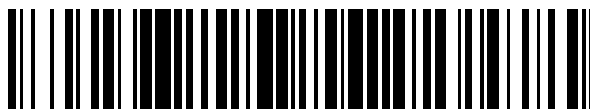


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 205**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2013 PCT/EP2013/063855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14001574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2013 E 13736816 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2867676**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico de las infecciones por Candida invasivas**

30 Prioridad:

29.06.2012 EP 12305778

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

04.08.2020

73 Titular/es:

**BIO-RAD EUROPE GMBH (33.3%)
Holbeinstrasse 75
4051 Basel, CH;
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
LILLE (33.3%) y
UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**DAMIENS, SÉBASTIEN;
FRADIN, CHANTAL;
POULAIN, DANIEL;
SENDID, BOUALEM y
TABOURET, MARC, CHARLES, VICTOR**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 777 205 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el diagnóstico de las infecciones por *Candida* invasivas

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar la candidiasis invasiva (CI) en un sujeto que comprende detectar el nivel de un manano de *Candida* y detectar el nivel de anticuerpo dirigido contra una proteína seleccionada del grupo que consiste en fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1) y manoproteína 65 (Mp65) en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto. La invención también se refiere a un procedimiento para determinar un régimen de
10 tratamiento adecuado para un paciente y a un kit para implementar los procedimientos de la invención.

[0002] La candidiasis es una infección micótica con levaduras de cualquier especie de *Candida*, de las cuales *Candida albicans* es la más común. La candidiasis abarca infecciones que van desde infecciones superficiales de la piel y las membranas mucosas, que causan inflamación y molestias locales, hasta candidiasis sistémicas o invasivas (CI). Las infecciones por *Candida* de esta última categoría también se conocen como infección de tejido profundo que
15 afecta a uno o varios órganos revelados o no por hemocultivo (candidemia). Estas formas graves de la enfermedad generalmente se limitan a personas gravemente inmunodeprimidas, como pacientes con cáncer, trasplantes o SIDA, pero también pueden ocurrir en unidades de cuidados intensivos médicos y quirúrgicos y pacientes con catéteres intravenosos.

20 **[0003]** La candidiasis invasiva sigue siendo un problema de salud pública que persiste en unidades de cuidados intensivos médicos y quirúrgicos, oncohematología, trasplantes de médula ósea y células madre hematopoyéticas y salas de recién nacidos prematuros. Según informes recientes, *Candida spp.* se coloca como la cuarta causa más común de infecciones nosocomiales en el torrente sanguíneo y se caracteriza por un importante impacto médico y económico relacionado con las dificultades del diagnóstico clínico y biológico. La candidiasis sistémica se asocia con
25 largas estadías en el hospital y tasas de mortalidad del 18 al 70 % y también se ha producido un cambio en el espectro de especies infectantes. Las especies que no son *Candida albicans*, aunque pueden tener un potencial patológico intrínseco más bajo que *C. albicans*, ahora se identifican en más del 45-60 % de las infecciones por candidiasis diseminada de forma hematogena. Además, el aumento de la morbilidad como consecuencia de la candidemia genera
30 importantes costes adicionales relacionados con estadías hospitalarias más prolongadas y tratamiento antifúngico profiláctico, empírico o curativo. Si bien la disponibilidad de nuevos medicamentos antimicóticos como las equinocandinas y los nuevos azoles es un paso prometedor para mejorar los resultados para los pacientes con candidiasis invasiva, es imprescindible una estrategia de diagnóstico definitivo y temprano para evitar retrasos en el inicio del tratamiento de pacientes infectados y prevenir terapias innecesarias en individuos de alto riesgo que solo
35 están colonizados. Este retraso en el inicio del tratamiento antifúngico apropiado es la causa de las altas tasas de mortalidad por morbilidad de CI y está relacionado con la falta de pruebas rápidas y fiables que distingan a los pacientes con CI de los pacientes con colonización superficial.

[0004] El examen histológico de biopsias y hemocultivos todavía se considera el procedimiento de referencia
40 para el diagnóstico de CI; sin embargo, estos procedimientos rara vez se realizan o son poco sensibles, respectivamente.

[0005] Se han desarrollado varios procedimientos rápidos no basados en el cultivo, incluida la detección de anticuerpos anti-*Candida* contra objetivos inmunogénicos y la detección del antígeno de *Candida* circulante (Yeo and
45 Wong. Clin Microbiol Rev 2002; 15:465-84). Sin embargo, solo unos pocos ensayos se han estandarizado y están disponibles comercialmente. Los ensayos de antígeno se dirigen a la detección de manano (Weiner and Yount. J Clin Invest 1976;58:1045-53; Herent y col. J Clin Microbiol 1992;30:2158-64), D/L arabinitol (Switchenko y col. J Clin Microbiol 1994;32:92-7), antígeno lábil al calor (Fung y col. J Clin Microbiol 1986;24:542-7) y (1→3)-β-D-glucanos (Ostrosky-Zeichner y col. Clin Infect Dis 2005;41:654-9; Senn y col. Clin Infect Dis 2008;46:878-85). Otro ensayo
50 dirigido a la enolasa ha sido abandonado (Walsh TJ y col. N Engl J Med. 1991 Apr 11;324(15):1026-31). Los ensayos de anticuerpos se dirigen al manano, el componente antigénico principal de la pared celular de la levadura. Sin embargo, estos procedimientos sin cultivo, incluso útiles, exhiben numerosos inconvenientes en su sensibilidad y especificidad y a veces requieren la combinación de dos o más resultados de análisis para un diagnóstico preciso de CI.

55 **[0006]** Se ha obtenido una mejora de la especificidad combinando la detección de manano sérico y anticuerpos antimanano (Sendid y col. J Clin Microbiol 1999; 37:1510-7). Tal mejora puede explicarse por el hecho de que cuando se detecta un antígeno específico y anticuerpos contra este antígeno en un mismo paciente, los anticuerpos pueden facilitar la eliminación del antígeno. Recientemente se ha publicado un reciente estudio de metaanálisis de los valores
60 de diagnóstico de estos dos ensayos (Mikulska y col. Crit Care. 2010;14(6): R222). El uso del antígeno manano y los anticuerpos antimanano en el diagnóstico de la candidiasis invasiva: recomendaciones de la Tercera Conferencia Europea sobre Infecciones en Leucemia. La detección de manano parece ser muy específica: 93 % en 767 pacientes (11 estudios) con 95 % CI ligera (91 % - 94 %). Sin embargo, la sensibilidad es débil: 58 % en 453 pacientes de 14 estudios (95 % CI: 53 % - 62 %). La adición de la detección de anticuerpos antimanano permitió aumentar la
65 sensibilidad hasta un 83 % (95 % CI: 79 % - 87 %), pero redujo la especificidad al 72 % debido a la menor especificidad

de la detección de anticuerpos antimanano, especialmente en pacientes muy colonizados (Ellis y col. J Med Microbiol 2009;58:606-15).

[0007] Se han señalado muchas proteínas adicionales que podrían ayudar en el diagnóstico de CI durante los últimos 10 años, especialmente con el desarrollo del análisis proteómico. Algunas de ellas parecen ser específicas del procedimiento patogénico. De hecho, se ha informado que más de veinte proteínas de *Candida* se han sobreexpresado durante las fases de cambio saprofítico/patogénico que conducen a investigar sus valores para el diagnóstico de CI (Clancy y col. J Clin Microbiol 2008; 46:1647-54). El valor diagnóstico no se ha confirmado para la mayoría de estas proteínas identificadas y para el resto solo se han obtenido resultados primarios en ensayos no estandarizados o ultramodernos. Proteína de pared de la hifa (Hwp1) [Staab y col. J Biol Chem 1996;271:6298-305; Lain y col. BMC Microbiol 2007;7:35 ; Martin y col. Int J Med Microbiol;301:417-22], familia de secuencia similar a la aglutinina (Als3) [Martin y col. Int J Med Microbiol;301:417-22 ; Hoyer y col. Curr Genet 1998;33:451-9 ; Green y col. Infect Immun 2005;73:1852-5], superóxido dismutasa (Sod) [Martin y col. Int J Med Microbiol;301:417-22], metionina sintetasa -Met6 [Pitarch y col. Proteomics 2001;1:550-9 ; Pitarch y col. Proteomics 2004;4:3084-106 ; Pitarch y col. Proteomics Clin Appl 2007;1:1221-42], malato deshidrogenasa [Hernando y col. Int Microbiol 2007;10:103-8], fructosa-bisfosfato aldolasa [Pitarch y col. Proteomics 2001;1:550-9 ; Hernando y col. Int Microbiol 2007;10:103-8], familia de Hsp70 [La Valle y col. Infect Immun 2000;68:6777-84; Pitarch y col. Proteomics 2001;1:550-9], Hsp90 [Matthews RC. J Med Microbiol 1992;36:367-70; Pitarch y col. Proteomics 2001;1:550-9], fosfoglicerato quinasa (PGK) [Pitarch y col. Proteomics 2001;1:550-9 ; Pitarch y col. Proteomics 2004;4:3084-106; Hernando y col. Int Microbiol 2007;10:103-8 ; Clancy y col. J Clin Microbiol 2008;46:1647-54], dominio catalítico de la diacilglicerol quinasa [Hernando y col. Int Microbiol 2007;10:103-8], gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3P) [Pitarch y col. Proteomics 2001;1:550-9], alcohol deshidrogenasa (ADH1) [Pitarch y col. Proteomics 2001;1:550-9], diacilglicerol quinasa [Hernando y col. Int Microbiol 2007;10:103-8], manoproteína 65 kDa (CamP65) [Berzaghi y col. Clin Vaccine Immunol 2009;16:1538-45] forman parte de todas estas proteínas identificadas por estrategias proteómicas.

[0008] Se dispone de resultados limitados para concluir la posibilidad de usar estas proteínas para mejorar el diagnóstico de CI y se requieren más estudios prospectivos para confirmar la utilidad en la práctica clínica.

[0009] Los inventores evaluaron el rendimiento diagnóstico de un grupo de pruebas ELISA que detectan inmunoglobulinas totales contra seis proteínas recombinantes de *Candida albicans* obtenidas de *E. coli* transfectadas por plásmidos específicos que contienen genes de *Candida albicans* con fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1), manoproteína 65 (Mp65) y superóxido dismutasa 5 (SOD5). Estas pruebas se compararon con las pruebas de mananemia y anticuerpos antimanano ya comercializadas. La cohorte consistió en pacientes con CI determinada por *Candida albicans* (53 pacientes y 157 sueros) o especies de *Candida* no albicans (40 pacientes y 142 sueros). El grupo de control consistió en 80 donantes de sangre (80 sueros) y 90 pacientes colonizados por *Candida* (90 sueros) sin evidencia de CI. Las investigaciones preliminares permitieron seleccionar Hsp90, Hwp1, Fba1, Eno1 y Mp65 como los mejores *Candidatos* para una evaluación clínica adicional de su utilidad para el diagnóstico de CI.

[0010] Para mejorar el potencial diagnóstico de estos biomarcadores, se realizó una combinación con antigenemia del manano. De hecho, con una especificidad arbitrariamente fijada en 80,0 %, la asociación de mananemia/anticuerpo de antiproteína recombinante (RP-Ab), las sensibilidades específicas de Hsp90 Ab, Fba1 Ab, Hwp1 Ab, Eno1 Ab y Mp65 Ab fueron 80,9 %, 83,8 %, 83,8 %, 79,1 % y 75,5 %, mientras que la combinación de mananemia/ anticuerpos antimanano conduce a una sensibilidad de 61,7 % para pacientes con CI frente a los controles (donantes de sangre + pacientes hospitalizados y colonizados). Cuando se comparó la fecha de positividad de RP-Ab/mananemia con la fecha de hemocultivo positivo, se observó el retraso medio de 5 días antes del aislamiento de las especies de *Candida* de la sangre para todos los biomarcadores de RP-Ab.

[0011] En conjunto, estos resultados indican que la asociación anti-Hsp90, anti-Fba1, anti-Hwp1, anti-Eno1 o anti-Mp65 Ab/mananemia puede sustituir ventajosamente anticuerpos antimanano/mananemia para la predicción o el diagnóstico precoz de CI. Tal resultado fue inesperado porque, mientras que la detección de anticuerpos del manano y antimanano es complementaria en pacientes con candidiasis invasiva, muy probablemente debido a la implicación de los anticuerpos antimanano en la eliminación del manano soluble, no podría esperarse tal complementariedad para el manano y anticuerpos anti-Hsp90, anti-Fba1, anti-Hwp1, anti-Eno1 o anti-Mp65 en función de un mecanismo de eliminación de antígeno. Por lo tanto, fue completamente sorprendente que la especificidad y la sensibilidad del diagnóstico de candidemia pudieran mejorarse reemplazando la detección de anticuerpos antimanano por la detección de anticuerpos contra Hwp1, Eno1, Fba1, Hsp90 o Mp65.

Procedimiento para diagnosticar la candidiasis invasiva

[0012] La presente solicitud describe un procedimiento *in vitro* para diagnosticar la candidiasis invasiva (CI) en un sujeto, dicho procedimiento comprende, o consiste en, las etapas que consisten en:

- a) detectar la presencia de un glicano de *Candida* en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto;
- b) detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que

consiste en fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1) y manoproteína 65 (Mp65) en una muestra de sangre o plasma del sujeto; y
c) donde la presencia de dicho glicano de *Candida* y/o de dicho anticuerpo dirigido contra una proteína seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65 es indicativa de CI.

[0013] La «candidiasis invasiva» o «CI» también se denomina candidemia y denota infección sistémica con levaduras de cualquier especie de *Candida*, p. ej., *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Geotrichum capitatum*, *Candida norvegiensis* y *Candida guilliermondii*. *Candida albicans* es la especie de *Candida* más común. La CI puede diagnosticarse en última instancia mediante examen histológico de biopsias y detección de especies de *Candida* en hemocultivos.

[0014] Preferentemente, la candidiasis invasiva se debe a la infección con una especie de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Geotrichum capitatum* y *Candida norvegiensis*.

[0015] Por lo tanto, un glicano de *Candida* y/o una proteína de *Candida* puede ser preferentemente un glicano y/o proteína que se encuentra en una o más especies de *Candida* seleccionadas del grupo que consiste en *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Geotrichum capitatum* y *Candida norvegiensis*.

[0016] Un «sujeto» o «paciente» puede ser un mamífero humano o no humano, como monos, perros, gatos, cobayas, hámsteres, conejos, vacas, caballos, cabras y ovejas. Preferentemente, el sujeto es un ser humano, en particular un hombre, una mujer o un niño (0-18 años).

[0017] Por «detectar la presencia» de un antígeno o anticuerpo, se entiende que en la mayor medida se determina que el antígeno o anticuerpo está presente o ausente en la muestra a analizar. Según una realización, se detecta el nivel de dicho glicano de *Candida* y/o anticuerpo dirigido contra dicha proteína de *Candida*.

[0018] Por consiguiente, el procedimiento puede comprender o consistir en las etapas que consisten en:

- a) detectar el nivel de un glicano de *Candida* en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto;
- b) detectar el nivel de anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1) y manoproteína 65 (Mp65) en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto; y
- c) donde un nivel elevado de dicho glicano de *Candida* y/o un nivel elevado de dicho anticuerpo dirigido contra dicha proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65 en relación con un nivel de referencia indica candidiasis invasiva

[0019] Como se usa en el presente documento, un «glicano de *Candida*» denota un componente de oligosacárido o polisacárido de la pared celular de una especie de *Candida*. Los carbohidratos representan del 80 al 90 % (peso/peso) de la pared celular de *Candida albicans*. Los principales carbohidratos son

- (i) manano, es decir, polímeros de manosa en una variedad de disposiciones de enlace α y β que están asociadas covalentemente con proteínas para formar glucoproteínas también conocidas como manoproteínas. El término «manano» también se usa para referirse al principal componente inmunodominante soluble presente en la capa de la pared celular externa de las especies de *Candida*. Una estructura representativa de manano de *Candida albicans* ha sido descrita en Martínez y col. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11(1), 121-141. El manano se compone de tres componentes principales de azúcar: la cadena externa más larga, el núcleo interno enlazado a N unido al polipéptido y los oligosacáridos lábiles base o enlazados de manera glucosídica a O más cortos unidos al polipéptido. Los polímeros de manosa están unidos a proteínas por enlaces N-glucosídicos (a través de dos unidades GlcNAc [di-N-acetilchitobiose]) a residuos de asparagina y por enlaces lábiles álcali O-glucosídicos a treonina o residuos de serina. El carbohidrato enlazado de manera glucosídica a N tiene una cadena principal de residuos de manopiranosilo enlazados a α -1,6 con ramas de oligosacáridos que contienen residuos de manopiranosilo con unidades de manosa enlazadas a α -1,2, α -1,3, β -1,2, β -1,4 y α -1,6 individuales y enlaces fosfodiéster. Los residuos de manosa simples y los oligosacáridos de manosa cortos y no ramificados constituyen el componente de azúcar enlazado de manera glucosídica a O;
- (ii) β -glucanos, es decir, polímeros de glucosa, en particular polímeros ramificados, que contienen enlaces β -1,3 y β -1,6. Los β -glucanos incluyen en particular (1,3)- β -D-glucano y (1,6)- β -D-glucano;
- (iii) quitina, que es un homopolímero no ramificado de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc).

