iii) se eligen de SEQ ID NO 1, 2, 3, 33, 34 y 35 para *C. albicans*, SEQ ID NO 4 y 5 para *C. parapsilosis*, SEQ ID NO 6 y 36 para *C. tropicalis*, SEQ ID NO 7 y 8 para *C. kefyr*, SEQ ID NO 9 y 37 para *C. krusei*, SEQ ID NO 10 para *C. glabrata*, y SEQ ID NO 11, 12, 13 y 38 para *C. dubliniensis*.

Según una realización más específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Candida albicans* en una muestra, incluyendo dicho método

(i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 1, 2, 3, 33, 34 y 35, y

(ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *C. albicans*.

Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Candida parapsilosis* en una muestra, incluyendo dicho método

(i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 4 y 5, y

(ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *C. parapsilosis*.

Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Candida tropicalis* en una muestra, incluyendo dicho método

(i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 6 y 36, y

(ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *C. tropicalis*.

Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Candida kefyr* en una muestra, incluyendo dicho método

(i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 7 y 8, y

(ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *C. kefyr*.

Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Candida krusei* en una muestra, incluyendo dicho método

(i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 9 y 37, y

(ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación

indicativa de la presencia de *C. krusei*.

Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Candida glabrata* en una muestra, incluyendo dicho método

- (i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con una sonda representada por SEQ ID NO 10, y
- 5 (ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *C. glabrata*.

Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Candida dubliniensis* en una muestra, incluyendo dicho método

- 10 (i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 11, 12, 13 y 38 y
- (ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *C. dubliniensis*.

15 Según una realización adicional, la presente descripción proporciona un método para detectar e identificar especies fúngicas patógenas tal como se describió anteriormente, en el que dicho patógeno fúngico es una especie de *Aspergillus*, y en el que las sondas de la etapa (iii) se eligen de SEQ ID NO 18, 19, 20 y 42 para *A. flavus*, SEQ ID NO 21 y 43 para *A. versicolor*, SEQ ID NO 22, 23, 24 y 25 para *A. nidulans*, y SEQ ID NO 26, 27, 40 y 41 para *A. fumigatus*.

Según una realización más específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Aspergillus flavus* en una muestra, incluyendo dicho método

- 20 (i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 18, 19, 20 y 42, y
- (ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *A. flavus*.

25 Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Aspergillus versicolor* en una muestra, incluyendo dicho método

- (i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 21 y 43, y
- (ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *A. versicolor*.

30 Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Aspergillus nidulans* en una muestra, incluyendo dicho método

- (i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 22, 23, 24 y 25, y
- 35 (ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *A. nidulans*.

Según otra realización específica, la presente descripción proporciona un método para detectar *Aspergillus fumigatus* en una muestra, incluyendo dicho método

- (i) hibridar los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 26, 27, 40 y 41, y
- 40 (ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *A. fumigatus*.

Según otra realización particular, la presente descripción proporciona un método para detectar *Cryptococcus neoformans* en una muestra, que incluye

- 45 (i) hibridación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 14, 15, 16, 17 y 39 y
- (ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *C. neoformans*.

Según otra realización particular, la presente descripción proporciona un método para detectar *Pneumocystis carinii* en una muestra, que incluye

- (i) hibridación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra con al menos una de las sondas representadas por SEQ ID NO 28, 29, 30, 31 y 32, y
- 5 (ii) detectar los complejos de hibridación formados, siendo la presencia de dichos complejos de hibridación indicativa de la presencia de *P. carinii*.

Según una realización preferida, las sondas de oligonucleótidos usadas en los métodos de detección descritos anteriormente se inmovilizan en un soporte sólido.

- 10 Según una realización particularmente preferida, la presente descripción proporciona un método para la detección e identificación de patógenos fúngicos en una muestra tal como se describió anteriormente, mediante el cual es obligatoria la amplificación de la etapa (ii), e incluye el marcaje de los ácidos nucleicos que van a detectarse.

Según una realización particularmente ventajosa, la presente descripción proporciona un método para la detección y diferenciación simultáneas de al menos dos especies fúngicas patógenas en un único ensayo, que incluye

- 15 (i) liberar, aislar y/o concentrar los ácidos nucleicos de los patógenos fúngicos presentes posiblemente en la muestra,
- (ii) amplificar la región espaciadora transcrita interna (ITS) de dichos ácidos nucleicos con al menos un par de cebadores universales fúngicos,
- (iii) hibridar los ácidos nucleicos de la etapa (i) o (ii) con al menos dos de las siguientes sondas de oligonucleótidos específicas de especie:

20 GTCTAAACTTACAACCAATT (SEQ ID NO 1)

TGTCACACCAGATTACT (SEQ ID NO 2)
TATCAACTTGTCACACCAGA (SEQ ID NO 3)
GTAGGCCTTCTATATGGG (SEQ ID NO 4)
TGCCAGAGATTAACTCAAC (SEQ ID NO 5)
GGTTATAACTAAACCAAAC (SEQ ID NO 6)
TTTTCCCTATGAACTACTTC (SEQ ID NO 7)
AGAGCTCGTCTCTCCAGT (SEQ ID NO 8)
GGAATATAGCATATAGTCGA (SEQ ID NO 9)
GAGCTCGGAGAGAGACATC (SEQ ID NO 10)
TAGTGGTATAAGGCGGAGAT (SEQ ID NO 11)
CTAAGGCGGTCTCTGGC (SEQ ID NO 12)
GTTTTGTTCTGGACAACTT (SEQ ID NO 13)
CTTCTAAATGTAATGAATGT (SEQ ID NO 14)
CATCTACACCTGTGAACTGT (SEQ ID NO 15)
GGACAGTAGAGAATATTGG (SEQ ID NO 16)
GGACTTGGATTTGGGTGT (SEQ ID NO 17)
GTTTACTGTACCTTAGTTGCT (SEQ ID NO 18)
CCGCCATTCATGGCC (SEQ ID NO 19)
CGGGGGCTCTCAGCC (SEQ ID NO 20)
CCTCTCGGGGCGAGCC (SEQ ID NO 21)
CCGAGTGCGGCTGCCTC (SEQ ID NO 22)
CCGAGTGCGGGCTGC (SEQ ID NO 23)
GAGCCTGAATACCAAATCAG (SEQ ID NO 24)
GAGCCTGAATACAAATCAG (SEQ ID NO 25)
GTTGATTATCGTAATCAGT (SEQ ID NO 26)
GCGACACCCAACTTTATT (SEQ ID NO 27)
ATGCTAGTCTGAAATTCAAAG (SEQ ID NO 28)
GGATTGGGCTTTGCAAATATT (SEQ ID NO 29)
TTCGCTGGGAAAGAAGG (SEQ ID NO 30)
GCTTGCCTCGCCAAAGGTG (SEQ ID NO 31)
TAAATTGAATTTAGTTTTAGAATT (SEQ ID NO 32)
TTGTCACACCAGATTACTT (SEQ ID NO 33),
GGTTTATCAACTTGTCACACCAGA (SEQ ID NO 34),
GGTATCAACTTGTCACACCAGATT (SEQ ID NO 35),
GGTTATAACTAAACCAAACTTTT (SEQ ID NO 36),
GGGAATATAGCATATAGTCGA (SEQ ID NO 37),
GGTTTTGTTCTGGACAACTT (SEQ ID NO 38),
CATCTACACCTGTGAACTGTTT (SEQ ID NO 39),
CCGACACCCAACTTTATTTTT (SEQ ID NO 40),
GTTGATTATCGTAATCAGTT (SEQ ID NO 41),
GAACTCTGTCTGATCTAGT (SEQ ID NO 42),
GTCTGAATATAAAATCAGTCA (SEQ ID NO 43),

o variantes de dichas sondas, difiriendo dichas variantes de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de uno o dos nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia de nucleótidos, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda,

o los equivalentes de ARN de dichas sondas, en los que se reemplaza T por U,

5 o los ácidos nucleicos complementarios de dichas sondas,

en el que dichas sondas se han inmovilizado en un soporte sólido en ubicaciones específicas,

(iv) detectar los complejos de hibridación formados en la etapa (iii),

(v) identificar las especies presentes en la muestra mediante la ubicación de la señal de hibridación en el soporte sólido.