[0020] Por «detectar la presencia o nivel de un glicano de *Candida*», se entiende que se detecta la presencia o nivel de al menos un glicano de *Candida*. Según una realización, una presencia o nivel de un glicano de *Candida* que se determina puede ser la presencia o el nivel de manano, β -glucano (en particular (1,3)- β -D-glucano) o quitina. En particular, la presencia o nivel de un glicano de *Candida* que se determina puede ser la presencia o nivel de manano, solo. Aunque la caracterización del ensayo ha demostrado que las combinaciones de más de dos de los

marcadores definidos en este documento (glicano de *Candida* y anticuerpo dirigido contra una proteína de *Candida* como se mencionó anteriormente) no mejoraron significativamente la potencia discriminadora del procedimiento, la presencia o el nivel de más de un glicano de *Candida*, pudo determinar, por ejemplo, la presencia o nivel de manano y la presencia o nivel de al menos un β -glucano (en particular (1,3)- β -D-glucano), o la presencia o nivel de manano y la presencia o nivel de quitina, o la presencia o nivel de al menos un β -glucano (en particular (1,3)- β -D-glucano) y la presencia o nivel de quitina.

[0021] La «presencia o nivel de un glicano de *Candida* en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto» es representativa de la presencia o nivel del glicano de *Candida* en la sangre circulante del sujeto. La presencia o nivel del glicano de *Candida* puede denotar en particular la presencia o nivel de glicano de *Candida* soluble, ya que, por ejemplo, el manano se libera de las manoproteínas por escisión proteolítica. Por lo tanto, la «presencia o nivel de manano en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto» puede denotar en particular la presencia o nivel del componente inmunodominante soluble de las manoproteínas de *Candida*, el manano. La detección o el nivel del antígeno manano también se llama mananemia.

[0022] La presencia o el nivel de un glicano de *Candida* se puede determinar mediante cualquier procedimiento químico o bioquímico adecuado conocido por el experto en la técnica, como cromatografía, procedimientos quimioluminiscentes basados en enzimas, Biacore o espectrometría de masas.

[0023] Por ejemplo, la prueba enzimática cromogénica Fungitell® (que se comercializa por Associates of Cape Cod Inc.) podría usarse para detectar (1,3)- β -D-glucano.

[0024] Además, las lectinas que se unen específicamente a la quitina, o al (1,3)- β -D-glucano o (1,6)- β -D-glucano, podrían usarse para la detección de quitina, o (1,3)- β -D-glucano o (1,6)- β -D-glucano.

[0025] Sin embargo, se usan preferentemente como procedimientos basados en anticuerpos, que se describen con más detalle a continuación. En este contexto, los inmunoensayos son particularmente adecuados.

[0026] El procedimiento incluye además detectar la presencia o el nivel de anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en fructosa bífosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1) y manoproteína 65 (Mp65) en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto.

[0027] La presencia o el nivel de un glicano de *Candida* y de anticuerpos dirigidos contra la proteína de *Candida* se pueden detectar (i) en una misma muestra de sangre, plasma o suero del paciente o (ii) en varias muestras de sangre, plasma o suero obtenidas secuencialmente del mismo paciente, (iia) ya sea al mismo tiempo (es decir, esencialmente simultáneamente o con no más de 3 minutos de diferencia) o al menos con no más de 72 horas, no más de 48 horas, no más de 24 horas, preferentemente no más de 12 horas, preferentemente no más de 6 horas, aún preferentemente no más de 3 horas de diferencia, o (iib) en el curso de la monitorización del paciente, p. ej., con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días de diferencia.

[0028] El procedimiento de la invención se lleva a cabo preferentemente al menos dos veces por semana. El procedimiento de la invención también se lleva a cabo preferentemente siempre que el sujeto esté en riesgo de desarrollar candidiasis invasiva, en particular mientras el paciente esté hospitalizado.

[0029] La «fructosa bífosfato aldolasa» o «Fba1» es una enzima implicada en la glucólisis y la gluconeogénesis y que está regulada por el intercambio levadura-hifa. Una secuencia representativa para Fba1 es Fba1 de *Candida albicans* SC5314 que está codificada, por ejemplo, por un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, y que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2. Estas secuencias fueron publicadas en Jones y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (19), 7329-7334 (2004). La secuencia del genoma diploide de *Candida albicans* está disponible en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* con el número de acceso XM_717597 (disponible el 14/02/2012).

[0030] «Enolasa 1» o «Eno1» denota una enzima glucolítica (EC 4.2.1.11) presente en el citoplasma y, en cantidades menores, en la capa interna de la pared celular de *C. albicans*. Una secuencia representativa para Eno1 es Eno1 de *Candida* SC5314 que está codificada, por ejemplo, por un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4. Estas secuencias fueron publicadas en Jones y col.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (19), 7329-7334 (2004). La secuencia del genoma diploide de *Candida albicans* está disponible en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* con el número de acceso XM_706819 (disponible el 14/02/2012).

[0031] La «proteína de choque térmico 90» o "Hsp90" es una chaperona molecular que participa, en *Candida albicans*, en la transición morfogénica de la levadura al crecimiento filamentoso. Se ha informado que Hsp90 está presente en la pared celular de *Candida albicans* y circula en los fluidos corporales de pacientes con candidiasis invasiva. Una secuencia representativa para Hsp90 es Hsp90 de *Candida* SC5314 que está codificada, por ejemplo, por un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ

ID NO: 6. Estas secuencias fueron publicadas en Chibana y col. Genetics 170 (4), 1525-1537 (2005). El acabado de secuencia y el mapeo de genes para *Candida albicans* están disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* con el número de acceso XM_883730 (disponible el 14/02/2012).

5 **[0032]** La «proteína de pared de la hifa» o «Hwp1» denota una manoproteína expresada específicamente en la superficie de la pared celular de las hifas de *C. albicans*. Una secuencia representativa para Hwp1 es Hwp1 de *Candida* SC5314 que está codificada, por ejemplo, por un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 y que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8. Estas secuencias fueron publicadas en Jones y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (19), 7329-7334 (2004). La secuencia del genoma diploide de *Candida albicans* está
10 disponible en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* con el número de acceso XM_707905 (disponible el 14/02/2012).

[0033] «Manoproteína 65» o «Mp65» denota una manoproteína de 65 kDa que está presente en la pared celular y también en los sobrenadantes de cultivo de *Candida* y que se cree que tiene propiedades adhesivas. Una secuencia
15 representativa para Mp65 es Mp65 de *Candida* SC5314 que está codificada, por ejemplo, por un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 y que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10. Estas secuencias fueron publicadas en Jones y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (19), 7329-7334 (2004). La secuencia del genoma diploide de *Candida albicans* está disponible en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* con el número de acceso XM_709288 (disponible el 14/02/2012).

20 **[0034]** Deberá entenderse que las proteínas Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65 de *Candida* están destinadas a abarcar cualquier variante o proteína isoforma naturalmente existente que difiera de las secuencias de aminoácidos representativas respectivas identificadas anteriormente mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos y/o del patrón de glucosilación de la proteína. Por modificación de la secuencia de aminoácidos se entiende la eliminación,
25 adición o sustitución de al menos un aminoácido, por ejemplo, de 1 a 15 aminoácidos, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos. Preferentemente, la proteína variante o isoforma tiene al menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representativa, como se puede determinar por alineación global por pares utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch. El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar fácilmente, por ejemplo, utilizando el programa Needle, con la matriz BLOSUM62, y los siguientes
30 parámetros gap-open = 10, gap-extend = 0,5.

[0035] Las proteínas Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65 de *Candida* pueden provocar anticuerpos en sujetos infectados con especies de *Candida* y desarrollar CI.

35 **[0036]** Los anticuerpos a detectar pueden ser una IgM, IgD, IgG (en particular IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA e IgE, o cualquier combinación de las mismas.

[0037] Como se usa en el presente documento, detectar «la presencia o el nivel de anticuerpos dirigidos contra una proteína seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65 de *Candida*» significa que la
40 presencia o el nivel de anticuerpos contra al menos una de entre Hsp90, Fba1, Hwp1, Eno1 y Mp65 se detectan. Según una realización, solo se detecta la presencia o el nivel de anticuerpos contra Fba1, o anticuerpos contra Eno1, o anticuerpos contra Hsp90, o anticuerpos contra Hwp1, o anticuerpos contra Mp65. Aunque las combinaciones de más de dos de los marcadores definidos en la presente invención (glicano de *Candida* y anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida*) pueden no mejorar significativamente la potencia discriminativa del procedimiento, se puede
45 detectar la presencia o el nivel de anticuerpos contra más de una proteína de *Candida*, en particular 2 o 3, proteínas de *Candida*, tal como se mencionan en esta invención. Por ejemplo, la presencia o nivel de anticuerpos contra Fba1 y la presencia o nivel de anticuerpos contra Eno1, o la presencia o nivel de anticuerpos contra Fba1 y la presencia o nivel de anticuerpos contra Hsp90, o la presencia o nivel de anticuerpos contra Fba1 y el presencia o nivel de anticuerpos contra Hwp1, o la presencia o nivel de anticuerpos contra Fba1 y la presencia o nivel de anticuerpos contra
50 Mp65, o la presencia o nivel de anticuerpos contra Eno1 y la presencia o nivel de anticuerpos contra Hsp90, o la presencia o nivel de anticuerpos contra Eno1 y la presencia o nivel de anticuerpos contra Hwp1, o la presencia o nivel de anticuerpos contra Eno1 y la presencia o nivel de anticuerpos contra Mp65, o la presencia o nivel de anticuerpos contra Hwp1 y la presencia o nivel de anticuerpos contra Mp65.

55 **[0038]** Cuando la proteína de *Candida* es una glucoproteína, como Hwp1, Hsp90 y Mp65, los anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida* que se detectan o miden pueden ser los anticuerpos que se unen a una forma desglucosilada de dicha proteína de *Candida*.

[0039] La presencia o nivel de anticuerpos puede determinarse mediante cualquier procedimiento de
60 inmunoensayo adecuado conocido por el experto en la técnica, como se describe a continuación.

[0040] El procedimiento preferentemente no incluye la detección de biomarcadores adicionales, que no sean glicano(s) de *Candida* y anticuerpo(s) dirigidos contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65. En particular, el procedimiento preferentemente no comprende la detección de
65 anticuerpos dirigidos contra los glicanos de *Candida*, especialmente contra el manano.

Procedimiento de inmunoensayo

[0041] Los inmunoensayos son procedimientos basados en anticuerpos que permiten medir antígenos o anticuerpos. Por lo general, incluyen inmunoensayos indirectos, intercalados o de competencia, por ejemplo, en formato de radioinmunoensayos (RIA) o EIA (Enzyme ImmunoAssay). Un inmunoensayo tipo sándwich es un procedimiento que usa dos anticuerpos específicos para el antígeno a detectar, que se unen a distintos sitios en el antígeno o ligando. El anticuerpo primario (o anticuerpo de captura), que reconoce el antígeno, está unido a una superficie sólida. A continuación, se agrega el antígeno seguido de la adición de un segundo anticuerpo denominado anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección se une al antígeno a un epítipo(s) distinto o repetido. A medida que aumenta la concentración de antígeno, aumenta la cantidad de anticuerpo de detección que conduce a una respuesta medida más alta.

[0042] Para cuantificar el grado de unión, se pueden usar distintos indicadores: un marcador radiactivo en RIA, o un fluoróforo o enzima en EIA (en particular en ELISA). En ELISA, una enzima se une normalmente al anticuerpo de detección o a un tercer anticuerpo que se une al anticuerpo de detección y que debe generarse en una especie distinta a los anticuerpos de detección (es decir, si el anticuerpo de detección es un anticuerpo de conejo, el tercer anticuerpo sería un anticonejo de cabra, pollo, etc., pero no de conejo). El sustrato para la enzima se agrega a la reacción que forma una lectura colorimétrica como señal de detección. La etapa enzimática del ensayo se puede reemplazar con una detección marcada con fluoróforo y la señal fluorescente se mide en un lector de placa fluorescente. La señal generada es proporcional a la cantidad de antígeno diana presente en la muestra.

[0043] Un ensayo de saturación competitivo se basa en la competencia del antígeno marcado y no marcado por un número limitado de sitios de unión de anticuerpos. Una cantidad fija de antígeno marcado y una cantidad variable de antígeno no marcado se incuban con un anticuerpo unido a una fase sólida. La cantidad de antígeno marcado es una función de la concentración total de antígeno marcado y no marcado. A medida que aumenta la concentración de antígeno no marcado, un antígeno menos marcado puede unirse al anticuerpo y la respuesta medida disminuye. Así, cuanto más baja es la señal, más antígeno no marcado hay en la muestra.

[0044] En inmunoensayo indirecto, un antígeno se reviste sobre una superficie sólida. La superficie sólida recubierta se incuba a continuación con una muestra para analizar si contiene anticuerpos específicos para el antígeno. La detección de anticuerpos unidos al antígeno se realiza a continuación usando un anticuerpo secundario marcado de forma detectable que se une al anticuerpo específico para el antígeno. El anticuerpo secundario puede marcarse con un fluoróforo que genera una señal fluorescente medible en un lector de placa fluorescente o con una enzima que puede producir una señal colorimétrica tras la adición del sustrato enzimático.

[0045] El inmunoensayo se puede realizar en un formato de ensayo de inmunocromatografía de flujo lateral, formato de inmunoensayo alto y/o multiplex como Luminex®, plataforma o cualquier formato derivado de microfluidos como inmunoensayos de microchip, etc.

[0046] Como se usa en esta invención, «anticuerpo» o «inmunoglobulina» tienen el mismo significado y se usan por igual. En los anticuerpos convencionales naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG (como IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄), IgA e IgE. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente CH). Las regiones variables de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión al antígeno. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico (epítipo). Los sitios de combinación de anticuerpos están formados por residuos que provienen principalmente de las regiones determinantes de hipervariabilidad o complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de regiones no hipervariables o de estructura (FR) influyen en la estructura general del dominio y, por lo tanto, en el sitio de combinación. La CDR se refiere a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y ligera. FR se refiere a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDR.

[0047] Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos policlonales o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoespecíficos, producidos por clones de una línea celular de hibridoma, que se unen al mismo epítipo en un antígeno. Los anticuerpos policlonales son una combinación de inmunoglobulinas dirigidas contra un antígeno específico y cada inmunoglobulina posiblemente se une a un epítipo distinto en el antígeno. Los anticuerpos policlonales generalmente se producen por inmunización de un mamífero adecuado, como un ratón, conejo o cabra. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂,

Fv, scFv y nanocuerpos (anticuerpos de cadena sencilla).

[0048] Para la detección de un glicano de *Candida*, se pueden usar anticuerpos que se unen preferentemente o específicamente a dicho glicano de *Candida*. Los anticuerpos que pueden usarse para la detección de un glicano de *Candida* pueden ser anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos policlonales o fragmentos de los mismos.

[0049] Como se usa en esta invención, un anticuerpo que se une «preferentemente» a dicho glicano de *Candida*, es un anticuerpo que muestra menos del 15 % de reactividad cruzada, preferentemente menos del 10 % o 5 % de reactividad cruzada, con un antígeno distinto de dicho glicano de *Candida*. Un anticuerpo que se une «específicamente» a dicho glicano de *Candida* es un anticuerpo que no muestra reactividad cruzada con ningún otro antígeno.

[0050] Para la detección de manano, los anticuerpos que se unen a secuencias de oligomanosa enlazadas a α -1,2 de más de cuatro residuos, o a oligomanósidos enlazados a β -1,2 podrían usarse, por ejemplo. El anticuerpo monoclonal EBCA1, que está disponible en las pruebas Platelia *Candida* antigen y Platelia *Candida* antigen Plus (Ag) (Bio-Rad Laboratories, Marnes La-Coquette, Francia), se une a un epítipo mínimo que consiste en enlaces α -1,2 secuencias de oligomanosa de más de cuatro (o al menos cinco) residuos que están presentes en la fracción de manano estable al ácido. Se podrían usar otros anticuerpos monoclonales para la detección de oligomanósidos unidos a β -1,2, tales como el anticuerpo 5B2 que se une preferentemente con manobiósidos (Hopwood y col. Infect. Immun. 1986, 54, 222-227; Collet M et al J. Med. Chem. 2008; 51:6201-6210), anticuerpo B6.1, que se une específicamente a la manotriosa (Han, Y col. Infect. Immun. 1997; 65:4100.) y el anticuerpo 26G7 que reconoce un heteropolímero 2 beta y 2 alfa-manósidos (Elguezabal y col., Oral Dis, 2004, 10, 81-86).