10 En la realización citada anteriormente, las sondas de la descripción se inmovilizan sobre un soporte sólido en ubicaciones específicas, por ejemplo como líneas paralelas diferenciadas o puntos en una tira de membrana, o en diferentes pocillos de una placa de microtitulación. Cada ubicación contiene una cantidad determinada de al menos una sonda específica de especie y, por tanto, puede considerarse como "ubicación específica de especie". Si es necesario, pueden combinarse varias sondas que hibridan con las mismas especies en una única ubicación.
15 Ubicando la señal de hibridación obtenida en el soporte sólido, es posible por tanto identificar las especies fúngicas presentes en la muestra (etapa (v) del método descrito anteriormente).

Según una realización preferida, tal como se mostrará en la sección de ejemplos, la inmovilización de las sondas en el soporte sólido se produce a través de la unión no covalente de una cola de poli-T que se une a uno de los extremos de la sonda. Si se produce adición de cola enzimática, se añade la cola de poli-T en el extremo 3'. Si se produce adición de cola sintética (SGS), la cola de poli-T se añade habitualmente en el extremo 5'. Ambos tipos de adición de cola pueden aplicarse a las sondas de la invención. Si un tipo diferente de adición de cola da como resultado un comportamiento de hibridación diferente de la sonda, la secuencia de oligonucleótido puede tener que adaptarse ligeramente. Se ilustran ejemplos de tales variaciones ligeras en la tabla 1 más adelante, en la que un determinado tipo de sonda puede mencionarse dos veces: por ejemplo Calb2 (SEQ ID NO 2) y Calb2 (SGS) (SEQ ID NO 33), siendo la primera sonda mencionada funcional con una cola de poli-T en 3', siendo la última sonda funcional con una cola de poli-T en 5'.

Según otra realización, la presente descripción también proporciona una molécula de oligonucleótido aislada que tiene una secuencia de nucleótidos representada por cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1 a 43, o variantes de dichas sondas, difiriendo dichas variantes de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de uno o dos nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia de nucleótidos, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda, o los equivalentes de ARN de dichas sondas, en los que se reemplaza T por U, o los ácidos nucleicos complementarios de dichas sondas.

Ácidos nucleicos preferidos de la descripción consisten en una secuencia de nucleótidos representada por cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1-43. Tal como se mencionó anteriormente, la adición y/o delección de 1 ó 2 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' puede dar como resultado moléculas equivalentes funcionales, que también están englobadas por la presente invención. Además, tal como se expuso anteriormente, puede ser deseable modificar la sonda de ácido nucleico con el fin de facilitar la fijación o mejorar la eficacia de hibridación (por ejemplo, adición de cola de homopolímero, acoplamiento con diferentes grupos reactivos...). Tales moléculas de ácido nucleico modificadas también forman parte de la presente invención.

40 Más en particular, la presente descripción proporciona una molécula de oligonucleótido aislada tal como se describió anteriormente para su uso como cebador o sonda específico de especie en la detección de una de las siguientes especies fúngicas patógenas: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* o *Pneumocystis carinii*.

45 La presente descripción también proporciona un método tal como se describió anteriormente, en el que la muestra es una muestra de sangre, y en el que etapa (i) incluye

- incubar la muestra de sangre con tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM), seguido por centrifugar y retirar el sobrenadante, y

- agitar en vórtex el sedimento celular resuspendido en presencia de perlas de vidrio.

50 El pretratamiento de la muestra descrito anteriormente se describe en mayor detalle en la sección de ejemplos, y se muestra que puede aplicarse a una amplia variedad de especies fúngicas.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Resultados de hibridación de amplicones completos de ITS, ITS-1 o ITS-2 en tiras de LiPA que contienen

sondas específicas de especie.

Carriles:

carril 1: blanco de PCR (es decir, sin amplicón de PCR añadido a este carril)
 carriles 2,3: *C. albicans* (2: ITS completa, 3: ITS-1)
 carriles 4,5: *C. parapsilosis* (4: ITS completa, 5: ITS-1)
 carriles 6,7: *C. glabrata* (6: ITS completa, 7: ITS-1)
 carriles 8,9: *C. tropicalis* (8: ITS completa, 9: ITS-1)
 carriles 10,11: *C. krusei* (10: ITS completa, 11: ITS-1)
 carriles 12,13: *C. dubliniensis* (12: ITS completa, 13: ITS-2)
 carriles 14,15: *Cr. neoformans* (14: ITS completa, 15: ITS-1)
 carriles 16,17: *A. fumigatus* (16: ITS completa, 17: ITS-1)
 carriles 18: *A. nidulans* (ITS completa)
 carril 19: *A. flavus* (ITS completa)
 carril 20: oligo-dA-bio (hibrida con la cola (poli-T) de las sondas inmovilizadas)

Líneas de sonda:

línea de control de reacción de color
 (oligonucleótido biotinilado heterólogo)
 fila 1: Calb1
 fila 2: Calb2
 fila 3: Calb3
 fila 4: Cpara2
 fila 5: Cglab
 fila 6: Ctrop
 fila 7: Ckrus
 fila 8: Cdub1
 fila 9: Cdub2
 fila 10: Crneo2
 fila 11: Crneo4
 fila 12: Afum1
 fila 13: Afum2
 fila 14: Anid1
 fila 15: Afla1
 fila 16: Aver
 fila 17: Aver

Figura 2: Evaluación mediante LiPA con aislados clínicos

carriles 1-15: diferentes aislados clínicos, identificados como
 carriles 1-4, 6, 7, 10: *C. albicans*
 carril 5: *C. glabrata*
 carriles 8, 9, 11, 12, 14, 15: *A. fumigatus*
 carril 13: *A. flavus*
filas: véase la figura 1