[0051] En particular, el manano puede detectarse convenientemente mediante un inmunoensayo enzimático tipo sándwich que usa, como anticuerpos de captura y detección, un anticuerpo que reconoce secuencias de oligomanosas enlazadas a α constituidas por más de cuatro (o al menos cinco) residuos, como el anticuerpo monoclonal EBCA1.

[0052] Los β -glucanos y la quitina son inmunogénicos ya que se han encontrado anticuerpos anti- β -D-glucanos y anticuerpos antiquitina circulantes en humanos (Sendid y col. Clin. Vaccine Immunol. 2008, 15, 1868-1877). En consecuencia, los anticuerpos se pueden provocar contra (1,6)- β -D-glucano, (1,3)- β -D-glucano o quitina para usarse en un inmunoensayo para detectar un (1,6)- β -D-glucano o quitina.

[0053] Para la detección de (1,3)- β -D-glucano y/o (1,6)- β -D-glucano, se puede usar un anticuerpo como el anticuerpo 2G8 que se describió en la solicitud de patente internacional WO2006/030318 o un anticuerpo anti-(1,3)- β -D-glucano tal como el disponible de Biosupplies Australia Pty. Ltd.

[0054] Para la detección de uno o más anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida*, se puede usar proteína de *Candida* purificada, o fragmentos epitópicos de la misma, o un polipéptido que comprende proteína de longitud completa, fragmentos epitópicos o variantes de la misma que se han producido recombinantemente o sintetizado químicamente. Cuando la proteína de *Candida* es una glucoproteína, la proteína de *Candida* purificada, o sus fragmentos epitópicos, pueden haber sido desglucosilados. Las proteínas de longitud completa purificadas y recombinantes o sus fragmentos epitópicos pueden incluir o no glucosilación. Preferentemente, el polipéptido usado para la detección de un anticuerpo dirigido contra una proteína de *Candida* carece de glucosilación.

[0055] Como se usa en esta invención, el término «fragmento epitópico» se refiere a un fragmento de polipéptido de una proteína que consiste en un tramo de aminoácidos contiguos de la proteína y comprende uno o más epítopos de dicha proteína. Un fragmento epitópico conserva la capacidad de unirse por al menos parte, preferentemente todos, de los anticuerpos que se unen a la proteína de longitud completa de la que se deriva el fragmento. Un epítipo puede ser lineal cuando está hecho de aminoácidos contiguos, o conformacional cuando un anticuerpo se une a aminoácidos discontinuos que se unen en conformación tridimensional. Generalmente se admite que un epítipo lineal está constituido por al menos 4 o 5 residuos contiguos de aminoácidos. Por consiguiente, un «fragmento epitópico» según la invención comprende preferentemente al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos de la proteína de donde deriva el fragmento epitópico. Un «fragmento epitópico» puede comprender menos de 300, 250, 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20 o 15 aminoácidos.

[0056] Los fragmentos pueden generarse, por ejemplo, procesando la proteína de longitud completa, o un fragmento más largo de dicha proteína, con una enzima proteolítica (habitualmente tripsina, quimotripsina o colagenasa), o por tratamiento químico con bromuro de cianógeno (CNBr), por ejemplo.

[0057] Los polipéptidos variantes de la proteína de *Candida* de longitud completa o de un fragmento epitópico de la misma pueden obtenerse modificando su secuencia de aminoácidos por delección, adición o sustitución, de al menos un aminoácido, por ejemplo, de 1 a 15 aminoácidos, como por ejemplo 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido variante tiene al menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la proteína de *Candida* de longitud completa o un fragmento epitópico de la misma, como puede ser

determinado por la alineación global por pares usando el algoritmo Needleman-Wunsch, en particular usando el programa Needle, con la matriz BLOSUM62, y los siguientes parámetros gap-open = 10, gap-extens = 0,5. Un polipéptido variante retiene la capacidad de unirse por al menos parte, preferentemente todos, de los anticuerpos que se unen a la proteína de longitud completa o al fragmento de la misma de la que deriva. Un polipéptido variante puede comprender típicamente una secuencia de polipéptido heterólogo, tal como una etiqueta (etiqueta His, GFP, etc.) para facilitar la purificación.

[0058] La desglucosilación de la (gluco)proteína de *Candida*, de sus fragmentos, se puede realizar por cualquier procedimiento químico o enzimático compatible con la preservación de la antigenicidad de la proteína (es decir, el mantenimiento de las estructuras del epítipo). Se puede hacer referencia, por ejemplo, a la hidrólisis del ácido trifluorometanosulfónico (TFMS) para la eliminación completa del glicano sin alterar el componente de la proteína, o al procesamiento con las enzimas PNGasa o F Endoglucosidasas F1, F2 y F3 para la eliminación de los glicanos enlazados a N.

[0059] La proteína de longitud completa recombinante de *Candida*, fragmentos epitópicos o variantes de la misma se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia. Típicamente, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido deseado, bajo el control o asociada operativamente con secuencias de control transcripcionales y traduccionales (en particular una secuencia promotora) se inserta en un vector de expresión. Un vector es el vehículo por el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula huésped, para transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virosas, etc. Un «sistema de expresión», es decir, la célula huésped y un vector compatible para la expresión de la proteína de *Candida*, o un fragmento epitópico de la misma, puede incluir células huésped de *E. coli* y vectores plasmídicos, células huésped de levadura (como *Pichia pastoris*) y vectores y vectores plasmídicos, células huésped de insecto y vectores de baculovirus, y células huésped de mamífero (tales como células COS-1 o CHO) y vectores. Preferentemente, la proteína de *Candida* recombinante o sus fragmentos epitópicos se producen en *E. coli*. Las proteínas recombinantes pueden producirse con indicadores, tales como los indicadores His, para facilitar su purificación, que puede eliminarse después.

[0060] Para fragmentos epitópicos que preferentemente contienen no más de 20 aminoácidos, se puede emplear síntesis química tal como síntesis en fase sólida para preparar los fragmentos epitópicos.

[0061] Se ha informado que se puede encontrar un antígeno de 47 kDa que es un producto de descomposición estable al calor de Hsp90 en pacientes con candidiasis sistémica. La clonación de este fragmento de 47 kDa (que consiste en aminoácidos en las posiciones 313 a 707 de la secuencia Hsp90 SEQ ID NO: 6) se ha descrito en Matthews and Burnie, 1989, FEMS Microbiol. Lett. 60:25-30 y en la patente US 5.686.248. Se ha demostrado además que los anticuerpos contra el antígeno de 47 kDa de Hsp90 reaccionan de forma cruzada con péptidos de secuencias STDEPAGESA (SEQ ID NO: 13), LSREM (SEQ ID NO: 14), LKVIRK (SEQ ID NO: 15) y LK- VIRKNIVKKMIE (SEQ ID NO: 16). Por consiguiente, un polipéptido que puede usarse para detectar anticuerpos anti-Hsp90 puede seleccionarse en particular del grupo que consiste en un polipéptido que comprende o que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 6 o una variante o isoforma existente de forma natural de la misma;
- b) un fragmento epitópico de un polipéptido definido en a), en particular un fragmento que consiste en aminoácidos en las posiciones 313 a 707 de SEQ ID NO: 6, o una variante del mismo; y
- c) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16 o una variante de la misma.

[0062] Si bien la proteína Hwp1 de longitud completa se puede usar para detectar anticuerpos anti-Hwp1, se ha informado que un fragmento N-terminal de 161 aminoácidos de largo (aminoácidos en las posiciones 41 a 200) aumentó la detección de anticuerpos por ELISA en suero de pacientes con candidiasis invasiva (Lain y col., 2007, BMC Microbiology, 7:35). Además, se demostró que un fragmento de Hwp1 que consiste en aminoácidos en las posiciones 27 a 103 de Hwp1 es un fragmento epitópico de Hwp1 (Fradin y col., 2008 Infect. Immun. 76, 4509-4517).

[0063] Por consiguiente, un polipéptido que puede usarse para detectar anticuerpos anti-Hwp1 puede seleccionarse en particular del grupo que consiste en un polipéptido que comprende o que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 8 o una variante o isoforma existente de forma natural de la misma;
- b) un fragmento epitópico de un polipéptido definido en a), en particular un fragmento que consiste en aminoácidos en las posiciones 41 a 200 o 27 a 203 de SEQ ID NO:8, o una variante del mismo.

[0064] Un polipéptido que puede usarse para detectar anticuerpos anti-Fba1 puede seleccionarse en particular del grupo que consiste en un polipéptido que comprende o que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 2 o una variante o isoforma existente de forma natural de la misma;
- b) un fragmento epitópico de un polipéptido definido en a), o una variante del mismo.

[0065] Un polipéptido que puede usarse para detectar anticuerpos anti-Eno1 puede seleccionarse en particular del grupo que consiste en un polipéptido que comprende o que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 4 o una variante o isoforma existente de forma natural de la misma;
- 5 b) un fragmento epitópico de un polipéptido definido en a), o una variante del mismo.

[0066] Para la detección de anticuerpos contra Mp65, también se puede usar la proteína Scw1, es decir, la proteína homóloga a Mp65 en *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de codificación Scw1 y la secuencia de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO:11 y 12, respectivamente. Por consiguiente, un polipéptido que puede
10 usarse para detectar anticuerpos anti-Mp65 puede seleccionarse en particular del grupo que consiste en un polipéptido que comprende o que consiste en:

- a) SEQ ID NO:10 o una variante o isoforma del mismo que existe naturalmente, en particular un polipéptido que comprende, o que consiste en SEQ ID NO:12;
- 15 b) un fragmento epitópico de un polipéptido definido en a), o una variante del mismo.

Diagnóstico de candidiasis invasiva

[0067] Según una realización, el diagnóstico de candidiasis invasiva se puede realizar comparando el nivel de dicho glicano de *Candida* con un nivel de referencia, y comparando el nivel de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65, con otro nivel de referencia. Si se detecta un nivel elevado de dicho glicano de *Candida* y/o un nivel elevado de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65, en relación con su nivel de referencia respectivo, entonces el sujeto está desarrollando o ha desarrollado candidiasis
25 invasiva. En esta realización, se realiza así una interpretación combinada de los ensayos separados.

[0068] Los niveles de referencia pueden determinarse como un valor único o un intervalo de valores que se determina en base al nivel de dicho glicano de *Candida* o el nivel de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida*, según corresponda, medido en una población de sujetos sanos, en una población de sujetos infectados
30 superficialmente con una cepa de *Candida* o en una población de sujetos que padecen candidiasis invasiva.

[0069] El nivel de referencia también puede determinarse analizando una muestra del mismo sujeto, por ejemplo, en un punto de tiempo anterior antes del inicio de la candidiasis invasiva o antes de la sospecha de candidiasis invasiva.
35

[0070] Típicamente, la población analizada podría dividirse en cuantiles en función del nivel medido de antígeno o anticuerpo. El nivel de referencia podría definirse como la mediana, o el segundo tercil, o el segundo o tercer cuartil, o el tercer o cuarto quintil, etc.

[0071] La comparación con un nivel de referencia también puede realizarse comparando el nivel de dicho glicano de *Candida* o el nivel de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida* con el nivel de glicano de *Candida* o anticuerpos, según corresponda, medidos en una muestra estándar constituida por un conjunto de sueros obtenido de pacientes con candidiasis invasiva.
40

[0072] El nivel de referencia para un marcador dado puede variar según el procedimiento utilizado para medir.
45

[0073] Según otra realización, se realiza un análisis combinado de los niveles de dicho glicano de *Candida* y de dichos anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida* con el fin de determinar si el sujeto tiene o no candidiasis invasiva. En esta realización, se realiza un análisis combinado de los biomarcadores.
50

[0074] Según esta realización, el nivel de un glicano de *Candida* y el nivel de un anticuerpo dirigido contra la proteína de *Candida* se detectan en una misma muestra de sangre, plasma o suero del paciente o en varias muestras de sangre, plasma o suero obtenidas secuencialmente del mismo paciente esencialmente al mismo tiempo.

[0075] En función del análisis de un conjunto de referencia de muestras de sangre, plasma o suero de sujetos con candidiasis invasiva y sujetos sin candidiasis invasiva, se puede generar una curva de características operativas relativas (ROC) para cada marcador analizado. Una curva ROC es una representación gráfica de la sensibilidad (o tasa positiva verdadera) contra la tasa de falsos positivos (es decir, [1 - especificidad], donde la especificidad es la tasa negativa verdadera) de una prueba basada en marcadores. Un espacio ROC se define por sensibilidad y (1-especificidad) como ejes x e y respectivamente. El mejor procedimiento de predicción posible produciría un punto en la esquina superior izquierda o coordenada (0,1) del espacio ROC, que representa el 100 % de sensibilidad (sin falsos negativos) y el 100 % de especificidad (sin falsos positivos). Una suposición completamente aleatoria daría un punto a lo largo de una línea diagonal (la llamada línea de no discriminación) desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina superior derecha. La diagonal divide el espacio ROC. Los puntos por encima de la diagonal representan
60 buenos resultados de clasificación (mejor que al azar), los puntos debajo de la línea son malos resultados (peor que
65

al azar). Se puede calcular el área bajo la curva (AUC) de una curva ROC. Cuanto mayor sea el AUC, mayor será la precisión diagnóstica del marcador de diagnóstico.

[0076] Para el análisis combinado de marcadores, como el nivel de dicho glicano de *Candida* y el nivel de dichos anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida*, se puede calcular un nuevo marcador virtual Z basado en una combinación lineal de los niveles de los marcadores individuales, es decir, el nivel de dicho glicano de *Candida* y el nivel de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida*. Z se calcula de la siguiente manera: $Z = \sum a_i \times [\text{Marcador}_i]$ donde a_i son coeficientes calculados y $[\text{Marcador}_i]$ son niveles individuales de marcador (opcionalmente en unidades normalizadas). Los valores de los coeficientes a_i se determinan para maximizar el área bajo la curva (AUC) de la curva ROC para la combinación de marcadores seleccionada.

[0077] La determinación de los valores de los coeficientes se puede lograr fácilmente utilizando, por ejemplo, el programa mROC o cualquier otro programa que implemente un algoritmo para maximizar el AUC de ROC que puede usarse para ROC multivariante (Wang, Computational Statistics and Data Analysis 2007;51:2803-2812; Xiong y col. Med Decis Making. 2004 nov- Dec;24(6):659-69; Ma and Huang, Bioinformatics. 2005 Dec 15;21 (24):4356-62; Pepe y col., Biometrics. 2006 Mar;62(1):221-9; Wang y col.; Wang y col., J Proteomics Bioinform. 2012, 5:3; Liu A y col., Stat Med. 2005 Jan 15;24 (1):37-47. PubMed PMID: 15515132).

[0078] En la Tabla 1 se muestran ejemplos de valores para a_i para combinaciones de dos marcadores, en función de la combinación de marcadores, y basados en el análisis de las muestras de suero obtenidas de los pacientes identificados en las Tablas 3 y 4 de la solicitud instantánea. Estos valores de a_i fueron los utilizados para generar las curvas ROC que se muestran en las Figuras 6-10.

Tabla 1. Ejemplos de coeficientes a_1 y a_2 que maximizan el AUC de la curva ROC para la combinación de dos marcadores

Combinación de marcadores	$Z = a_1 \times \text{Marcador}_1 + a_2 \times \text{Marcador}_2$
Ag_Manano + Ab_Fba1	$Z = 0,499 \times [\text{Ag_Manano}^*] + 2,324 \times [\text{Ab_Fba1}^*]$
Ag_Manano + Ab_Hwp1	$Z = 0,481 \times [\text{Ag_Manano}^*] + 2,416 \times [\text{Ab_Hwp1}^*]$
Ag_Manano + Ab_Hsp90	$Z = 0,481 \times [\text{Ag_Manano}^*] + 2,416 \times [\text{Ab_Hsp90}^*]$
Ag_Manano + Ab_Eno1	$Z = 0,453 \times [\text{Ag_Manano}^*] + 1,916 \times [\text{Ab_Eno1}^*]$
Ag_Manano + Ab_Mp65	$Z = 0,486 \times [\text{Ag_Manano}^*] + 2,261 \times [\text{Ab_Mp65}^*]$
Ag_Manano + Ab_Manano	$Z = 0,599 \times [\text{Ag_Manano}^*] + 0,357 \times [\text{Ab_Manano}^*]$
*: niveles de marcadores normalizados por una transformación de log10.	

[0079] Los valores anteriores de los coeficientes a_1 y a_2 para las combinaciones de dos marcadores que figuran en la Tabla 1 son puramente indicativos, ya que estos valores pueden modificarse con la estandarización de los procedimientos. Además, los coeficientes a_1 y a_2 pueden depender de las unidades de medida utilizadas para el antígeno manano y los anticuerpos contra la proteína de *Candida*.

[0080] Una vez que se han determinado los valores de los coeficientes a_i para una combinación de marcadores dada, mediante la estandarización de las muestras de sujeto y control, se puede determinar un nivel de referencia del marcador virtual Z como un valor único o un intervalo de valores, por ejemplo, como cuantiles.

[0081] Cuando el nivel de un glicano de *Candida* y el nivel de un anticuerpo dirigido contra la proteína de *Candida* se han medido en una muestra, o en al menos dos muestras obtenidas al mismo tiempo del mismo sujeto, puede ser un valor del marcador virtual Z calculado para la muestra de prueba. Si el valor calculado para el marcador virtual Z es mayor que el nivel de referencia del marcador virtual Z, entonces el sujeto está desarrollando o ha desarrollado candidiasis invasiva.

[0082] Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas que consisten en:

- a) detectar el nivel de un glicano de *Candida* que es un manano en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto;
- b) detectar el nivel de anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en fructosa bífosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1) y manoproteína 65 (Mp65) en la misma muestra de sangre, plasma o suero del sujeto o en otra muestra de sangre, plasma o suero obtenida secuencialmente del mismo paciente, esencialmente simultáneamente o con una separación de no más de 3 horas; y
- c) donde se realiza un análisis combinado del nivel de dicho glicano de *Candida* y el nivel de anticuerpo dirigido

contra dicha proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65, calculando el nivel de un marcador virtual $Z = \sum a_i \times [\text{Marcador}_i]$, donde $[\text{Marcador}_i]$ son niveles individuales de marcador de glicano de *Candida* y de anticuerpo dirigido contra dicha proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65, y a_i son coeficientes cuyos valores se determinan para maximizar el área bajo la curva (AUC) de la curva de característica operativa relativa (ROC) para la combinación de Marcador_i; y

d) donde si el nivel del marcador virtual Z calculado en la etapa c) es más alto que un nivel de referencia del marcador virtual Z, entonces el sujeto está desarrollando o ha desarrollado candidiasis invasiva.

10 *Procedimiento para determinar un régimen de tratamiento adecuado*

[0083] Las altas tasas de mortalidad asociadas con la candidiasis invasiva (CI) se deben principalmente a la demora en identificar que un sujeto está afectado con CI e iniciar el tratamiento antifúngico apropiado.

15 **[0084]** La invención se refiere además a un procedimiento para determinar un régimen de tratamiento en un sujeto, dicho procedimiento comprende:

- a) diagnosticar si el sujeto tiene candidiasis invasiva llevando a cabo el procedimiento de la invención, y
- b) si el sujeto es diagnosticado con candidiasis invasiva, determinar un tratamiento antifúngico para dicho sujeto.

20 **[0085]** El sujeto puede ser un sujeto sospechoso de tener candidiasis invasiva o en riesgo de candidiasis invasiva. El sujeto puede ser en particular un sujeto que tiene infección superficial de piel y/o membranas mucosas. El sujeto también puede ser, por ejemplo, un sujeto inmunodeprimido que lleva un catéter intravenoso.

25 **[0086]** Un tratamiento antifúngico puede ser, por ejemplo, el tratamiento con equinocandinas que incluyen en particular caspofungina (1-[(4R, 5S)-5[(2-aminoetil)amino]-N2-(10,12-dimetil-1-oxotetradecil)-4-hidroxi-L-ornitina]-5-[(3R)-3-hidroxi-L-ornitina]neumocandina B₀), micafungina y/o anidulafungina (véase, por ejemplo, Patterson TF. Curr Infect Dis Rep 2006; 8:442-8). Las equinocandinas son lipopéptidos modificados sintéticamente que inhiben la síntesis de (1,3)-β-D-glucano. Otro tratamiento antifúngico puede ser, por ejemplo, el tratamiento con enfumafungina y

30 derivados de la enfumafungina como se describe en la solicitud de patente publicada como US 20110224228. También pueden usarse la anfotericina B y sus formulaciones lipídicas, o derivados de azol antifúngicos como fluconazol, itraconazol y voriconazol (ver, por ejemplo, Pfaller y col. J Clin Microbiol 2006;44:819-26; Mean y col. Crit Care 2008;12:204).

35 **[0087]** Es posible la administración combinada de estos compuestos o la combinación con otros principios activos.

[0088] El tratamiento se administra preferentemente siempre que pueda detectarse manano circulante en el suero del sujeto.

40 *Kit para diagnosticar candidiasis invasiva*

[0089] La descripción se refiere además a un kit que comprende, o que consiste en:

- 45 a) medios para determinar la presencia o el nivel de un glicano de *Candida* que es manano; y
- b) medios para determinar la presencia o el nivel de anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1) y manoproteína 65 (Mp65).

50 **[0090]** Los medios para determinar la presencia o el nivel de un glicano de *Candida* pueden ser en particular medios para determinar la presencia o el nivel de manano de *Candida*, (1,3)-β-D-glucano o quitina. Tales medios pueden ser en particular anticuerpos tales como los descritos anteriormente (por ejemplo, EBCA1 para manano). Tales medios también pueden comprender un sustrato cromogénico y enzima(s) como las disponibles en la prueba de Fungitell (Associates of Cape Cod, MA, EE. UU.).

55 **[0091]** Los medios para determinar la presencia o el nivel de anticuerpo dirigido contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, hwp1 o Mp65 pueden comprender proteína de *Candida* purificada, o fragmentos epitópicos de la misma, o un polipéptido que comprende proteínas de longitud completa, fragmentos epitópicos o variantes de los mismos que se han producido recombinantemente o sintetizado químicamente, como se describe anteriormente.

60

[0092] La invención se ilustrará adicionalmente a la vista de las siguientes figuras y ejemplos.

FIGURAS

65

[0093]

Figuras 1-5. Representación de diagrama de caja del potencial de diagnóstico del anticuerpo antiproteína recombinante [RP-Ab; anti-Fba1 Ab respectivamente (figura 1); anti-Hwp1 Ab (Figura 2); anti-Hsp90 Ab (Figura 3); anti-Eno1 Ab (Figura 4); anti-Mp65 Ab (Figura 5)] o anticuerpos antimananos asociados con mananemia. La representación de diagrama de caja es una forma conveniente de representar gráficamente grupos de datos numéricos a través de sus resúmenes de cinco números (la observación más pequeña, el cuartil inferior (Q1), la mediana (Q2), el cuartil superior (Q3) y la observación más grande). Los diagramas de caja pueden ser útiles para mostrar diferencias entre poblaciones sin hacer ninguna suposición de la distribución estadística subyacente. CTRL representa controles y CI representa pacientes con candidiasis invasiva.

Figuras 6-10. Curvas ROC de combinaciones de RP-Ab [anti-Fba1 Ab respectivamente (figura 6); anti-Hwp1 Ab (Figura 7); anti-Hsp90 Ab (Figura 8); anti-Eno1 Ab (Figura 9); anti-Mp65 Ab (Figura 10) con mananemia. La prueba de diagnóstico real (anticuerpo manano y antígeno manano) se representó con líneas de puntos y la asociación de RP-Ab y la mananemia se representó con una línea negra.

15 EJEMPLOS**Ejemplo 1: Producción de proteína recombinante en *E. coli*****1) Cepas y plásmidos**

[0094] Se usó *Candida albicans* SC5314 como fuente de ADN fúngico para generar las distintas proteínas recombinantes. La cepa DE3 de *Escherichia coli* se transformó para producir las proteínas recombinantes mientras que la cepa DH5α se usó para amplificar los plásmidos.

[0095] Los distintos genes que codifican proteínas recombinantes se clonaron en el plásmido pEXP5-NT/TOPO (Invitrogen) que permite la expresión de proteínas recombinantes con un indicador de polihistidina N-terminal (6xHis) en *E. coli*.

2) Clonación

[0096] Se expresaron seis proteínas recombinantes en *E. coli* como se describió anteriormente (Fradin y col., Infect Immun (2008), 76: 4509-4517): fragmento N-terminal de Hwp1 (aminoácidos 27 a 203), Eno1 (longitud completa), Mp65 sin su señal peptídica (aminoácidos 1 a 22), Fba1 (longitud total), Sod5 sin su señal peptídica (aminoácidos 1 a 22) y su secuencia consenso C-terminal GPI (últimos 24 aminoácidos terminales) y Hsp90 (longitud completa).

[0097] Se diseñaron seis conjuntos de cebadores (Tabla 2 a continuación) para clonar los distintos genes o genes truncados. Los fragmentos amplificados por PCR con polimerasa Expand Taq de alta fidelidad (Roche) se clonaron directamente en el plásmido pEXP5-NT/TOPO.

Tabla 2. Conjunto de cebadores usados para la clonación de genes

Proteínas recombinantes	Conjunto de cebadores
N-term Hwp1	5'CAAGGTGAAACAGAGGAAGCT3' (SEQ ID NO :17) y 5'TCAAGCAGGAATGTTTGGAGTAGT3' (SEQ ID NO :18)
Eno1	5'ATGTCTTACGCCACTAAAATCCACGC3' (SEQ ID NO :19) y 5'TTACAATTGAGAAGCCTTTTGAAATCTTTAC3' (SEQ ID NO :20)
Mp65	5'GCTCATCAACATCATCAACAT3' (SEQ ID NO :21) y 5'TTAGTTAGAGTAAATACCCAGTA3' (SEQ ID NO :22)
Fba1	5'ATGGCTCCTCCAGCAGTTTAA3' (SEQ ID NO :23) y 5'TTACAATTGTCCTTTGGTGTG3' (SEQ ID NO :24)
Sod5	5'GATGCACCAATCTCAACTGAC3' (SEQ ID NO :25) y 3'TTAACCTTGAGGAGCAGTAGAAGC3' (SEQ ID NO :26)
Hsp90	5'ATGGCTGACGCAAAAGTTGAA3' (SEQ ID NO :27) y 5'TTAATCAACTTCTTCCATAGC3' (SEQ ID NO :28)

3) Transformación y producción de proteínas recombinantes

[0098] La cepa DE3 se transformó con los distintos vectores y se hizo crecer durante la noche en medio LB

que contenía ampicilina (100 µg.ml⁻¹; Sigma) a 37 °C con agitación continua a 200 rpm. Los cultivos se usaron como inóculos para medios LB frescos que contenían ampicilina y se incubaron hasta que la densidad óptica a 600 nm fue de 0,8 antes de 4 h de inducción de fragmentos recombinantes con isopropil-β-D-tiogalactósido 0,5 mM (Sigma). Las células se cosecharon, se suspendieron en fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0, con cloruro de sodio 0,3 M, imidazol 10 mM e inhibidores de proteasa (conjunto de cóctel inhibidor de proteasa IV; Calbiochem) y se sonicaron a 4 °C por pulsos de 20 segundos. Los sobrenadantes que contenían proteínas marcadas con 6xHis recombinantes se recuperaron por centrifugación a 4 °C durante 15 minutos a 10.000 g y se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm (Millipore). Los fragmentos recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad de níquelquelato según las instrucciones del fabricante (Sigma). Las fracciones que contenían los polipéptidos purificados se agruparon, se dializaron contra PBS y se almacenaron a -20 °C.

Ejemplo 2: Evaluación del potencial diagnóstico de anticuerpos antiproteína recombinante o anticuerpos antimanano asociados con mananemia

1) Materiales y procedimientos

Pacientes

[0099] Entre enero de 2005 y diciembre de 2007, se recogieron retrospectivamente 157 muestras de suero en distintos departamentos clínicos del Hospital Universitario de Lille (LUH), de 53 pacientes (24 mujeres y 29 hombres [edad media, 56,78 +/- 23,71 años]) con candidiasis por *Candida albicans* comprobada. El número promedio de muestras por paciente en este grupo fue 2,68 +/- 2,13 (Tabla 3).

Tabla 3. Características clínicas de pacientes con infección sistémica por *Candida albicans*. Los pacientes fueron clasificados según las unidades clínicas

Paciente	Sexo	Edad (años)	Unidad del hospital	N.º de suero	Fecha de recogida de la muestra de suero en relación con el cultivo sanguíneo (días)	Especies de <i>Candida</i>
1	F	34	Unidad de quemados	7	-10, -3, 0, 4, 13, 18, 22	<i>Candida albicans</i>
2	M	43	Unidad de quemados	4	-16, -9, 12, 27	<i>Candida albicans</i>
3	M	54	Unidad de quemados	3	-6, -4, 10	<i>Candida albicans</i>
4	F	54	Unidad de quemados	4	-10, -3, 4, 11	<i>Candida albicans</i>
5	F	59	Unidad de quemados	1	17	<i>Candida albicans</i>
6	M	68	Unidad de quemados	4	-10, -3, 4, 18	<i>Candida albicans</i>
7	F	75	Unidad de quemados	2	7, 14	<i>Candida albicans</i>
8	M	81	Cardiología	1	6	<i>Candida albicans</i>
9	F	31	Gastroenterología	1	0	<i>Candida albicans</i>
10	M	53	Gastroenterología	1	2	<i>Candida albicans</i>
11	M	59	Gastroenterología	3	-6, -2, 6	<i>Candida albicans</i>
12	M	78	Cirugía cardíaca	1	1	<i>Candida albicans</i>
13	F	46	Hematología clínica	8	-8, -5, 1, 5, 5, 16, 22, 27	<i>Candida albicans</i>
14	F	62	Hematología clínica	7	-3, 4, 12, 14, 20, 27, 29	<i>Candida albicans</i>
15	M	70	Hematología clínica	6	3, 10, 13, 17, 19, 24	<i>Candida albicans</i>

(continúa)

Paciente	Sexo	Edad (años)	Unidad del hospital	N.º de suero	Fecha de recogida de la muestra de suero en relación con el cultivo sanguíneo (días)	Especies de <i>Candida</i>
16	F	86	Enfermedades infecciosas	3	1, 7, 14	<i>Candida albicans</i>
17	M	10	Unidad de cuidados intensivos	2	3, 23	<i>Candida albicans</i>
18	F	14	Unidad de cuidados intensivos	1	4	<i>Candida albicans</i>
19	M	32	Unidad de cuidados intensivos	2	14, 30	<i>Candida albicans</i>
20	M	35	Unidad de cuidados intensivos	1	-1	<i>Candida albicans</i>
21	F	36	Unidad de cuidados intensivos	2	3, 10	<i>Candida albicans</i>
22	M	46	Unidad de cuidados intensivos	2	-2,5	<i>Candida albicans</i>
23	M	47	Unidad de cuidados intensivos	6	-3, 4, 13, 20, 27, 28	<i>Candida albicans</i>
24	M	49	Unidad de cuidados intensivos	2	-6, -2	<i>Candida albicans</i>
25	F	50	Unidad de cuidados intensivos	1	0	<i>Candida albicans</i>
26	M	57	Unidad de cuidados intensivos	6	-8, -2, 5, 12, 20, 27	<i>Candida albicans</i>
27	F	59	Unidad de cuidados intensivos	2	3, 4	<i>Candida albicans</i>
28	M	60	Unidad de cuidados intensivos	5	-10, -3, 4, 11, 25	<i>Candida albicans</i>
29	F	62	Unidad de cuidados intensivos	4	-12, -5, 2, 9	<i>Candida albicans</i>
30	M	64	Unidad de cuidados intensivos	2	2, 9	<i>Candida albicans</i>
31	M	66	Unidad de cuidados intensivos	5	2, 6, 8, 12, 13	<i>Candida albicans</i>
32	M	72	Unidad de cuidados intensivos	4	-5,2,6,9	<i>Candida albicans</i>
33	F	75	Unidad de cuidados intensivos	1	3	<i>Candida albicans</i>
34	F	76	Unidad de cuidados intensivos	9	4, 7, 11, 14, 17, 22, 25, 27, 28	<i>Candida albicans</i>
35	F	79	Unidad de cuidados intensivos	9	-1, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 20, 27	<i>Candida albicans</i>
36	F	82	Unidad de cuidados intensivos	1	5	<i>Candida albicans</i>
37	F	87	Unidad de cuidados intensivos	4	2, 7, 22, 29	<i>Candida albicans</i>
38	M	89	Unidad de cuidados intensivos	2	-7, -1	<i>Candida albicans</i>
39	M	48	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	1	2	<i>Candida albicans</i>
40	M	72	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	1	0	<i>Candida albicans</i>

(continúa)

Paciente	Sexo	Edad (años)	Unidad del hospital	N.º de suero	Fecha de recogida de la muestra de suero en relación con el cultivo sanguíneo (días)	Especies de <i>Candida</i>
41	M	72	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	3	-3, 4, 16	<i>Candida albicans</i>
42	F	73	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	2	-5, 25	<i>Candida albicans</i>
43	M	73	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	1	11	<i>Candida albicans</i>
44	M	78	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	1	2	<i>Candida albicans</i>
45	F	83	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	2	-9, 19	<i>Candida albicans</i>
46	M	15	Oncología	2	-5, 1	<i>Candida albicans</i>
47	M	6	Pediatría	6	15, 17, 18, 19, 24, 26	<i>Candida albicans</i>
48	F	14	Pediatría	1	-1	<i>Candida albicans</i>
49	F	17	Pediatría	3	-15, -8, 6	<i>Candida albicans</i>
50	M	53	Neumología	2	-11, -10	<i>Candida albicans</i>
51	F	80	Neumología	1	4	<i>Candida albicans</i>
52	M	64	Trasplantes	1	-1	<i>Candida albicans</i>
53	F	49	Traumatología	1	0	<i>Candida albicans</i>

^a M, masculino; F, femenino

[0100] También se recolectó un segundo grupo de 142 muestras de suero en distintas unidades del LUH de 40 pacientes (10 mujeres y 30 hombres [edad media, 58,00 +/- 21,97]) con candidiasis invasiva comprobada determinada por especies de levadura no *albicans* (Tabla 4). El número promedio de muestras por paciente en este grupo fue 3,59 +/- 2,66. Este grupo contiene 7 especies distintas de hongo levaduriforme: *Candida parapsilosis* (17 pacientes; 49 sueros), *Candida krusei* (3 pacientes; 10 sueros), *Candida tropicalis* (5 pacientes; 20 sueros), *Candida glabrata* (12 pacientes; 40 sueros), *Geotrichum capitatum* (1 paciente; 12 sueros), *Candida norvegiensis* (1 paciente; 3 sueros) y *Candida lusitanae* (1 paciente; 8 sueros).