Tabla 1: Secuencias de sonda de ITS para detección y diferenciación fúngica

Sonda	Secuencia	SEQ ID NO	Organismo	Región espaciadora
Calb1	GTCTAAACTTACAACCAATT	SEQ ID NO 1	<i>Candida albicans</i>	ITS1
Calb2	TGTCACACCAGATTACT	SEQ ID NO 2	<i>Candida albicans</i>	ITS1
Calb2 (SGS)	TTGTCACACCAGATTACTT	SEQ ID NO 33	<i>Candida albicans</i>	ITS1
Calb3	TATCAACTTGTCACACCAGA	SEQ ID NO 3	<i>Candida albicans</i>	ITS1
Calb3 (SGS1)	GGTTTATCAACTTGTCACACCAGA	SEQ ID NO 34	<i>Candida albicans</i>	ITS1
Calb3 (SGS2)	GGTATCAACTTGTCACACCAGATT	SEQ ID NO 35	<i>Candida albicans</i>	ITS1
Cpara1	GTAGGCCTTCTATATGGG	SEQ ID NO 4	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS1
Cpara2	TGCCAGAGATTAACCAAC	SEQ ID NO 5	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS1
Ctrop	GGTTATAACTAAACCAAAT	SEQ ID NO 6	<i>Candida tropicalis</i>	ITS1
Ctrop (SGS)	GGTTATAACTAAACCAAATTTTT	SEQ ID NO 36	<i>Candida tropicalis</i>	ITS1
Ckef1	TTTTCCCTATGAACTACTTC	SEQ ID NO 7	<i>Candida kefyr</i>	ITS1
Ckef2	AGAGCTCGTCTCTCCAGT	SEQ ID NO 8	<i>Candida kefyr</i>	ITS1
Ckrus	GGAATATAGCATATAGTCGA	SEQ ID NO 9	<i>Candida krusei</i>	ITS1
Ckrus (SGS)	GGGAATATAGCATATAGTCGA	SEQ ID NO 37	<i>Candida krusei</i>	ITS1
Cglab	GAGCTCGGAGAGAGACATC	SEQ ID NO 10	<i>Candida glabrata</i>	ITS1
Cdub1	TAGTGGTATAAGGCGGAGAT	SEQ ID NO 11	<i>Candida dubliniensis</i>	ITS2
Cdub2	CTAAGCGGTCTCTGCG	SEQ ID NO 12	<i>Candida dubliniensis</i>	ITS2

ES 2 621 547 T3

Cdubl3	GTTTTGTTCTGGACAAACTT	SEQ ID NO 13	<i>Candida dubliniensis</i>	ITS1
Cdubl3(SGS)	GGTTTTGTTCTGGACAAACTT	SEQ ID NO 38	<i>Candida dubliniensis</i>	ITS1
Crneo1	CTTCTAAATGTAATGAATGT	SEQ ID NO 14	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ITS1
Crneo2	CATCTACACCTGTGAACTGT	SEQ ID NO 15	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ITS1
Crneo2 (SGS)	CATCTACACCTGTGAACTGTTT	SEQ ID NO 39	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ITS1
Crneo3	GGACAGTAGAGAATATTGG	SEQ ID NO 16	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ITS1
Crneo4	GGA CTGGATTGGGTGT	SEQ ID NO 17	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ITS2
Afla1	GTTTACTGTACCTTAGTTGCT	SEQ ID NO 18	<i>Aspergillus flavus</i>	ITS1
Afla2	CCGCCATTCATGGCC	SEQ ID NO 19	<i>Aspergillus flavus</i>	ITS1
Afla3	CGGGGGCTCTCAGCC	SEQ ID NO 20	<i>Aspergillus flavus</i>	ITS1
Afla4	GAACTCTGTCTGATCTAGT	SEQ ID NO 42	<i>Aspergillus flavus</i>	ITS1
Aver	CCTCTCGGGGGCGAGCC	SEQ ID NO 21	<i>Aspergillus versicolor</i>	ITS1
Aver3 (SGS)	GTCTGAATATAAAATCAGTCA	SEQ ID NO 43	<i>Aspergillus versicolor</i>	ITS1
Anid1	CCGAGTGCGGCTGCCTC	SEQ ID NO 22	<i>Aspergillus nidulans</i>	ITS1
Anid1A	CCGAGTGCGGGCTGC	SEQ ID NO 23	<i>Aspergillus nidulans</i>	ITS1
Anid2	GAGCCTGAATACCAAATCAG	SEQ ID NO 24	<i>Aspergillus nidulans</i>	ITS1
Anid2A	GAGCCTGAATACCAAATCAG	SEQ ID NO 25	<i>Aspergillus nidulans</i>	ITS1
Afum2	GTTGATTATCGTAATCAGT	SEQ ID NO 26	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ITS1
Afum2 (SGS)	GTTGATTATCGTAATCAGTT	SEQ ID NO 41	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ITS1
Afum1	GCGACACCCAACCTTTATT	SEQ ID NO 27	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ITS2
Afum1 (SGS)	CCGACACCCAACCTTTATTTTT	SEQ ID NO 40	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ITS2
Pcar1	ATGCTAGTCTGAAATTCAAAAG	SEQ ID NO 28	<i>Pneumocystis carinii</i>	ITS2
Pcar2	GGATTGGGCTTTGCAAATATT	SEQ ID NO 29	<i>Pneumocystis carinii</i>	ITS2
Pcar3	TTCGCTGGGAAAGAAGG	SEQ ID NO 30	<i>Pneumocystis carinii</i>	ITS2
Pcar4	GCTTGCCCTCGCCAAAGGTG	SEQ ID NO 31	<i>Pneumocystis carinii</i>	ITS1
Pcar5	TAAATTGAATTTAGTTTGAATT	SEQ ID NO 32	<i>Pneumocystis carinii</i>	ITS1

Tabla 2: Resultados de hibridación obtenidos con una selección de las sondas de la invención aplicadas a una amplia variedad de especies fungicas.

Especie	N.º de ref.	Calb1	Calb2	Calb3	Cpara2	Cglab	Ctrop	Ckrus	Cdubl1	Cdubl2	Crneo2	Crneo4	Afum1	Afum2	Anid	Afla	Aver
<u>Especie de Penicillium</u>																	
<i>P. aurantiogriseum</i>	PIL 563																
<i>P. antiogriseum</i>	PIL 333																
var. <i>melanoconidium</i>																	
<i>P. expansum</i>	PIL 346																
<i>P. verucosum</i>	PIL 781																
<i>P. verucosum</i>	PIL 115																
<i>P. verucosum</i>	PIL 25																
<i>P. hordei</i>	PIL 351																
<i>P. islandicum</i>	PIL 778																
<i>P. martensii</i>	PIL 9																
<i>P. ruber</i>	PIL 162																
<u>Especie de Aspergillus</u>																	
<i>A. fumigatus</i>	NCPF 7097												+	+			
<i>A. fumigatus</i>	NCPF 2109												+	+			
<i>A. fumigatus</i>	NCPF 2937												+	+			
<i>A. nidulans</i>	NCPF 7063														+		
<i>A. nidulans</i>	PIL 272															+	
<i>A. niger</i>	NCPF 2828																
<i>A. niger</i>	NCPF 2599																
<i>A. niger</i>	PIL 4																
<i>A. restrictus</i>	PIL																

Ejemplos

1. Pruebas de especificidad de las sondas de oligonucleótidos.

1.1. Extracción de ácido nucleico.

5 Se usó un método de extracción rápida basado en la perturbación física de las células fúngicas seguida por separación en bruto del residuo celular del ADN genómico para la producción de ADN a partir de colonias individuales de levaduras (Roberts, 1997). Para hongos filamentosos, se usó un método de preparación de muestras más elaborado basado en una combinación de batido de perlas y lisis con un tampón de GuSCN seguido por captura del ADN sobre sílice.