Tabla 4. Características clínicas de pacientes con infección sistémica por *Candida*. Los pacientes se clasificaron según las especies de levadura involucradas en la CI y según las unidades clínicas.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Unidad del hospital	N.º de suero	Fecha de recogida de la muestra de suero en relación con el cultivo sanguíneo (días)	Especies de <i>Candida</i>
54	M	21	Unidad de quemados	2	-1, 12	<i>Candida parapsilosis</i>
55	M	43	Unidad de quemados	4	-6,0,7,21	<i>Candida parapsilosis</i>
56	F	82	Hematología clínica	2	2,7	<i>Candida parapsilosis</i>
57	M	24	Unidad de cuidados intensivos	4	-11, -6, 0, 1	<i>Candida parapsilosis</i>
58	M	51	Unidad de cuidados intensivos	1	25	<i>Candida parapsilosis</i>

(continúa)

Paciente	Sexo	Edad (años)	Unidad del hospital	N.º de suero	Fecha de recogida de la muestra de suero en relación con el cultivo sanguíneo (días)	Especies de <i>Candida</i>
59	M	54	Unidad de cuidados intensivos	5	-10, -3, 4, 10, 18	<i>Candida parapsilosis</i>
60	M	65	Unidad de cuidados intensivos	1	-11	<i>Candida parapsilosis</i>
61	M	67	Unidad de cuidados intensivos	4	-11, -4, 3, 17	<i>Candida parapsilosis</i>
62	F	75	Unidad de cuidados intensivos	1	23	<i>Candida parapsilosis</i>
63	M	76	Unidad de cuidados intensivos	5	-15, -12, 2, 6, 9	<i>Candida parapsilosis</i>
64	M	78	Unidad de cuidados intensivos	3	-8, -3, 4	<i>Candida parapsilosis</i>
65	M	87	Unidad de cuidados intensivos	7	-14, -7, 0, 7, 14, 21, 22	<i>Candida parapsilosis</i>
66	F	87	Unidad de cuidados intensivos	2	-5, 8	<i>Candida parapsilosis</i>
67	M	65	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	2	0, 1	<i>Candida parapsilosis</i>
68	M	57	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	4	-5, 1, 9, 23	<i>Candida parapsilosis</i>
69	M	90	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	1	3	<i>Candida parapsilosis</i>
70	F	10	Pediatría	1	3	<i>Candida parapsilosis</i>
71	M	47	Hematología clínica	3	-11, -4, 3	<i>Candida krusei</i>
72	M	68	Hematología clínica	6	-9, -7, -1, 4, 12, 19	<i>Candida krusei</i>
73	M	75	Oncología	1	4	<i>Candida krusei</i>
74	M	39	Unidad de quemados	5	-15, -8, 10, 13, 28	<i>Candida tropicalis</i>
75	M	51	Hematología clínica	1	3	<i>Candida tropicalis</i>
76	F	62	Hematología clínica	10	-15, -6, -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 12	<i>Candida tropicalis</i>
77	M	8	Unidad de cuidados intensivos	3	1, 8, 18	<i>Candida tropicalis</i>
78	M	67	Oncología	1	-5	<i>Candida tropicalis</i>
79	M	24	Medicina hiperbárica	2	-2, 5	<i>Candida glabrata</i>
80	M	31	Unidad de cuidados intensivos	1	3	<i>Candida glabrata</i>
81	M	57	Unidad de cuidados intensivos	5	0, 6, 13, 20, 27	<i>Candida glabrata</i>
82	M	63	Unidad de cuidados intensivos	4	-10, 2, 10, 11	<i>Candida glabrata</i>
83	M	63	Unidad de cuidados intensivos	8	-5, -4, -1, 0, 1, 3, 7, 12	<i>Candida glabrata</i>

(continúa)

Paciente	Sexo	Edad (años)	Unidad del hospital	N.º de suero	Fecha de recogida de la muestra de suero en relación con el cultivo sanguíneo (días)	Especies de <i>Candida</i>
84	F	69	Unidad de cuidados intensivos	1	14	<i>Candida glabrata</i>
85	F	76	Unidad de cuidados intensivos	5	-9, -5, 2, 9, 16	<i>Candida glabrata</i>
86	F	87	Unidad de cuidados intensivos	3	-7, 7, 12	<i>Candida glabrata</i>
87	F	24	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	5	-11, -7, -5, 0, 10	<i>Candida glabrata</i>
88	M	71	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	2	1, 15	<i>Candida glabrata</i>
89	M	85	Unidad de cuidados quirúrgicos intensivos	3	2, 4, 11	<i>Candida glabrata</i>
90	F	60	Oncología	1	8	<i>Candida glabrata</i>
91	M	64	Hematología clínica	12	-15, -11, -9, -6, -3, -1, 1, 4, 6, 11, 13, 15	<i>Geotrichum capitatum</i>
92	M	45	Hematología clínica	3	1, 7, 12	<i>Candida norvegensis</i>
93	M	76	Hematología clínica	8	-10, -3, -1, 1, 4, 6, 8, 11	<i>Candida lusitanae</i>

^a M, masculino; F, femenino

[0101] Los siguientes criterios se aplicaron como reglas de selección retrospectivas cuando se examinaron los archivos clínicos y de laboratorio: (i) hemocultivo positivo de especies de *Candida*; (ii) disponibilidad de muestras de suero obtenidas dentro de un intervalo de 3 semanas antes y 1 mes después de cultivos positivos, (iii) la presencia de factores de riesgo (cáncer y quimioterapia, cirugía abdominal, SIDA, problemas de salud importantes que requieren hospitalización en unidades de cuidados intensivos [UCI]) y uso de antibióticos de amplio espectro, catéteres intravasculares permanentes e hiperalimentación; y (iv) la presencia de un síndrome infeccioso (a saber, fiebre) que no respondió a la terapia antibacteriana pero sí a la terapia antimicótica. Con el fin de evaluar el rendimiento de los biomarcadores para el diagnóstico precoz de CI, la selección de muestras de suero se restringió al período de 2 semanas antes a 1 mes después de la fecha de aislamiento de las especies de levaduras del cultivo de sangre. Después de la recogida de muestras de sangre, se centrifugaron las muestras de sangre y se almacenaron alícuotas de suero a -80 °C hasta que su uso.

Grupo de control.

[0102] Se incluyeron dos grupos de sueros de control en este estudio:

(i) El Grupo 1 comprendía 90 muestras de suero de 90 pacientes hospitalizados (32 mujeres y 58 hombres; edad media, 64 +/- 15,5 años) sin evidencia de candidiasis invasiva. Este grupo de pacientes se inscribió en un estudio prospectivo realizado en una UCI del LUH durante 6 meses. El estudio fue diseñado para la evaluación de los factores de riesgo para la candidiasis nosocomial. Estos pacientes se sometieron a una encuesta clínica y micológica durante períodos de 1 a 74 días (media, 12 días). Las muestras de sangre, hisopos orales, orina y heces se recolectaron quincenalmente. Entre los 90 pacientes, 71 fueron colonizados por especies de levadura con evaluación del número de sitios colonizados del cuerpo: 1 sitio (16,9 %), 2 sitios (26,8 %), 3 sitios (26,8 %), 4 sitios (25,3 %) y 5 sitios (4,2 %).

(ii) El grupo 2 consistió en 80 muestras de suero de donantes de sangre sanos.

Detección de EIA de anticuerpos antimanano de C. Albicans en sueros humanos.

[0103] Los anticuerpos contra manano de *Candida albicans* se detectaron usando la prueba de anticuerpos Platelia *Candida* (Ab) Plus (BioRad Laboratories, Marnes La-Coquette, Francia) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, el inmunoensayo enzimático (EIA) se realizó con el automatismo BEP III (Behring Laboratories, París, Francia). Para sueros individuales, se aplicaron 100 µl de suero diluido 1/400 a cada pocillo y la placa se incubó durante 1 h 37 °C. Después del lavado, se añadieron 100 µl de inmunoglobulinas antihumanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante y las placas se incubaron durante 1 h 37 °C. Después del lavado intensivo, la reacción

se reveló por 30 minutos de incubación en la oscuridad con 200 µl de disolución de tetrametilbencidina. Se midió la absorbancia a una λ de 450/620 nm. Los resultados se informaron en unidades arbitrarias (AU) en relación con los resultados en la curva estándar.

5 Detección de mananemia.

[0104] El manano circulante se detectó usando la prueba de antígeno Plus (Ag) Platelia *Candida* (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, Francia) como se describió anteriormente (Sendid y col., J Med Microbiol. 2002 May;51(5):433-42). Brevemente, las placas de microtitulación se sensibilizaron en un entorno industrial con anticuerpo monoclonal (anticuerpo monoclonal EBCA1 de la prueba de antígeno Plus (Ag) de Platelia *Candida*). Se desnaturalizaron 300 µl de suero del paciente con 100 µl de disolución de tratamiento con EDTA y la mezcla se hirvió durante 3 minutos y se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos. 50 µl de sobrenadante, obtenido del suero del paciente y tratado como se describió anteriormente, se mezcló en una placa con 50 µl de EBCA1 conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de la incubación durante 90 minutos a 37 °C, las placas se lavaron intensamente y la reacción se reveló por 30 minutos de incubación en la oscuridad con 200 µl de disolución de tetrametilbencidina. La densidad óptica se leyó a una λ de 450/620 nm en un lector PR2100 (Sanofi Pasteur Diagnostics). Las reacciones se realizaron por duplicado. Cada experimento incluyó una curva de calibración para un grupo de sueros humanos normales suplementados con concentraciones de manano de 0,1 a 27 ng/ml.

20 Detección por EIA de anticuerpos antiproteínas recombinantes de *C. albicans* en sueros humanos

[0105] Las proteínas recombinantes se revistieron en placas ELISA (NUNC IMMUNO-MODULE 468680) a una concentración de 2 µg/ml para Mp65 y Eno1 y a una concentración de 4 µg/ml para Fba1, Hwp1 y Hsp90 producidas en *Escherichia coli*, con disolución de carbonato pH 9,5 +/- 0,2 filtrado 0,22 µm para todos los antígenos. Estas preparaciones se incubaron a temperatura ambiente durante la noche.

[0106] Después del recubrimiento, los pocillos se bloquearon con 100 µl de disolución de albúmina de suero bovino/sacarosa, pH 7,2 +/- 0,2, se filtraron 0,22 µm, se vaciaron y se llenaron con 200 µl de la misma disolución. Las placas se congelaron a continuación a -20 °C. Los protocolos para el recubrimiento de antígenos, la preparación de disoluciones diluyentes, la dilución de sueros de pacientes y las soluciones conjugadas se basaron en experimentos preliminares realizados con un grupo de sueros de pacientes con CI que se sabe que muestran títulos altos de anticuerpos anti-*Candida*.

[0107] Los sueros de los pacientes se diluyeron 1/100 en tampón salino Tris y BSA pH 7,6 y se incubaron durante 1 h a 37 °C en una placa recubierta en una incubadora seca, se lavaron 3 veces con 800 µl de tampón salino Tris y Tween 20 (0,1 %) y proclina (0,07 %), se incubaron 1 h a 37 °C con un anticuerpo antiinmunoglobulina total secundario conjugado con peroxidasa (Bio-Rad, Marnes La Coquette, Francia), se lavaron 3 veces como se describió previamente y se incubaron 30 minutos con 200 µl de tetrametilbencidina (TMB) y se almacenaron a temperatura ambiente sin luz. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de disolución de parada que contenía H₂SO₄ 2 M y las absorbancias se midieron a 450/620 nm. Paralelamente, todos los sueros se probaron al mismo tiempo con las pruebas de EIA caseras con proteínas recombinantes, la Platelia™ *Candida* Ab Plus y la Platelia™ *Candida* Ag.

Análisis estadístico

[0108] El análisis estadístico se realizó en colaboración con SysDIAG: Systemes Complexes pour le Diagnostic (UMR3145 CNRS/Bio-Rad, Montpellier, France). Todas las estadísticas y cifras se calcularon con el software de código abierto estadístico «R/Bioconductor» (Ge y col. Test 2003; 12:1-77; Gentleman y col. Genome Biol 2004;5: R80) o software SAS v9.2 (SAS institute Inc). Se realizó un análisis diferencial con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon no paramétrica y la prueba de Welch. Con las múltiples metodologías de prueba, es importante ajustar el valor p de cada marcador para controlar la tasa de descubrimiento falso (FDR). El procedimiento de Benjamini y Hochberg (BH) (Benjamini y col. Behav Brain Res 2001; 125:279-84) se aplicó en todas las pruebas estadísticas con el «paquete de pruebas múltiples» y un valor p ajustado por debajo de 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Se aplicó una transformación logarítmica (log₁₀) en los niveles de expresión de biomarcadores para garantizar la normalidad de los datos. Todas las distribuciones de datos se ilustran como medianas y diagramas de caja para cada biomarcador. Se aplicó una correlación de prueba de Pearson para identificar la correlación de biomarcadores para todos los grupos de pacientes.

[0109] El rendimiento diagnóstico del marcador podría caracterizarse por la sensibilidad, que representa su capacidad de detectar la población de CI y la especificidad que representa su capacidad de detectar la población de control.

[0110] Los resultados de la evaluación de una prueba de diagnóstico se pueden resumir en una tabla de contingencia 2x2 que compara estas dos poblaciones bien definidas. Al fijar un límite, las dos poblaciones podrían clasificarse en categorías según los resultados de la prueba, clasificadas como positivas o negativas. Dado un marcador particular, podemos identificar un número de sujetos con un resultado positivo de la prueba entre la población

de «casos» (el «Verdadero positivo»: TP) y sujetos *b* con un resultado de prueba positivo entre la población de «controles» (el «Verdadero negativo»: TN). Del mismo modo, se observan sujetos *c* con un resultado negativo en la prueba entre los casos (el «Falso positivo»: FP) y sujetos *d* con un resultado de prueba negativo entre los controles (el «Falso negativo»: FN). La sensibilidad se define como $TP/(TP+FN)$; denominada en lo sucesivo «tasa positiva verdadera». La especificidad se define como $TN/(TN+FP)$; denominada en lo sucesivo «tasa negativa verdadera».

[0111] La precisión de cada marcador y su poder discriminatorio se evaluaron mediante un análisis de las características operativas de recepción (ROC). Las curvas ROC son la visualización gráfica de la relación recíproca entre la sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp) de una prueba para varios valores.

[0112] Además, todos los marcadores se combinaron con el antígeno manano (Ag) para evaluar el aumento potencial de sensibilidad y especificidad utilizando varias estrategias como programa mROC (Kramar y col. Computer Methods and Programs in Biomedicine 2001;66:199-207), regresión logística (Kleinbaum, D.G., Kupper, L.L., Muller, K.E. (1988) Applied Regression Analysis and other Multivariate Methods. Duxbury Press, Belmont, California) y con dos algoritmos de aprendizaje supervisado, CART (Breiman L. Classification and regression trees. Wadsworth International Group, 1984.) and wKNN (Hechenbichler K, Schliep K. Weighted k-Nearest-Neighbor Techniques and Ordinal Classification. Volume 399, 2004).

[0113] mROC es un programa desarrollado por Kramar y col. (Comput Methods Programs Biomed, 2001;66:199-207) que se dedica a identificar la combinación lineal que maximiza el AUC (Área bajo la curva) de las curvas ROC. El uso de este programa se describió, por ejemplo, en Staack y col. BMC Urol 2006;6:19. Este programa implementa un algoritmo para maximizar la estimación de correlación de rango, que también es una estimación del área bajo la curva ROC (Su and Liu. Journal of the American Statistical Association 1993; 88:1350-1355; Wang, Computational Statistics and Data Analysis 2007;51:2803-2812). Se proporciona la ecuación para la combinación respectiva y se puede usar como un nuevo marcador virtual Z de la manera siguiente:

$$Z = a \times \text{Marker}_1 + b \times \text{Marker}_2 + c \times \text{Marker}_3,$$

donde a, b, c son coeficientes calculados y Marcador_{1 2 3} son niveles individuales de marcadores.

[0114] También se aplicó un modelo de regresión logística para el análisis univariado y multivariado para estimar el riesgo relativo de CI a distintos valores de biomarcadores. Analizamos los biomarcadores como variables continuas (datos no mostrados) y categóricas (utilizando los valores del cuartil como puntos de corte). En los últimos casos, se calcula la razón de posibilidades (OR) y su intervalo de confianza del 95 %.

[0115] También se aplicó una estrategia CART (árboles de clasificación y regresión) para evaluar las combinaciones (biomarcador + Ag manano). Esta estrategia de árbol de decisión permite producir un conjunto de reglas de clasificación, representadas por un gráfico jerárquico fácilmente comprensible para el usuario. En cada nodo del árbol, se toma una decisión. Por convención, la rama izquierda corresponde a una respuesta positiva a la pregunta de interés y la rama derecha corresponde a una respuesta negativa a la pregunta de interés. El procedimiento de clasificación se puede traducir como un conjunto de reglas «SI - ENTONCES».

[0116] Se aplicó una **estrategia wKNN (K vecinos más próximos ponderados, por sus siglas en inglés)** como anteriormente para evaluar las combinaciones (biomarcador + Ag manano). El algoritmo wKNN es una de las variaciones del procedimiento KNN que usa los K vecinos más próximos, independientemente de sus clases, pero luego usa votos ponderados de cada muestra en lugar de una simple regla de votación por mayoría o pluralidad. Dado un paciente *x_i*, cada una de las muestras K proporciona un voto ponderado que generalmente es igual a alguna función decreciente de su distancia de la muestra desconocida *x*. Estos votos ponderados se suman a continuación para cada aproximación y la clase con el mayor voto total se atribuye a *x*.

[0117] CART y wKNN son procedimientos de aprendizaje supervisados. Estos procedimientos requieren el uso de un conjunto de entrenamiento utilizado para construir el modelo y un conjunto de prueba para validarlo. Así, hemos compartido nuestro conjunto de datos: 2/3 del conjunto de datos se usan para la fase de aprendizaje y 1/3 se usa para la fase de validación. Este intercambio se ha aleatorizado y respeta la proporción inicial de los distintos estatutos en cada muestra. Para estimar la predicción de errores de estos dos clasificadores, utilizamos el procedimiento de validación cruzada 10 veces, repetido 10 veces para evitar problemas de sobreajuste. Para estas estrategias, utilizamos el «paquete ipred», el «paquete rpart» y el «paquete kknn» del software R.

[0118] El **análisis jerárquico de agrupación ascendente (HAC)** es un procedimiento de análisis de agrupación basado en una matriz de distancia por pares que construye una jerarquía de agrupaciones con estrategias secuencialmente aglomerativas y divisivas. Hemos utilizado este procedimiento para organizar el mapa y agrupar la muestra según el nivel más cercano de intensidad de biomarcador. Para este análisis, los datos sin procesar se centraron en la media y se eligieron como parámetros la matriz de correlación de Pearson y el enlace promedio.

2) Resultados

Estandarización de pruebas.

[0119] Para cada experimento se utilizaron 3 controles de suero. El control negativo recogido de un sujeto sano y 2 sueros positivos consistió en 1 grupo de sueros con reactividad conocida contra manano de *Candida albicans* y un suero recogido de un paciente perteneciente al grupo de CI seleccionado de series de experimentos anteriores. Todos estos controles nos permitieron reducir las variaciones entre experimentos.

[0120] Se realizó un estudio del potencial de diagnóstico de distintas proteínas recombinantes por comparación de medianas. Cuando se analizaron los datos serológicos, los anticuerpos contra Fba1 (Fba1 Ab), Hwp1 (Hwp1 Ab), Hsp90 (Hsp90 Ab), Eno1 (Eno1 Ab) y Mp65 (Mp65 Ab) son los mejores biomarcadores para discriminar a los pacientes con CI de los controles, sin embargo, la respuesta humoral contra Sod5 fue menos diferenciadora para ambos grupos.

Comparación de la reactividad serológica contra un grupo de antígenos dentro de los grupos de CI y de control

[0121] Utilizando todos los grupos de pacientes (CI frente a controles), se realizaron diagramas de caja para cada combinación de prueba de mananemia y pruebas de EIA que involucraban proteínas recombinantes (Figuras 1-5). Cuando se comparó la respuesta de anticuerpos contra cada proteína recombinante asociada a la prueba de mananemia con las pruebas de mananemia y de anticuerpos antimanano, se observaron diferencias significativas para Fba1 ($p < 0,0001$; figura 1), Hwp1 ($p < 0,0001$; figura 2), Hsp90 ($p < 0,0001$; figura 3), Eno1 ($p < 0,0001$; figura 4) y Mp65 ($p < 0,0001$; figura 5).

Análisis del potencial diferenciador de cada combinación de RP-Ab/mananemia en comparación con la asociación de mananemia y anticuerpo antimanano

[0122] Se probaron combinaciones de más de 2 marcadores, sin embargo, ninguno ha mejorado significativamente los resultados obtenidos combinando mananemia y uno de los anticuerpos antiproteína recombinante.

[0123] Las curvas ROC muestran la mejora del diagnóstico de CI con la combinación de RP-Ab y antígeno manano en comparación con la combinación de antígeno manano y anticuerpo antimanano (figuras 6-10).

Comparación de la sensibilidad y especificidad del análisis combinado de mananemia y RP-Ab.

[0124] El análisis retrospectivo de la cohorte permitió una sensibilidad y una especificidad de 26,6 % y 99,4 % respectivamente para la mananemia sola cuando la combinación de PlateliaTM *Candida* Ag y Ab mostró una mejora de la sensibilidad (80,0 %) y una disminución de la especificidad (61,7 %).

[0125] Las curvas ROC obtenidas de la combinación de RP-Ab/mananemia (análisis de marcadores combinados por suero) mostraron una mejora significativa de los rendimientos de diagnóstico revelados por las AUC: 0,902, 0,886, 0,884, 0,872 y 0,853 para Fba1, Hwp1, Hsp90, Eno1 y Mp65, respectivamente, frente a 0,769 para la combinación de mananemia y anticuerpos antimanano (Tabla 5).

[0126] Además, la asociación de RP-Ab y mananemia aumenta significativamente la sensibilidad y la especificidad. Con una especificidad arbitrariamente fija en 80,0 % para la combinación de Ag manano + Ab manano, las sensibilidades de Ag manano + Hsp90, Ag manano + Fba1 Ab, Ag manano + Hwp1 Ab, Ag manano + Eno1 Ab y Ag manano + Mp65 Ab fueron 80,9 %, 83,8 %, 83,8 %, 79,1 % y 75,5 %, respectivamente, mientras que las pruebas de diagnóstico serológico actuales que combinaron Ag manano + Ab manano tienen una sensibilidad del 61,7 % (Tabla 5).

Tabla 5. Potencial de diagnóstico (estrategia mROC) de RP-Ab asociado con mananemia para el diagnóstico de CI.
(*) Marcadores normalizados por una transformación de log10.

Combinación de 2 biomarcadores	AUC	Valor de corte	Se(%)	Sp(%)	PPV(%)	NPV(%)	C195%
Ag* manano + Fba1 Ab*	0,902	-1,975	83,8	80,0	86,9	75,0	[0,871; 0,927]
Ag* manano + Hwp1 Ab*	0,886	-2,629	83,8	80,0	87,2	75,2	[0,851; 0,915]

(continúa)

Combinación de 2 biomarcadores	AUC	Valor de corte	Se(%)	Sp(%)	PPV(%)	NPV(%)	C195%
Ag* manano + Hsp90 Ab*	0,884	-2,031	80,9	80,0	86,8	72,0	[0,848; 0,911]
Ag* manano + Eno1 Ab*	0,872	-2,209	79,1	80,0	86,6	70,1	[0,835; 0,901]
Ag* manano + Mp65 Ab*	0,853	-1,483	75,5	80,0	86,4	66,8	[0,815; 0,885]
Ag* manano + Ab* manano	0,769	-0,869	61,7	80,0	83,8	56,3	[0,723; 0,809]

AUC: área bajo la curva; Se: sensibilidad; Sp: especificidad; VPP: valor predictivo positivo (mide la proporción de sujetos con resultados positivos de las pruebas que se diagnostican correctamente); VPN: valor predictivo negativo (mide la proporción de sujetos con resultados negativos de las pruebas que se diagnostican correctamente); IC 95 %: 95 % intervalo de confianza. El valor de corte se ajustó para una especificidad del 80 %.

[0127] Cabe destacar que la contribución de la asociación de RP-Ab y mananemia fue significativamente mayor para los pacientes infectados por *Candida parapsilosis*, donde RP-Ab alcanzó una sensibilidad del 67,2 % frente al 21,3 % para los anticuerpos antimanano. Tal mejora también se observó en episodios determinados por *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida lusitanae*.

[0128] En comparación con la combinación de mananemia con anticuerpos antimanano, la combinación de mananemia y RP-Ab mejoró la especificidad de detección de CI asociada con *Geotrichum capitatum* o *Candida norvegensis*.

10

Análisis de RP-Ab/mananemia para la precocidad del diagnóstico de CI

[0129] La contribución de la asociación RP-Ab/mananemia al diagnóstico temprano de CI se realizó considerando solo las muestras de suero recogidas durante el período del día 15 y el día del aislamiento de las especies de levaduras del hemocultivo (día de positividad del hemocultivo).

15

[0130] Todas las combinaciones fueron capaces de diferenciar significativamente CI de los controles (p <0,0001) con valores más altos de AUC que Ag manano/Ab manano (Tabla 6).

20

Tabla 6. Análisis del rendimiento de la asociación de biomarcadores en dos semanas antes del aislamiento de levaduras de las muestras de sangre.

Combinaciones de marcadores	pWILCOX	pWILCOX_FDR	pWELCH	pWELCH_FDR	Mediana Nfold	AUC
Ag manano + Fba1 Ab	0,0001	0,00011	0,00010	0,00012	2,06	0,892
Ag manano + Hwp1 Ab	0,0001	0,00011	0,00010	0,00012	1,63	0,872
Ag manano + Hsp90 Ab	0,0001	0,00011	0,00010	0,00012	1,64	0,871
Ag manano + Eno1 Ab	0,0001	0,00011	0,00010	0,00012	1,48	0,863
Ag manano + Mp65 Ab	0,0001	0,00011	0,00010	0,00012	1,63	0,826
Ag manano + Ab manano	0,0001	0,00011	0,00010	0,00012	1,19	0,719

[0131] La determinación del día medio de positividad de los distintos biomarcadores se realizó entre el día 15 y el día del aislamiento de la levadura de las muestras de sangre. Para todos estos marcadores la media de positividad es de entre -5 y -6 días antes del aislamiento de las levaduras de las muestras de sangre.

25

Tabla 7. Determinación del día medio de positividad de distintas asociaciones de RP-Ab y mananemia en comparación con el día de aislamiento de levaduras en muestras de sangre.

Combinaciones de marcadores	Media (día positivo)
Ag manano + Ab manano	-5,05
Combinaciones de marcadores	Media (día positivo)
Ag manano + Fba1 Ab	-5,59
Ag manano + Hsp90 Ab	-5,28
Ag manano + Eno1 Ab	-5,48
Ag manano + Hwp1 Ab	-5,41
Ag manano + Mp65 Ab	-5,31

[0132] En consecuencia, todos los RP-Ab/mananemia siguieron siendo diferenciadores de CI, incluso si no hubo una diferencia significativa con la mananemia/anticuerpo antimanano en términos de retraso medio de positividad antes del cultivo sanguíneo (5-6 días antes del cultivo sanguíneo positivo).

Determinación de la razón de posibilidades diagnóstica de distintas combinaciones de anticuerpos y antígenos para el diagnóstico de CI

[0133] La razón de probabilidades refleja la escala de riesgo para desarrollar CI según la intensidad de la respuesta de anticuerpos contra RP y los niveles de mananemia. Si tenemos en cuenta que el pronóstico de CI está estrechamente relacionado con el retraso del inicio de la terapia antimicótica, esta proporción podría ayudar a identificar a los pacientes que necesitan un tratamiento antimicótico temprano.

[0134] Para todas las asociaciones de marcadores, se determinaron 3 modalidades de intensidad de respuesta en función del reparto de los valores obtenidos en la cohorte (utilizando los valores del cuartil como puntos de corte). Por lo tanto, para cada combinación de marcadores, los valores de la modalidad 1 (mod1) son relativos al intervalo [Min, T1[(1.er tercil), los valores de la modalidad 2 (mod2) son relativos al intervalo [T1, T2[(2.º tercil) y los valores de la modalidad 3 (mod3) son relativos al intervalo [T2, Max[(3.er tercil). Cuanto más alta es la intensidad de la respuesta, más importante es el riesgo de CI.

[0135] La combinación de anticuerpos antimananos y mananemia se asoció con razones de posibilidad (OR) significativas y ajustadas que variaron entre 2,4 y 17,5. En comparación, la combinación (Mp65 Ab y mananemia) se asoció con razones de posibilidad significativas y ajustadas que varían entre 5,5 y 47,9. La combinación (Eno1 Ab y mananemia) se asoció con razones de posibilidad significativas y ajustadas que varían entre 7,7 y 59,4. La combinación (Hwp1 Ab y mananemia) se asoció con razones de posibilidad significativas y ajustadas que varían entre 7,1 y 65,5. La combinación (Hsp90 Ab y mananemia) se asoció con razones de posibilidad significativas y ajustadas que varían entre 6,8 y 77,5. La combinación (Fba1 Ab y mananemia) se asoció con razones de posibilidad significativas y ajustadas que varían entre 8,8 y 108,2 para (Tablas 8-13).

Tabla 8. Determinación de razones de posibilidad en Ag manano + Ab manano según la intensidad de las señales

Estimaciones de las razones de posibilidad				
Efecto	Intervalo de modalidad	Estimación puntual	Wald 95 %	
			Límites de confianza	
Ag manano + Ab manano mod2 vs mod1	[0,05; 0,64[vs [-2,19; 0,05[	2,414	1,519	3,838
Ag manano + Ab manano mod3 vs mod1	[0,64; 8,65[vs [-2,19; 0,05[	17,485	9,041	33,817
Ag manano + Ab manano mod3 vs mod2	[0,64; 8,65[vs [0,05; 0,64[	7,242	3,763	13,936

Tabla 9. Determinación de razones de posibilidad en Ag manano + Mp65 Ab según la intensidad de las señales

Estimaciones de las razones de posibilidad				
Efecto	Intervalo de modalidad	Estimación puntual	Wald 95 %	
			Límites de confianza	
Ag manano + Mp65 Ab mod2 vs mod1	[-0,09; 1,43[vs [-6,89; -0,09[	5,456	3,324	8,956
Ag manano + Mp65 Ab mod3 vs mod1	[1,43; 10,37[vs [-6,89; -0,09[	47,887	21,578	106,276
Ag manano + Mp65 Ab mod3 vs mod2	[1,43; 10,37[vs [-0,09; 1,43[	8,777	3,979	19,360

5 **Tabla 10.** Determinación de razones de posibilidad en Ag manano + Eno1 Ab según la intensidad de las señales

Estimaciones de las razones de posibilidad				
Efecto	Intervalo de modalidad	Estimación puntual	Wald 95 %	
			Límites de confianza	
Ag manano + Eno1 Ab mod2 vs mod1	[-0,30; 1,61[vs [-3,75; -0,30[	7,739	4,613 12,983	
Ag manano + Eno1 Ab mod3 vs mod1	[1,61; 20,74[vs [-3,75; -0,30[	59,421	26,538	133,049
Ag manano + Eno1 Ab mod3 vs mod2	[1,61; 20,74[vs [-0,30; 1,61[	7,678	3,466	17,011

Tabla 11. Determinación de razones de posibilidad en Ag manano + Hwp1 Ab según la intensidad de las señales.