1.2. Amplificación por PCR

10 Se incluyeron en la reacción de PCR 20 - 50 ng de ADN genómico o 5 µl de ADN extraído mediante el procedimiento de extracción rápida descrito anteriormente. Las reacciones de PCR contenían por reacción de 100 µl: 200 µM de cada dNTP, tampón Taq 1 x, MgCl₂ 3 mM, glicerol al 15%, 40 pmol de cada cebador biotinilado (ITS5 e ITS4 para la amplificación de la región ITS completa, ITS5 e ITS2 para la amplificación de ITS-1 solamente), 1 U de uracil N-glicosilasa y 2,5 U de Taq polimerasa. Las condiciones de los ciclos térmicos de PCR fueron las siguientes: 95°C durante 10 min para 1 ciclo (inicio en caliente), 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, 72°C durante 2 min para 30 ciclos, y una extensión final a 72°C durante 10 min para 1 ciclo.

1.3. Producción de tiras para LiPA

20 Se proporcionaron sondas sintéticas de manera enzimática en el extremo 3' con una cola de poli-T usando desoxinucleotidil transferasa terminal (Pharmacia) en un tampón de reacción convencional. Después de incubación durante una hora, se detuvo la reacción y se precipitaron las sondas con cola y se lavaron con etanol enfriado con hielo. En la tabla 1, se indican las secuencias de sonda de oligonucleótido de la invención.

25 Si la adición de cola se produjo mediante síntesis química, la cola de poli-T se unió en el extremo 5' de la sonda de oligonucleótido. Las sondas con cola añadida químicamente pueden requerir una pequeña modificación (delección y/o adición de unos pocos nucleótidos en uno o ambos de los extremos) de la secuencia de la sonda en comparación con la sonda con cola añadida de manera enzimática, con el fin de mostrar características de hibridación comparables. Las sondas modificadas con adición de cola químicamente se indican con la extensión "(SGS)" en la tabla 1 y, si la modificación es una adición de nucleótidos, se indica en negrita.

30 Se disolvieron las sondas en SSC 6x a sus concentraciones específicas respectivas y se aplicaron como líneas horizontales sobre tiras de membrana. Se aplicó conjuntamente ADN biotinilado como control positivo. Se fijaron los oligonucleótidos a la membrana mediante coacción a 80°C durante 12 horas. Entonces se cortó la membrana en tiras de 4 mm.

1.4. Rendimiento de la prueba de LiPA

35 Se mezclaron volúmenes iguales (de 5 a 10 µl) de los fragmentos de PCR biotinilados y de la disolución de desnaturalización (NaOH 400 mM/EDTA 10 mM) en cubetas de prueba y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 2 ml de la disolución de hibridación (SSC 2x/ SDS al 0,1%) precalentada a 50°C seguido por la adición de una tira por cubeta de prueba. Se produjo hibridación durante 1 hora a 50°C en un baño de agua con agitación cerrado. Se lavaron las tiras dos veces con 2 ml de disolución de lavado riguroso (SSC 2x/ SDS al 0,1%) a temperatura ambiente durante 20 s, y una vez a 50°C durante 15 min. Tras este lavado riguroso, se enjuagaron las tiras dos veces con 2 ml de la disolución de enjuagado (RS, *rinse solution*) convencional de Innogenetics. Se incubaron las tiras en una plataforma giratoria con conjugado de estreptavidina marcado con fosfatasa alcalina, se diluyó en disolución de conjugado (CS, *conjugate solution*) convencional durante 3 min a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las tiras dos veces con 2 ml de RS y una vez con tampón de sustrato (SB, *substrate buffer*) convencional, y se inició la reacción de color añadiendo BCIP y NBT al SB. Después de 30 min a temperatura ambiente, se detuvo la reacción de color reemplazando los compuestos coloreados por agua destilada. Inmediatamente después del secado, se interpretaron las tiras. El procedimiento completo descrito anteriormente puede reemplazarse también por el dispositivo de automatización Inno-LiPA convencional (Auto-LiPA, Innogenetics N.V., Zwijnaarde, Bélgica). Los tampones mencionados anteriormente (RS, CS, SB) pueden obtenerse todos de Innogenetics N.V. (Zwijnaarde, Bélgica).

1.5. Resultados de hibridación

50 En la tabla 2, se resumen los resultados de hibridación específica para un conjunto de sondas de la tabla 1. Se produce especificidad de especie cuando todas las cepas pertenecientes a la especie fúngica respectiva muestran hibridación positiva (+) y ninguna de las otras especies fúngicas sometidas a prueba muestra reacción cruzada con las sondas específicas de especie en las condiciones de hibridación usadas.

La figura 1 representa un ejemplo de tiras para LiPA. Comparando los carriles 3, 9, 11, 15 y 17 con los carriles 2, 8,

10, 14 y 16, respectivamente, queda claro que la sensibilidad de detección es mayor (es decir, una señal de hibridación más intensa obtenida) cuando se amplifica solamente la región ITS-1, en comparación con la amplificación de la región ITS completa.

2. Pruebas de sensibilidad de la amplificación por PCR

5 2.1. Extracción de ácido nucleico

Se realizaron pequeñas modificaciones de los métodos de extracción de ADN a gran escala descritos en la bibliografía (Holmes *et al.* 1994, Nho *et al.* 1997, Weig *et al.* 1997) y se usaron para extraer ADN genómico de especies de *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus* produciendo ADN de alta pureza adecuado para el almacenamiento a largo plazo. Se calcularon las concentraciones de ADN de las disoluciones madre preparadas basándose en mediciones de densidad óptica.

15 2.2. Pruebas de sensibilidad

Se realizaron experimentos de amplificación con series de dilución de ADN genómico (que oscilaban entre 50 ó 100 ng y 50 ó 100 fg) usando diferentes conjuntos de cebadores, o bien la combinación de ITS5/ITS2 que amplifica la región ITS-1 solamente o bien ITS5/ITS4 que amplifica la región ITS completa. Se visualizaron los amplicones generados sobre geles teñidos con bromuro de etidio y se hibridaron con tiras para LiPA que contenían las sondas apropiadas.

2.3. Resultados

La tabla 3 a continuación resume los límites de detección obtenidos con series de dilución de ADN genómico aislado de los siguientes organismos: *C. albicans*, *C. neoformans* y *A. fumigatus*.

Organismo	Amplificación	Gel de agarosa	Hibridación mediante LiPA
<i>C. albicans</i>	ITS1	10 pg	100 fg
	ITS completa	1 pg	100 fg
<i>C. neoformans</i>	ITS1	100 pg	1 pg
	ITS completa	10 pg	10 pg
<i>A. fumigatus</i>	ITS1	500 fg	50 fg
	ITS completa	5 pg	5 pg

20 La amplificación de la región ITS completa da como resultado una mejor sensibilidad cuando se visualizan los amplicones sobre geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (excepto para *A. fumigatus*). La tinción inadecuada de amplicones pequeños podría explicar este fenómeno.

25 Cuando se hibrida con sondas inmovilizadas sobre tiras para LiPA (véase, por ejemplo, la figura 1), se observa claramente que la amplificación de la región ITS-1 (amplicón más pequeño) da como resultado un límite de detección más sensible en comparación con la amplificación de ITS completa. LiPA pudo detectar específicamente ADN de *C. albicans* hasta 100 fg, ADN de *Cryptococcus neoformans* hasta 1 pg y ADN de *A. fumigatus* hasta 50 fg.