Estimaciones de las razones de posibilidad				
Efecto	Intervalo de modalidad	Estimación puntual	Wald 95 %	
			Límites de confianza	
Ag manano + Hwp1 Ab mod2 vs mod1	[-0,34; 1,90[vs [-4,45; -0,34[	7,065	4,237	11,781
Ag manano + Hwp1 Ab mod3 vs mod1	[1,90; 11,66[vs [4,45; -0,34[	65,464	28,095	152,538
Ag manano + Hwp1 Ab mod3 vs mod2	[1,90; 11,66[vs [0,34; 1,90[	9,266	4,018	21,365

10

Tabla 12. Determinación de razones de posibilidad en Ag manano + Hsp90 según la intensidad de las señales.

Estimaciones de las razones de posibilidad				
Efecto	Intervalo de modalidad	Estimación puntual	Wald 95 %	
			Límites de confianza	
Ag manano + Hsp90 Ab mod2 vs mod1	[-0,35; 1,89[vs [-7,45; -0,35[	6,777	4,068	11,289
Ag manano + Hsp90 Ab mod3 vs mod1	[1,89; 12,40[vs [-7,45; -0,35[	77,458	31,551	190,161

(continúa)

Efecto	Intervalo de modalidad	Estimación puntual	Wald 95 %	
			Límites de confianza	
Ag manano + Hsp90 Ab mod3 vs mod2	[1,89; 12,40[vs [-0,35; 1,89[	11,430	4,705	27,771

Tabla 13. Determinación de razones de posibilidad en Ag manano + Fba1 Ab según la intensidad de las señales.

Estimaciones de las razones de posibilidad				
Efecto	Intervalo de modalidad	Estimación puntual	Wald 95 %	
			Límites de confianza	
Ag manano + Fba1 Ab mod2 vs mod1	[-0,39; 2,17[vs [-8,08; -0,39[	8,762	5,180	14,822
Ag manano + Fba1 Ab mod3 vs mod1	[2,17; 11,96[vs [-8,08; -0,39[	108,250	40,808	287,149
Ag manano + Fba1 Ab mod3 vs mod2	[2,17; 11,96[vs [-0,39; 2,17[	12,354	4,745	32,165

5

[0136] Por lo tanto, según esta escala, la asociación de anticuerpo antimanano y mananemia permite un riesgo máximo de 17,5, mientras que el riesgo obtenido con la asociación de mananemia y RP-Ab alcanza 47,9, 59,4, 65,5, 77,5 y 108,2 para Mp65, Eno1, Hwp1, Hsp90 y Fba1 respectivamente.

10 Realización de la interpretación combinada de los ensayos de biomarcadores separados

[0137] El desempeño del procedimiento de diagnóstico se basa en la interpretación combinada de los ensayos de biomarcadores separados, es decir, en la determinación de si un nivel elevado de dicho glicano de *Candida* y/o un nivel elevado de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65, en relación con su nivel de referencia respectivo detectado, se evaluaron tanto en suero como en pacientes. En la evaluación en suero, se evalúa si los niveles de biomarcadores medidos en cada muestra de suero de cualquier paciente condujeron correctamente a la identificación del paciente con o sin candidiasis invasiva. En la evaluación de pacientes, se evalúa si los niveles de biomarcadores medidos en muestras de suero de un paciente dado condujeron correctamente a la identificación del paciente con o sin candidiasis invasiva.

20

[0138] Los rendimientos en suero utilizando la interpretación combinada de ensayos separados, como se detalla en la Tabla 14, muestran que para una especificidad establecida en 79,9 % (aproximadamente 80 %) los niveles de sensibilidad obtenidos para las distintas combinaciones de biomarcadores Ag manano + Ab proteína, aunque no son idénticos a los obtenidos en suero utilizando el análisis combinado de los biomarcadores (resultados mostrados en la Tabla 5), todos mejoran en comparación con la prueba de referencia Ag manano + Ab manano.

25

Tabla 14. Rendimientos en sueros utilizando interpretación combinada de ensayos separados

Marcadores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Ag manano + Hsp90 Ab	74,8	79,9
Ag manano + Mp65 Ab	75,6	79,9
Ag manano + Fba1 Ab	83,5	79,9
Ag manano + Eno1 Ab	78,3	79,9
Ag manano + Hwp1 Ab	81,5	79,9
Ag manano + Ab* manano	62,6	75,1

* valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas actuales Platelia *Candida* antigen (Ag) y Platelia *Candida* Ab Plus (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, Francia).

[0139] La comparación de la Tabla 14 y la Tabla 15 muestra que los rendimientos en suero o en pacientes que usan la interpretación combinada de ensayos separados son similares.

30

Tabla 15. Rendimientos en pacientes utilizando interpretación combinada de ensayos separados

Marcadores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Ag manano + Hsp90 Ab	80,6	79,9
Ag manano + Mp65 Ab	83,9	79,9
Ag manano + Fba1 Ab	84,9	79,9
Marcadores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Ag manano + Eno1 Ab	82,8	79,9
Ag manano + Hwp1 Ab	84,9	79,9
Ag manano + Ab* manano	61,3	75,1
* valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas actuales Platelia <i>Candida</i> antigen (Ag) y Platelia <i>Candida</i> Ab Plus (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, Francia).		

LISTADO DE SECUENCIAS

[0140]

5 <110> Bio-Rad Innovations Centre Hospitalier Regional Universitaire de Lille Universite Lille 2 Droit et Sante
 <120> PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR *CANDIDA* INVASIVAS
 <130> BET13P1311
 10 <160> 28
 <170> Versión de PatentIn 3.5
 15 <210> 1
 <211> 1080
 <212> ADN
 <213> *Candida albicans*
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1080)
 25 <223> Fructosa bifosfato aldolasa
 <400> 1
 atggctcctc cagcagtttt aagtaaattcc ggtgttatct acggtaaaga cgtcaaagac 60
 ttgtttgact atgctcaaga aaaaggtttt gccattccag ctatcaatgt cacttcatcc 120
 tcaactgttg ttgctgcttt agaagctgcc agagacaaca aggctccaat catcttgcaa 180
 acttctcaag gtgggtgctgc ctactttgcc ggtaaagggtg tgcacaacaa agatcaagct 240
 gcttccattg ctggttcaat tgctgccgct cactacatta gagccattgc tccaacttat 300
 ggtatcccag ttgtttttaca cactgatcac tgtgccaaaa aattattgcc atggtttgat 360
 ggtatgttga aagccgatga agaattcttt gctaagaccg gtactccatt gttctcatcc 420
 cacatgttgg atttatctga agaaaccgat gacgaaaaca ttgctacttg tgccaaatat 480
 ttcgaaagaa tggctaaaat ggggtcaatgg ttagaaatgg aaattgggtat cactgggtgg 540
 gaagaagatg gtgtcaacaa cgaacacggt gaaaaagatg ctttatacac ttctccagaa 600
 actgttttgc ctgtctacga atcttttacac aagatttctc caaacttttc tattgctgct 660
 gcttttggtg acgtccacgg tgtttacaaa ccaggtaatg tgcaattgag accagaaatc 720
 ttgggtgacc accaagttta cgctaagaaa caaattggta ctgatgctaa acaccatta 780
 tacttggttt tccacggtgg ttctggttct actcaagaag aattcaacac tgctatcaag 840
 aatgggtgtg tcaagggtcaa cttggacact gattgtcaat atgcttactt gactgggtatc 900
 agagattacg tcaccaacaa gattgaatac ttgaaagcac cagttggttaa ccagaagggt 960
 gctgacaaac caaacaagaa atactttgac ccaagagtct gggttagaga aggtgaaaag 1020
 accatgtcca agagaattgc tgaagctttg gatattttcc acaccaaagg acaattgtaa 1080

<210> 2

<211> 359

<212> PRT

5 <213> *Candida albicans*

<220>

<221> MISC_FEATURE

10

<222> (1)..(359)

<223> Fructosa bifosfato aldolasa

<400> 2

Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Val	Leu	Ser	Lys	Ser	Gly	Val	Ile	Tyr	Gly	Lys
1				5					10					15	

Asp	Val	Lys	Asp	Leu	Phe	Asp	Tyr	Ala	Gln	Glu	Lys	Gly	Phe	Ala	Ile
		20					25						30		

Pro	Ala	Ile	Asn	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Glu
		35				40						45			

Ala	Ala	Arg	Asp	Asn	Lys	Ala	Pro	Ile	Ile	Leu	Gln	Thr	Ser	Gln	Gly
	50				55						60				

Gly	Ala	Ala	Tyr	Phe	Ala	Gly	Lys	Gly	Val	Asp	Asn	Lys	Asp	Gln	Ala
65					70					75					80

Ala	Ser	Ile	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	His	Tyr	Ile	Arg	Ala	Ile
			85						90					95	

Ala	Pro	Thr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Val	Val	Leu	His	Thr	Asp	His	Cys	Ala
			100					105					110		

Lys	Lys	Leu	Leu	Pro	Trp	Phe	Asp	Gly	Met	Leu	Lys	Ala	Asp	Glu	Glu
		115					120					125			

Phe	Phe	Ala	Lys	Thr	Gly	Thr	Pro	Leu	Phe	Ser	Ser	His	Met	Leu	Asp
	130					135					140				

Leu	Ser	Glu	Glu	Thr	Asp	Asp	Glu	Asn	Ile	Ala	Thr	Cys	Ala	Lys	Tyr
145					150					155					160

Phe	Glu	Arg	Met	Ala	Lys	Met	Gly	Gln	Trp	Leu	Glu	Met	Glu	Ile	Gly
				165					170					175	

Ile	Thr	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Asn	Asn	Glu	His	Val	Glu	Lys
			180					185					190		

Asp	Ala	Leu	Tyr	Thr	Ser	Pro	Glu	Thr	Val	Phe	Ala	Val	Tyr	Glu	Ser
		195					200					205			

15

ES 2 777 205 T3

Leu His Lys Ile Ser Pro Asn Phe Ser Ile Ala Ala Ala Phe Gly Asn
210 215 220

Val His Gly Val Tyr Lys Pro Gly Asn Val Gln Leu Arg Pro Glu Ile
225 230 235 240

Leu Gly Asp His Gln Val Tyr Ala Lys Lys Gln Ile Gly Thr Asp Ala
245 250 255

Lys His Pro Leu Tyr Leu Val Phe His Gly Gly Ser Gly Ser Thr Gln
260 265 270

Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Lys Asn Gly Val Val Lys Val Asn Leu
275 280 285

Asp Thr Asp Cys Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Gly Ile Arg Asp Tyr Val
290 295 300

Thr Asn Lys Ile Glu Tyr Leu Lys Ala Pro Val Gly Asn Pro Glu Gly
305 310 315 320

Ala Asp Lys Pro Asn Lys Lys Tyr Phe Asp Pro Arg Val Trp Val Arg
325 330 335

Glu Gly Glu Lys Thr Met Ser Lys Arg Ile Ala Glu Ala Leu Asp Ile
340 345 350

Phe His Thr Lys Gly Gln Leu
355

<210> 3

<211> 1323 <212> ADN

5 <213> *Candida albicans*

<220>

<221> misc_feature <222> (1)..(1323)

10 <223> Enolasa 1

<400> 3

atgtcttacg ccactaaaat ccacgccaga tacgtctacg actccagagg taaccaacc	60
gttgaagttg atttcaccac cgacaaaggt ttattcagat caattgtccc atctggtgcc	120
tctactggtg tccacgaagc tttggaattg agagatggtg acaaatccaa atggttaggt	180
aaaggtgttt tgaaagccgt tgccaatggt aatgacatca ttgccccagc ttttaataaaa	240
gccaaagatcg atgttgtcga ccaagctaag attgatgaat tcttgttgtc cttggacggt	300

15

```

actccaaaca aatccaaatt gggtgccaat gctatcttgg gtgtttcttt ggctgctgcc      360
aatgctgccg ctgctgctca aggcattcca ttgtacaaac acattgccaa catttccaat      420
gccaaagaaag gttaaattcgt tttgccagtt ccattccaaa acgttttgaa cgggtggttcc      480
catgctgggtg gtgcttttagc tttccaagaa tttatgattg cccaactgg tgtctccact      540
ttctctgaag ctttgagaat tgggtcagaa gtttaccaca acttgaaatc tttgaccaag      600
aagaaatacg gtcaatccgc tggtaacgtc ggtgacgaag gtggtggtgc tccagatatc      660
aaaactccaa aggaagcttt ggacttgatc atggatgcca ttgacaaagc cggttacaaa      720
ggtaagggttg gtattgccat ggatgttgct tcatctgaat tctacaagga cggtaaatac      780
gacttggact ttaaaaaccc agaatccgac ccatctaaat ggttgtctgg ccacaaattg      840
gctgacttat atgaacaatt gatttccgaa taccgaattg tttctattga agatccattc      900
gctgaagatg actgggatgc ttgggtccac ttctttgaaa gagttggtga caagatccaa      960
attgtcgggtg atgatttgac tgtcactaac cctaccagaa tcaagactgc cattgaaaag     1020
aaagccgcta atgctttggt gttgaagggt aaccaaattg gtactttgac tgaatctata     1080
caagctgcta acgattctta cgctgctggt tgggggtgtca tggtttccca cagatccggt     1140
gaaaccgaag atactttcat tgctgacttg tcagttggtt taagatctgg tcaaatacaag     1200
actggtgctc cagctagatc tgaaagattg gccaaattga accaaatctt gagaatcgaa     1260
gaagaattag gttctgaagc tatctacgct ggtaaagatt tccaaaaggc ttctcaattg     1320
taa                                                                    1323

```

<210> 4

<211> 440

5 <212> PRT

<213> *Candida albicans*

<220>

10 <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(440)

<223> Enolasa 1

<400> 4

```

Met Ser Tyr Ala Thr Lys Ile His Ala Arg Tyr Val Tyr Asp Ser Arg
1           5           10           15

```

```

Gly Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Phe Thr Thr Asp Lys Gly Leu Phe
          20           25           30

```

```

Arg Ser Ile Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Val His Glu Ala Leu
          35           40           45

```

15

ES 2 777 205 T3

Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Lys Trp Leu Gly Lys Gly Val Leu
 50 55 60

Lys Ala Val Ala Asn Val Asn Asp Ile Ile Ala Pro Ala Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Ala Lys Ile Asp Val Val Asp Gln Ala Lys Ile Asp Glu Phe Leu Leu
 85 90 95

Ser Leu Asp Gly Thr Pro Asn Lys Ser Lys Leu Gly Ala Asn Ala Ile
 100 105 110

Leu Gly Val Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala Ala Gln Gly
 115 120 125

Ile Pro Leu Tyr Lys His Ile Ala Asn Ile Ser Asn Ala Lys Lys Gly
 130 135 140

Lys Phe Val Leu Pro Val Pro Phe Gln Asn Val Leu Asn Gly Gly Ser
 145 150 155 160

His Ala Gly Gly Ala Leu Ala Phe Gln Glu Phe Met Ile Ala Pro Thr
 165 170 175

Gly Val Ser Thr Phe Ser Glu Ala Leu Arg Ile Gly Ser Glu Val Tyr
 180 185 190

His Asn Leu Lys Ser Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Gly Gln Ser Ala Gly
 195 200 205

Asn Val Gly Asp Glu Gly Gly Val Ala Pro Asp Ile Lys Thr Pro Lys
 210 215 220

Glu Ala Leu Asp Leu Ile Met Asp Ala Ile Asp Lys Ala Gly Tyr Lys
 225 230 235 240

Gly Lys Val Gly Ile Ala Met Asp Val Ala Ser Ser Glu Phe Tyr Lys
 245 250 255

Asp Gly Lys Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Asn Pro Glu Ser Asp Pro Ser
 260 265 270

Lys Trp Leu Ser Gly Pro Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Glu Gln Leu Ile
 275 280 285

Ser Glu Tyr Pro Ile Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Ala Glu Asp Asp
 290 295 300

ES 2 777 205 T3

Trp Asp Ala Trp Val His Phe Phe Glu Arg Val Gly Asp Lys Ile Gln
 305 310 315 320
 Ile Val Gly Asp Asp Leu Thr Val Thr Asn Pro Thr Arg Ile Lys Thr
 325 330 335
 Ala Ile Glu Lys Lys Ala Ala Asn Ala Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln
 340 345 350
 Ile Gly Thr Leu Thr Glu Ser Ile Gln Ala Ala Asn Asp Ser Tyr Ala
 355 360 365
 Ala Gly Trp Gly Val Met Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp
 370 375 380
 Thr Phe Ile Ala Asp Leu Ser Val Gly Leu Arg Ser Gly Gln Ile Lys
 385 390 395 400
 Thr Gly Ala Pro Ala Arg Ser Glu Arg Leu Ala Lys Leu Asn Gln Ile
 405 410 415
 Leu Arg Ile Glu Glu Glu Leu Gly Ser Glu Ala Ile Tyr Ala Gly Lys
 420 425 430
 Asp Phe Gln Lys Ala Ser Gln Leu
 435 440