3. Pruebas de sensibilidad en muestras de esputo con adiciones conocidas

3.1. Extracción de ácido nucleico

30 Se realizaron adiciones conocidas en muestras de esputo de 200 ml con diluciones de células de *C. albicans* (10^5 - 1 células/ml) o cantidades decrecientes (no cuantificables) de micelios de *A. fumigatus*. Se aisló el ADN fúngico de estas muestras de esputo usando una modificación del método descrito por Boom *et al.*, 1990. El tiempo global que llevó procesar 15 muestras de esputo fue de 2 horas.

3.2. Amplificación

35 Se usaron 5 µl del ADN extraído como material diana en la PCR (100 µl). Se llevaron a cabo reacciones de PCR tal como se describió anteriormente. Se realizó amplificación de ITS-1 usando la combinación de cebadores ITS5 + ITS2 y se realizó la amplificación de la región ITS completa usando los cebadores ITS5 e ITS4.

3.3. Resultados

40 Tras la hibridación mediante LiPA de los amplicones obtenidos, se obtuvo un límite de detección de 10 - 100 células/ml de esputo para *C. albicans*. La amplificación de muestras de esputo con adiciones conocidas con micelios de *A. fumigatus* dio como resultado una detección del menor nivel de micelios de *A. fumigatus* en adiciones conocidas.

4. Pruebas de sensibilidad en muestras de sangre con adiciones conocidas

Se ha notificado la evaluación de diferentes métodos para la extracción de ADN fúngico de la sangre previamente en

la bibliografía (Loffler *et al.* 1997). La mayor parte de los métodos evaluados implicaban enfoques enzimáticos conocidos con algunas modificaciones. Sin embargo, estos métodos no pudieron producir de manera sistemática ADN de alta calidad, lo que da como resultado una variación en los límites de detección logrados entre los experimentos (datos no mostrados). También se observó que el ADN extraído de *A. fumigatus* usando estos métodos requirió un enfoque de PCR de "inicio en caliente" para una amplificación por PCR sensible del ADN extraído (datos no mostrados). Como resultado, se desarrolló un nuevo método de pretratamiento de muestras para muestras de sangre por la presente invención, tal como se describe a continuación.

4.1. Extracción de ácido nucleico

Se inocularon muestras de sangre de 200 μ l, 1 ml y 5 ml con concentraciones decrecientes de células de *C. albicans* (10^5 - 10^1 células). Se pretrataron las muestras de sangre inoculadas para lisar y eliminar los glóbulos rojos. Se lisaron muestras de sangre de 200 μ l en 800 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, [pH 7,5], EDTA 10 mM, NaCl 50 mM) a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 μ l de H₂O estéril. Se lisaron muestras de sangre de 1 ml y 5 en 3 ml de tampón de lisis y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 μ l de H₂O estéril. Se añadieron perlas de vidrio (perlas de vidrio de zirconio de 0,5 mm almacenadas en SDS al 0,2%) al sedimento resuspendido, se agitó la muestra en vórtex en un minibatidor de perlas a la velocidad máxima durante 190 segundos con el fin de perturbar mecánicamente las células de levadura. Posteriormente, se extrajo el ADN usando métodos conocidos tales como, por ejemplo, el descrito por Boom *et al.* (1999) o el kit para tejido QIAmp (Qiagen, Los Angeles, California).

Este mismo método demostró poder aplicarse también a otras especies fúngicas, tales como *Aspergillus* y *Cryptococcus* spp.

4.2. Amplificación

Se realizó amplificación por PCR de la región ITS en un volumen final de 100 μ l con 20 μ l de ADN extraído de las muestras de sangre (para ADN extraído de muestras de sangre de 5 ml, se incluyen 20 μ l de una dilución 1/10 en la reacción de PCR) añadido a la reacción de PCR que contiene una concentración final de desoxinucleótidos trifosfato 0,25 mM (DU/dNTP [2:1]), tampón de reacción 1x (Promega, EE.UU.), MgCl₂ 3 mM, 1 unidad de uracil ADN glicosilasa (Longo *et al.* 1990; Roche-Boehringer Mannheim, Alemania), 40 pmol cada uno del cebador directo ITS5 (5'-GAAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y cebador inverso ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 2,5 unidades de Taq polimerasa (Promega, EE.UU.), enrasado a un volumen final de 100 μ l en agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich Ltd, R.U.).

Se realizó amplificación por PCR en un termociclador Touchdown™ (Hybaid, R.U.), con las siguientes condiciones de los ciclos: 37°C durante 10 minutos para 1 ciclo seguido por 94°C durante 2 minutos para 1 ciclo seguido por 40 ciclos de desnaturalización de ADN a 94°C durante 30 segundos, hibridación con cebador a 55°C durante 30 segundos y extensión de ADN a 72°C durante 2 minutos, con un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se incluyeron 50 ng de ADN de *C. albicans* extraído tal como se describió anteriormente como control positivo en la reacción de PCR junto con un control negativo que no es molde en cada ejecución de PCR.

4.3. Resultados de hibridación mediante LiPA y evaluación del rendimiento de la prueba.

Tras la hibridación mediante LiPA de los amplicones obtenidos, se obtuvo de manera sistemática un límite de detección de 2-10 células/ml de sangre para *Candida albicans* (resultados no mostrados). La PCR-LiPA y la extracción asociada del ADN fúngico de muestras de sangre pueden realizarse en un solo día laborable mientras que la propia tecnología puede integrarse fácilmente en un laboratorio de análisis clínicos que ya se ocupa de la PCR ya que no requiere ningún equipo especializado.

Los informes iniciales de los ensayos basados en PCR para la detección de *Candida* en sangre describen enfoques hemianidados (Rand *et al.* 1994) o se basan en técnicas basadas en laboratorio engorrosas para la detección tras PCR (Holmes *et al.*, 1994; Jordan *et al.* 1994) que son inadecuadas para el examen a gran escala de muestras. Informes más recientes describen varios enfoques diferentes para la detección de patógenos fúngicos en sangre. Estos incluyen un enfoque de PCR de amplio espectro (Van Burik *et al.*, 1998) diseñado para detectar la presencia de infección fúngica en sangre sin identificar el agente infeccioso específico pero con una sensibilidad de detección de 4 células/ml tras hibridación con una sonda de ADN panfúngica no radiactiva. Los autores describen la aplicación satisfactoria de este ensayo a la detección de infección fúngica en muestras de un grupo de pacientes con trasplante de médula ósea. También se ha descrito un ensayo basado en placas de microtitulación para la detección de las cinco especies de *Candida* más significativas clínicamente (Shin-Ichi *et al.* 1995) y aunque notifican una sensibilidad de detección de 2 células/200 μ l de sangre, la tecnología de ensayo puede ser algo engorrosa ya que la hibridación tras PCR de los amplicones con las sondas específicas de especie se realiza en tubos para microcentrífuga y luego se transfiere a una placa de microtitulación para la etapa de detección. Una publicación más reciente (Hee Shin *et al.* 1999) describe un ensayo muy elegante para la detección de hasta tres especies de *Candida* en un único tubo de reacción usando sondas de ADN marcadas con diferentes etiquetas fluorescentes. Este ensayo representa un sistema en dos etapas, realizándose la amplificación por PCR y detección tras PCR en un único tubo y reduciendo el

tiempo de ensayo desde 7 horas hasta 5 horas. Los autores describen la aplicación de la tecnología de ensayo para la detección de *Candida* en frascos de cultivo de sangre positivos para la presencia de infección fúngica.

El ensayo de PCR-LiPA descrito en la presente invención también es una prueba multiparamétrica ya que una única membrana para LiPA incluye sondas de ADN para la detección de una amplia gama de diferentes especies de *Candida*. Por tanto, tiene el potencial de detectar e identificar infecciones mixtas por *Candida*. Además, se ha desarrollado un enfoque universal para la preparación de ADN fúngico de *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus ssp.* en muestras de sangre y/o respiratorias, tal como se describió anteriormente (véase la sección 4.1).

5. Pruebas de aislados clínicos

Se realizó la extracción de ADN fúngico en cultivos de aislados clínicos usando los métodos tal como se describió anteriormente. Se llevaron a cabo reacciones de PCR tal como se describió anteriormente y se usó la combinación de cebadores ITS5 + ITS4 para la amplificación de ITS completa.

Se evaluaron tiras para LiPA para patógenos fúngicos con 100 aislados clínicos. Se amplificó la región ITS completa de 75 aislados clínicos de levaduras dimórficas tras la aplicación del método de preparación rápida (Roberts *et al.* 1997) a partir de una colonia individual. Se amplificó la región ITS completa de 25 aislados clínicos de hongos filamentosos, tras la preparación del ADN usando el método de Boom *et al.* modificado.

La hibridación de los productos de PCR obtenidos con las tiras para LiPA identificó 2 aislados como *C. parapsilosis*, 2 aislados como *C. glabrata*, 15 aislados como *A. fumigatus*, 3 aislados como *A. nidulans*, 3 aislados como *A. flavus* y 5 aislados no identificados (= pertenecientes a otras especies fúngicas para las que no estaban presentes sondas en la tira para LiPA, pero para las que se obtuvo un amplicón durante la reacción de PCR fúngica universal). Todos los aislados restantes se identificaron como *C. albicans* y estos se confirmaron usando un kit de diagnóstico bioquímico "Murex *C. albicans*" (Murex Diagnostica). En la figura 2, se muestra un ejemplo de los resultados de hibridación mediante LiPA obtenidos con 15 aislados clínicos.

Los resultados anteriores muestran de manera convincente que las sondas de la presente invención no son solamente aplicables para la detección de cepas fúngicas de laboratorio, a partir de las que se diseñaron originariamente, sino que detectan con alta especificidad y sensibilidad cepas que se producen de manera clínica de esas especies fúngicas. Por tanto, los métodos descritos en la presente invención facilitarán en gran medida la detección de patógenos fúngicos en muestras clínicas, si es deseable, en un único ensayo.

Bibliografía

Asseline U, Delarue M, Lancelot G, Toulme F, Thuong N (1984) Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(11):3297-301.

Bart-Delabesse, E., P. Boiron, A. Carlotti y B. Dupont. 1993. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. J. Clin. Microbiol. 31:2933-2937.

Bej A, Mahbubani M, Miller R, Di Cesare J, Haff L, Atlas R. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. Mol Cell Probes 1990; 4:353-365.

Boom *et al.* 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 28(3):495-503.

Boom *et al.* 1999. Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha casein to silica particles. J. Clin. Microbiol. 37: 615-719.

Botelho A. and Planta R. 1994. Specific identification of *Candida albicans* by hybridization with oligonucleotides derived from ribosomal DNA internal spacers. Yeast, 10: 709-717.

Brawner, D.L.. 1991. Comparison between methods of serotyping of *Candida albicans* produces discrepancies in results. J. Clin. Microbiol. 29:1020-1025.

Bretage, S., J.M. Costa, A. Marmorat-Khuong, F. Poron, C. Cordonnier, M. Vidaud y J. Fleury-Feith. 1995. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. J. Clin. Microbiol. 33:1164-1168.

Chuck, S.L. y M.A. Sande. 1989. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 321:794-799.

Cregan, P., A. Yamamoto, A. Lum, T. van der Heide, M. MacDonald y L. Pulliam. 1990. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. 28:2432-2436.

Duck P. Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. Biotechniques 1990; 9: 142-147.

Einsele *et al.* 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J. Clin.

- Microbiol. 35(6): 1353-1360.
- Elie, C., Lott, T., Reiss, E. and Morrison C. 1998. Rapid identification of *Candida* species with species specific DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 36(11): 3260-3265.
- 5 Fisher, B.D., D. Armstrong, B. Yu y J.W.M. Gold. 1981. Invasive aspergillosis: progress in early diagnosis and treatment. *Am. J. Med.* 71:571-577.
- Fletcher *et al.* 1998. Detection of *Aspergillus fumigatus* PCR products by a microtitre plate based DNA hybridisation assay. *J Clin Pathol.* 51(8):617-20.
- Fujita, S., Lasker B., Lott, T., Reiss, E. and Morrison C. 1995. Microtitration Plate Enzyme Immunoassay to detect PCR amplified DNA from *Candida* species in blood. *J. Clin. Microbiol.* 33(4): 962-967.
- 10 Goodwin, S.D., J. Fiedler-Kelly, T.H. Grasela, W.A. Schell y J.R. Perfect. 1992. A nationwide survey of clinical laboratory methodologies for fungal infections. *J. Med. Vet. Mycol.* 30:153-160.
- Guatelli J, Whitfield K, Kwoh D, Barringer K, Richman D, Gengeras T. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1874-1878.
- 15 Hee Shin *et al.* 1999. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 37: 165-170.
- Heimdahl, A. y C.K. Nord. 1990. Oral yeast infections in immunocompromised and seriously diseased patients. *Acta Odontol. Scand.* 48:77-84.
- Holmes, A.R. *et al.* 1994. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32(1): 228-231.
- 20 Jordan, J.A. 1994. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2962-2967.
- Kohno, S., A. Yasuoka, H. Koga, M. Kaku, S. Maesaki, K. Tanaka, K. Mitsutake, H. Matsuda y K. Hara. 1993. High detection rates of cryptococcal antigen in pulmonary cryptococcosis by Eiken latex agglutination test with pronase pretreatment. *Mycopathologia* 123:75-79.
- 25 Kumeda, Y. y T. Asao. 1996. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section Flavi. *Appl. Environm. Microbiol.* 62:2947-2952.
- Kwoh D, Davis G, Whitfield K, Chappelle H, Dimichele L, Gengeras T. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1173-1177.
- 30 Landgren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 1988; 241:1077-1080.
- Loffler *et al.* 1997. Comparison of different methods for extraction of fungal pathogens from cultures and blood. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3311-3312.
- 35 Longo *et al.* 1990. Use of Uracil DNA glycosylase to control carry over contamination in PCR. *Gene* 93: 125-128.
- Lomeli H, Tyagi S, Printchard C, Lisardi P, Kramer F. Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin Chem* 1989; 35: 1826-1831.
- Lu, J., C. Chi-Hsiang, M.S. Bartlett, J.W. Smith y C. Lee. 1995. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J. Clin. Microbiol.* 33:2785-2788.
- 40 Lu, J., C.. Bartlett, J.W. Smith y C. Lee. 1997. Typing of *Pneumocystis carinii* strains with type specific oligonucleotide probes derived from the nucleotide sequences of Internal Transcribed Spacers of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2973-2977.
- Miller P, Yano J, Yano E, Carroll C, Jayaram K, Ts'o P, 1979. Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18(23):5134-43.
- 45 Nho, S. *et al.* 1997. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of flucanazoleresistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 35 (4):1036-1039.
- Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement

- with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254(5037):1497-500.
- Rand et al. 1994. Detection of candidemia by PCR. *Mol. Cell. probes* 8: 215-222.
- Rinaldi, M.G.. 1988. Aspergillosis, p. 559-572. En A. Balows, W.J. Hausler, Jr., M. Ohashi y A. Turano (ed.), *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice*, vol. 1. Bacterial, Mycotic and Parasitic Diseases. Springer-Verlag, Nueva York.
- 5 Roberts, D.M. 1997. Genome analysis of plant and insect pathogenic species of *Verticillium* using molecular methodologies. Tesis doctoral, Universidad de Londres.
- Rogers, T.R., K.A. Haynes y R. Barnes. 1990. Value of antigen detection in predicting invasive aspergillosis. *Lancet* 336:1210-1213.
- 10 Sabetta, J.R., P. Minter y V.T. Andriole. 1985. The diagnosis of invasive aspergillosis by enzyme-linked immunosorbent assay for circulating antigen. *J. Infect. Dis.* 152:946-953.
- Saiki R, Walsh P, Levenson C, Erlich H. 1988. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6230-6234.
- 15 Shin J.H., Nolte, F., Holloway, B. and Morrison C. 1999. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 37(1): 165-170.
- Shin-Ichi, et al. 1995. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR amplified DNA from *Candida* species in blood. *J. Clin. Microbiol.* 33: 962-967.
- Sobczak, H.. 1985. A simple disc-diffusion test for differentiation of yeast species. *J. Med. Microbiol.* 20:307-316.
- Soll, D.R.. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:183-203.
- 20 Stringer, J.R.. 1996. *Pneumocystis carinii*: What is it, exactly? *Clin. Microbiol. Rev.* 9:489-498.
- Stuyver, L. et al. 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virology*, 74:1093-1102.
- Van Burik, et al. 1998. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1169-1175.
- 25 Weig, M. et al. 1997. Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patient groups. *J. Clin. Microbiol.* 35(6): 1445-1449.
- White et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. En Innis et al. (ed.), *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, California.
- 30 Williams, D.W., M.J. Wilson, M.A.O. Lewis y A.J.C. Potts. 1995. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 33:2476-2479.
- Williamson, M.I., L.P. Samaranayake y T.W. MacFarlane. 1986. Biotypes of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 24:81-84.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección y diferenciación simultáneas de las diferentes especies fúngicas patógenas siguientes *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans* en combinación entre sí, en un único ensayo, que incluye;
- 5 (i) liberar, aislar y/o concentrar los ácidos nucleicos de los patógenos fúngicos presentes posiblemente en la muestra,
- (ii) si es necesario, amplificar la región espaciadora transcrita interna (ITS) de dichos ácidos nucleicos con al menos un par de cebadores universales fúngicos,
- 10 (iii) hibridar los ácidos nucleicos de la etapa (i) o (ii) con las siguientes sondas de oligonucleótidos específicas de especie de ITS-1, seleccionándose estas sondas para detectar y diferenciar dichas diferentes especies fúngicas patógenas, que comprende;
- para *Candida albicans*:
- al menos una de GTCTAAACTTACAACCAATT (SEQ ID NO 1),
- 15 TGTCACACCAGATTATTACT (SEQ ID NO 2) o
- TATCAACTTGTCACACCAGA (SEQ ID NO 3),
- para *Candida parapsilosis*:
- TGCCAGAGATTAAACTCAAC (SEQ ID NO 5),
- para *Candida tropicalis*:
- 20 GGTTATAACTAAACCAAAC (SEQ ID NO 6),
- para *Candida krusei*:
- GGAATATAGCATATAGTCGA (SEQ ID NO 9),
- para *Candida glabrata*:
- GAGCTCGGAGAGACATC (SEQ ID NO 10),
- 25 - para *Cryptococcus neoformans*:
- CATCTACACCTGTGAACTGT (SEQ ID NO 15),
- para *Aspergillus flavus*:
- GTTTACTGTACCTTAGTTGCT (SEQ ID NO 18),
- para *Aspergillus versicolor*:
- 30 CCTCTCGGGGCGAGCC (SEQ ID NO 21),
- para *Aspergillus nidulans*:
- CCGAGTGCGGCTGCCTC (SEQ ID NO 22),
- para *Aspergillus fumigatus*:
- GTTGATTATCGTAATCAGT (SEQ ID NO 26),
- 35 o variantes de dichas sondas, difiriendo dichas variantes de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de uno o dos nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia de nucleótidos, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda, o los equivalentes de ARN de dichas sondas, en los que se reemplaza T por U, o las moléculas complementarias de dichas sondas, y (iv) detectar los complejos de hibridación formados en la etapa (iii).
- 40 2. Método según la reivindicación 1, en el que las sondas de la etapa (iii) se inmovilizan en un soporte sólido.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende (ii) amplificar la región espaciadora transcrita interna (ITS) de dichos ácidos nucleicos con al menos un par de cebadores universales fúngicos, en el que la

región ITS en la etapa (ii) se limita a la región ITS-1, y en el que las sondas en la etapa (iii) se eligen del siguiente conjunto de sondas para cada una de las diferentes especies fúngicas patógenas:

- para *Candida albicans*:

al menos una de GTCTAAACTTACAACCAATT (SEQ ID NO 1),

5 TGTCACACCAGATTATTACT (SEQ ID NO 2) o

TATCAACTTGTACACCAGA (SEQ ID NO 3),

- para *Candida parapsilosis*:

TGCCAGAGATTAACTCAAC (SEQ ID NO 5),

- para *Candida tropicalis*:

10 GGTATAACTAAACCAAAC (SEQ ID NO 6),

- para *Candida krusei*:

GGAATATAGCATATAGTCGA (SEQ ID NO 9),

- para *Candida glabrata*:

GAGCTCGGAGAGACATC (SEQ ID NO 10),

15 - para *Cryptococcus neoformans*:

CATCTACACCTGTGAAGTGT (SEQ ID NO 15),

- para *Aspergillus flavus*:

GTTTACTGTACCTTAGTTGCT (SEQ ID NO 18),

- para *Aspergillus versicolor*:

20 CCTCTCGGGGCGAGCC (SEQ ID NO 21),

- para *Aspergillus nidulans*:

CCGAGTGC GGCTGCCTC (SEQ ID NO 22),

- para *Aspergillus fumigatus*:

GTTGATTATCGTAATCAGT (SEQ ID NO 26),

25 o variantes de dichas sondas, difiriendo dichas variantes de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de uno o dos nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia de nucleótidos, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda,

o los equivalentes de ARN de dichas sondas, en los que se reemplaza T por U,

o los ácidos nucleicos complementarios de dichas sondas.

30 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho par de cebadores universales fúngicos se elige del siguiente grupo de pares de cebadores:

ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG e
ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC,

35 ITS5: GGAAGT AAAAGTCGT AACAAGG e
ITS2: GCTGCGTTCTTCATCGATGC,

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG e
ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC,

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG e
ITS2: GCTGCGTTCTTCATCGATGC,

40 ITS3: GCATCGATGAAGAACGCAGC e
ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC.

5. Conjunto de moléculas oligonucleotídicas aisladas que comprende las moléculas oligonucleotídicas representadas por;
- para *Candida albicans*:
 - al menos una de GTCTAAACTTACAACCAATT (SEQ ID NO 1),
 - 5 TGTCACACCAGATTATTACT (SEQ ID NO 2) o
 - TATCAACTTGTCACACCAGA (SEQ ID NO 3),
 - para *Candida parapsilosis*:
 - TGCCAGAGATTAAGTCAAC (SEQ ID NO 5),
 - para *Candida tropicalis*:
 - 10 GGTATAACTAAACCAAAC (SEQ ID NO 6),
 - para *Candida krusei*:
 - GGAATATAGCATATAGTCGA (SEQ ID NO 9),
 - para *Candida glabrata*:
 - GAGCTCGGAGAGACATC (SEQ ID NO 10),
 - 15 - para *Cryptococcus neoformans*:
 - CATCTACACCTGTGAAGTGT (SEQ ID NO 15),
 - para *Aspergillus flavus*:
 - GTTTACTGTACCTTAGTTGCT (SEQ ID NO 18),
 - para *Aspergillus versicolor*:
 - 20 CCTCTCGGGGCGAGCC (SEQ ID NO 21),
 - para *Aspergillus nidulans*:
 - CCGAGTGC GGCTGCCTC (SEQ ID NO 22),
 - para *Aspergillus fumigatus*:
 - GTTGATTATCGTAATCAGT (SEQ ID NO 26),
 - 25 o variantes de dichas sondas, difiriendo dichas variantes de las secuencias citadas anteriormente en la delección y/o adición de uno o dos nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia de nucleótidos, sin afectar al comportamiento de hibridación específica de especie de la sonda, o los equivalentes de ARN de dichas sondas, en los que se reemplaza T por U, o las moléculas complementarias de dichas sondas.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra es una muestra de sangre, y en el que etapa (i) comprende:
- 30 - incubar la muestra de sangre con tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM), seguido por centrifugar y retirar el sobrenadante, y
 - agitar en vórtex el sedimento celular resuspendido en presencia de perlas de vidrio.

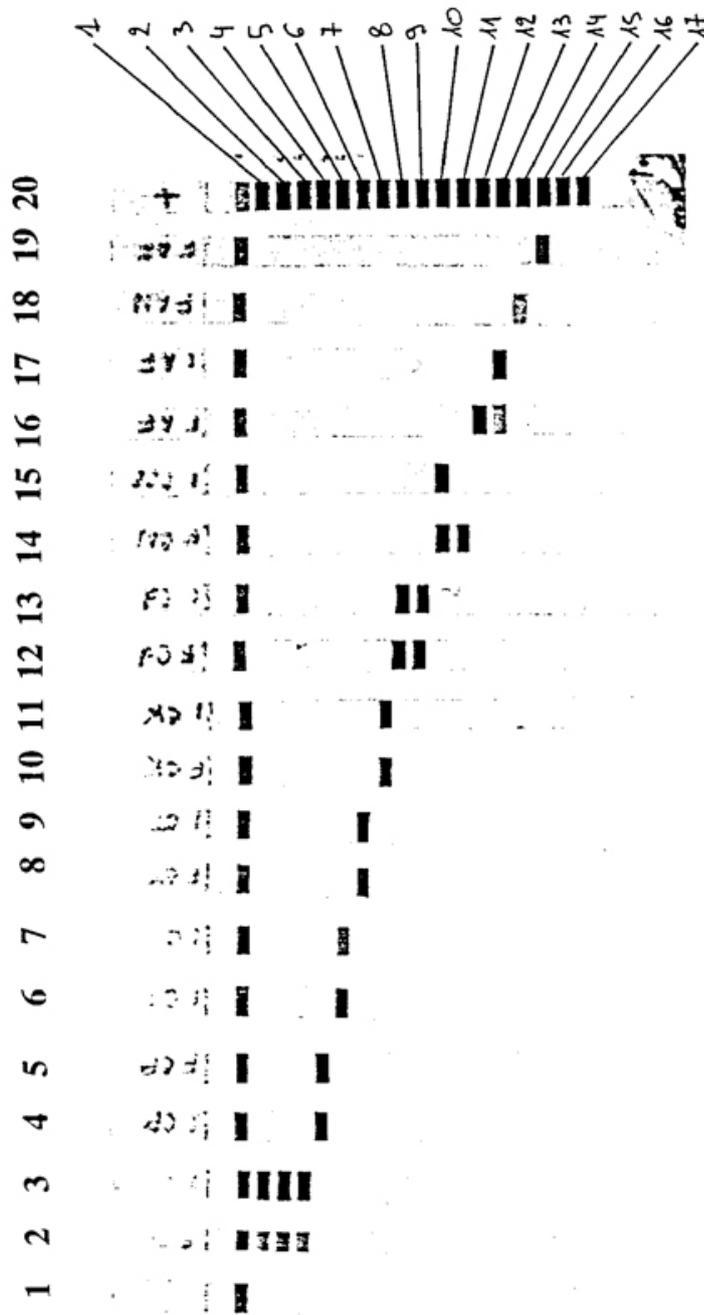


Figura 1

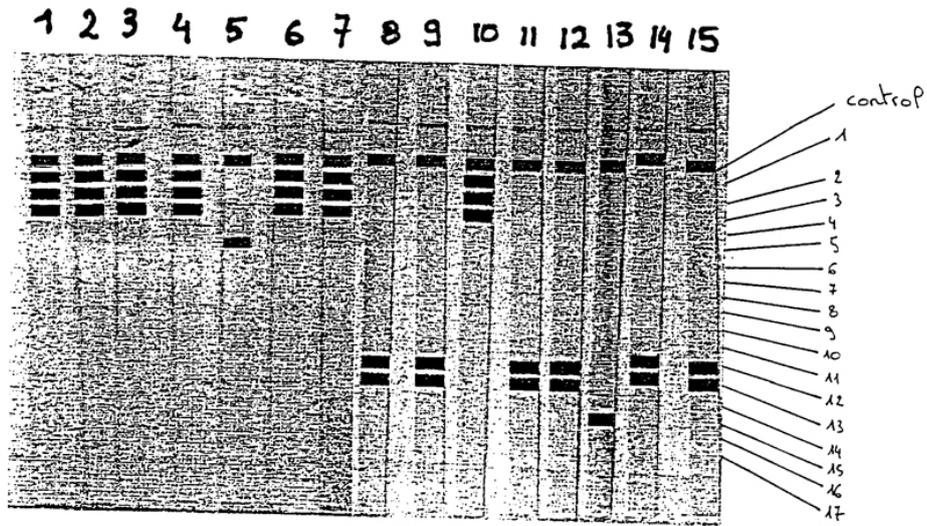


Figura 2