<210> 5

5 <211> 2124

<212> ADN

<213> *Candida albicans*

<220>

10

<221> misc_feature <222> (1)..(2124)

<223> Proteína de choque térmico 90

<400> 5

15

atggctgacg caaaagttga aactcacgaa ttcactgctg agatctctca gttgatgtct 60
 ttgatcatta acacagtcta ttcaaacaag gaaatcttct taagagaatt gatctccaat 120
 gcttctgatg ctttggacaa aatcagatac caagccttgt ctgatccatc ccaattggaa 180
 tccgaaccag aattgttcat tagaatcatc cctcaaaagg accaaaaagt tttggaaatt 240
 agagattctg gtattggtat gaccaaagct gacttggtca acaatttggg tactattgct 300
 aaatctggta ccaaactcct tatggaagct ttaagtgtg gtgctgacgt ttctatgatt 360
 ggtcaatttg gtgttggttt ctactccttg ttcttggttg ctgatcacgt ccaagttatc 420

tccaaacaca atgacgacga acaatacgtt tgggaatcta acgctggtgg taagttcact	480
gttacttttg atgaaactaa cgaaagattg ggtcgtggta ccatgttgag attgttcttg	540
aaggaagatc aattggaata cttggaagaa aaaagaatca aagaagttgt caagaaacac	600
tctgaattcg ttgcttatcc aatccaatta gttgtcacca aagaagttga aaaagaagtt	660
ccagaaaccg aagaagaaga caaagctgct gaagaagacg acaagaaacc aaaattggaa	720
gaagtcaagg atgaagaaga cgaaaagaaa gaaaagaaga ccaagactgt caaagaagag	780
gttactgaaa ctgaagagtt gaacaagacc aaaccattat ggaccagaaa cccatctgat	840
atcactcaag atgaatacaa tgcattctac aagtctatctt ccaacgactg ggaagaccca	900
ttggctgtca aacacttttc tgttgaaggt caattagaat tcagagctat cttgtttgtt	960
ccaaagagag ctccatttga tgcctttgaa tccaagaaga agaagaacaa catcaaatta	1020
tacgtccgta gagtgtttat cactgatgat gctgaagagt tgattccaga atggttaagt	1080
ttcatcaagg gggttgtcga ttccgaagac ttgccattga acttgtccag agaaatggtg	1140
caacaaaaca agattttgaa agttatcaga aagaacattg tcaaaaagat gattgaaact	1200
ttcaatgaaa tctctgaaga ccaagagcaa ttcaaccaat tctacactgc tttctccaag	1260
aacatcaaat tgggtattca tgaagatgct caaaacagac aatctttggc taaattggtg	1320
agattctact ctaccaaatac ttctgaagaa atgacttcct tgtctgacta cgttactaga	1380
atgccagaac accaaaagaa tatctactac atcactggtg aatccatcaa agccgttgaa	1440
aaatcaccat tcttgatgct cttgaaagct aagaactttg aagtcttggt catggtggat	1500
ccaatcgatg aatatgccat gactcaattg aaggaatttg aagacaagaa attggttgat	1560
attaccaaag actttgaatt ggaagaaagt gacgaagaaa aagctgctag agaaaaggaa	1620
atcaaagaat acgaaccatt gaccaaagct ttgaaagata ttcttggtga tcaagttgaa	1680
aaagttggtg tttcctacaa acttggtgat gctccagctg ccattagaac tgggtcaattt	1740
ggttggtctg ccaatatgga aagaatcatg aaggctcaag ctttgagaga caccaccatg	1800
tcttcttaca tgtcctctaa gaagacctt gaaatttctc catcttcccc aattatcaag	1860
gaattgaaga agaaagttga aaccgatgga gctgaagaca agaccgttaa ggacttgacc	1920
actttggtgt ttgatactgc attggtgact tctggtttca ctttgagaga accatccaac	1980
tttgcccaca gaattaacag attgattgcc ttgggattga atattgacga tgattcagaa	2040
gaaactgctg ttgaacctga agctactact actgcctcaa ctgacgaacc agctggagaa	2100
tctgctatgg aagaagttga ttaa	2124

<210> 6

<211> 707

<212> PRT
<213> *Candida albicans*

<220>

5

<221> MISC_FEATURE <222> (1)..(707)
<223> Proteína de choque térmico 90

<400> 6

10

ES 2 777 205 T3

Met	Ala	Asp	Ala	Lys	Val	Glu	Thr	His	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Ile	Ser	1	5	10	15
Gln	Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Ile	Asn	Thr	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Glu	Ile	20	25	30	
Phe	Leu	Arg	Glu	Leu	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys	Ile	35	40	45	
Arg	Tyr	Gln	Ala	Leu	Ser	Asp	Pro	Ser	Gln	Leu	Glu	Ser	Glu	Pro	Glu	50	55	60	
Leu	Phe	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	Gln	Lys	Asp	Gln	Lys	Val	Leu	Glu	Ile	65	70	75	80
Arg	Asp	Ser	Gly	Ile	Gly	Met	Thr	Lys	Ala	Asp	Leu	Val	Asn	Asn	Leu	85	90	95	
Gly	Thr	Ile	Ala	Lys	Ser	Gly	Thr	Lys	Ser	Phe	Met	Glu	Ala	Leu	Ser	100	105	110	
Ala	Gly	Ala	Asp	Val	Ser	Met	Ile	Gly	Gln	Phe	Gly	Val	Gly	Phe	Tyr	115	120	125	
Ser	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Asp	His	Val	Gln	Val	Ile	Ser	Lys	His	Asn	130	135	140	
Asp	Asp	Glu	Gln	Tyr	Val	Trp	Glu	Ser	Asn	Ala	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr	145	150	155	160
Val	Thr	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn	Glu	Arg	Leu	Gly	Arg	Gly	Thr	Met	Leu	165	170	175	
Arg	Leu	Phe	Leu	Lys	Glu	Asp	Gln	Leu	Glu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Arg	180	185	190	
Ile	Lys	Glu	Val	Val	Lys	Lys	His	Ser	Glu	Phe	Val	Ala	Tyr	Pro	Ile	195	200	205	
Gln	Leu	Val	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Glu	Lys	Glu	Val	Pro	Glu	Thr	Glu	210	215	220	

ES 2 777 205 T3

Glu	Glu	Asp	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Asp	Asp	Lys	Lys	Pro	Lys	Leu	Glu	225	230	235	240
Glu	Val	Lys	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Thr	Lys	Thr	245	250	255	
Val	Lys	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Thr	Glu	Glu	Leu	Asn	Lys	Thr	Lys	Pro	260	265	270	
Leu	Trp	Thr	Arg	Asn	Pro	Ser	Asp	Ile	Thr	Gln	Asp	Glu	Tyr	Asn	Ala	275	280	285	
Phe	Tyr	Lys	Ser	Ile	Ser	Asn	Asp	Trp	Glu	Asp	Pro	Leu	Ala	Val	Lys	290	295	300	
His	Phe	Ser	Val	Glu	Gly	Gln	Leu	Glu	Phe	Arg	Ala	Ile	Leu	Phe	Val	305	310	315	320
Pro	Lys	Arg	Ala	Pro	Phe	Asp	Ala	Phe	Glu	Ser	Lys	Lys	Lys	Lys	Asn	325	330	335	
Asn	Ile	Lys	Leu	Tyr	Val	Arg	Arg	Val	Phe	Ile	Thr	Asp	Asp	Ala	Glu	340	345	350	
Glu	Leu	Ile	Pro	Glu	Trp	Leu	Ser	Phe	Ile	Lys	Gly	Val	Val	Asp	Ser	355	360	365	
Glu	Asp	Leu	Pro	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Glu	Met	Leu	Gln	Gln	Asn	Lys	370	375	380	
Ile	Leu	Lys	Val	Ile	Arg	Lys	Asn	Ile	Val	Lys	Lys	Met	Ile	Glu	Thr	385	390	395	400
Phe	Asn	Glu	Ile	Ser	Glu	Asp	Gln	Glu	Gln	Phe	Asn	Gln	Phe	Tyr	Thr	405	410	415	
Ala	Phe	Ser	Lys	Asn	Ile	Lys	Leu	Gly	Ile	His	Glu	Asp	Ala	Gln	Asn	420	425	430	
Arg	Gln	Ser	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Arg	Phe	Tyr	Ser	Thr	Lys	Ser	Ser	435	440	445	
Glu	Glu	Met	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Tyr	Val	Thr	Arg	Met	Pro	Glu	His	450	455	460	
Gln	Lys	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Glu	Ser	Ile	Lys	Ala	Val	Glu				

ES 2 777 205 T3

465		470		475		480
Lys Ser Pro Phe Leu Asp Ala Leu Lys Ala Lys Asn Phe Glu Val Leu						
		485		490		495
Phe Met Val Asp Pro Ile Asp Glu Tyr Ala Met Thr Gln Leu Lys Glu						
		500		505		510
Phe Glu Asp Lys Lys Leu Val Asp Ile Thr Lys Asp Phe Glu Leu Glu						
		515		520		525
Glu Ser Asp Glu Glu Lys Ala Ala Arg Glu Lys Glu Ile Lys Glu Tyr						
		530		535		540
Glu Pro Leu Thr Lys Ala Leu Lys Asp Ile Leu Gly Asp Gln Val Glu						
		545		550		555
Lys Val Val Val Ser Tyr Lys Leu Val Asp Ala Pro Ala Ala Ile Arg						
		565		570		575
Thr Gly Gln Phe Gly Trp Ser Ala Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala						
		580		585		590
Gln Ala Leu Arg Asp Thr Thr Met Ser Ser Tyr Met Ser Ser Lys Lys						
		595		600		605
Thr Phe Glu Ile Ser Pro Ser Ser Pro Ile Ile Lys Glu Leu Lys Lys						
		610		615		620
Lys Val Glu Thr Asp Gly Ala Glu Asp Lys Thr Val Lys Asp Leu Thr						
		625		630		635
Thr Leu Leu Phe Asp Thr Ala Leu Leu Thr Ser Gly Phe Thr Leu Asp						
		645		650		655
Glu Pro Ser Asn Phe Ala His Arg Ile Asn Arg Leu Ile Ala Leu Gly						
		660		665		670
Leu Asn Ile Asp Asp Asp Ser Glu Glu Thr Ala Val Glu Pro Glu Ala						
		675		680		685
Thr Thr Thr Ala Ser Thr Asp Glu Pro Ala Gly Glu Ser Ala Met Glu						
		690		695		700
Glu Val Asp						
705						

<210> 7
<211> 1905
<212> ADN
5 <213> *Candida albicans*

<220>

<221> misc_feature <222> (1)..(1905)
10 <223> Proteína de pared de la hifa

<400> 7

atgagattat caactgctca acttattgct atcgcttatt acatggtatc aattggggcc	60
actgtcccac aggtagacgg tcaaggtgaa acagaggaag ctcttattca aaagagatct	120
tatgattact atcaagaacc atgtgatgat taccacacaac aacaacaaca acaagagcct	180
tgtgattacc cacaacaaca acagcaggaa gaaccttgtg attaccacaca acaacaacca	240
caagagccat gtgactatcc acaacagcca caagaacctt gtgactaccc acaacaacca	300
caagaacctt gtgactaccc acaacaacca caagaacctt gcgacaatcc acctcaacct	360
gatgttcctt gtgacaatcc tcctcaacct gatgttcctt gtgacaatcc tcctcaacct	420
gatattcctt gtgacaatcc tcctcaacct gatattcctt gtgacaatcc tcctcaacct	480
gatcagcctg atgacaatcc tcctattcca aacattccaa ccgattggat tccaaatatt	540
ccaactgatt ggatcccaga tattccagaa aagccaacaa ctccagctac tactccaaac	600
attcctgcta caactactac ttctgaatca tcatcttctt cttcttcttc atcatcatct	660
actactccaa aaacttctgc ttcaactaca cctgaatctt ctgttccagc taccactcca	720
aacacttctg ttccaacaac ttcttcagaa tcaactactc cagctactag cccagaaagt	780
tctgttccag ttacttctgg atcatctatt ttagctacca cttcagaatc atcatctgct	840
ccagctacta ctccaaatac atctgttcca accactacta ctgaagccaa atcatcaagt	900
actccattaa ctactactac tgaacatgat acaactgttg tcaactgttac ttcatgttct	960
aacagtgttt gtaccgaaag tgaagttact actggtgtta ttgtcatcac atctaaagat	1020
actatttaca ccacttactg tccattgact gaaactactc cagtttctac tgctccagcc	1080
actgaaacac caactggtac agtatccact tctactgaac aatcaactac tgttattact	1140
gttacttcat gttctgaaag ctcttgtacc gaatctgaag ttactactgg tgttgttgtt	1200
gttacttctg aggaaactgt ctacactaca ttctgtccat tgactgaaaa cactccaggt	1260
actgattcaa ctccagaagc ttccattcca cctatggaaa caattcctgc tggttcagaa	1320
tcatccatgc ctgccggtga aacctctcca gctgttccaa aatcagatgt tccagctact	1380
gaatcagctc cagttcctga aatgactcca gctggttcac aaccatctat tcctgccggt	1440
gaaacctctc cagctgttcc aaaatcagat gttccagcta ctgaatctgc tcctgctcct	1500
gaaatgactc cagctggtac tgaaactaaa ccagctgctc caaaatcatc agctcctgcc	1560

ES 2 777 205 T3

```

actgaacctt cccagttgc tccaggtact gaatccgcac cagctgggtcc aggtgcttct      1620
tcttctccaa aatcttctgt tttggctagt gaaacctcac caattgctcc aggtgctgaa      1680
accgctccag ctggctcaag tgggtgctatt actattccgg aatctagtgc tgtcgtctct      1740
acgactgaag gtgctattcc aactacatta gaatcagttc cactcatgca accatctgcc      1800
aattactcaa gtgtcgctcc tatttctaca tttgaagggtg ctggttaacaa catgagattg      1860
actttcgggtg ctgctattat tgggtattgct gcattcttga tctaa                      1905

```

<210> 8

<211> 634

5 <212> PRT

<213> *Candida albicans*

<220>

10 <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(634)

<223> Proteína de pared de la hifa

<400> 8

```

Met Arg Leu Ser Thr Ala Gln Leu Ile Ala Ile Ala Tyr Tyr Met Leu
1          5          10          15

Ser Ile Gly Ala Thr Val Pro Gln Val Asp Gly Gln Gly Glu Thr Glu
          20          25          30

Glu Ala Leu Ile Gln Lys Arg Ser Tyr Asp Tyr Tyr Gln Glu Pro Cys
          35          40          45

Asp Asp Tyr Pro Gln Gln Gln Gln Gln Glu Pro Cys Asp Tyr Pro
50          55          60

Gln Gln Gln Gln Gln Glu Glu Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Gln Gln Pro
65          70          75          80

Gln Glu Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Gln Pro Gln Glu Pro Cys Asp Tyr
          85          90          95

Pro Gln Gln Pro Gln Glu Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Gln Pro Gln Glu
          100         105         110

Pro Cys Asp Asn Pro Pro Gln Pro Asp Val Pro Cys Asp Asn Pro Pro
          115         120         125

Gln Pro Asp Val Pro Cys Asp Asn Pro Pro Gln Pro Asp Ile Pro Cys
          130         135         140

```

15

ES 2 777 205 T3

Asp	Asn	Pro	Pro	Gln	Pro	Asp	Ile	Pro	Cys	Asp	Asn	Pro	Pro	Gln	Pro	145	150	155	160
Asp	Gln	Pro	Asp	Asp	Asn	Pro	Pro	Ile	Pro	Asn	Ile	Pro	Thr	Asp	Trp	165	170	175	
Ile	Pro	Asn	Ile	Pro	Thr	Asp	Trp	Ile	Pro	Asp	Ile	Pro	Glu	Lys	Pro	180	185	190	
Thr	Thr	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ile	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	195	200	205	
Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Lys	210	215	220	
Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Glu	Ser	Ser	Val	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	225	230	235	240
Asn	Thr	Ser	Val	Pro	Thr	Thr	Ser	Ser	Glu	Ser	Thr	Thr	Pro	Ala	Thr	245	250	255	
Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Val	Pro	Val	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Ile	Leu	Ala	260	265	270	
Thr	Thr	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Thr	Ser	275	280	285	
Val	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr	290	295	300	
Thr	Thr	Thr	Glu	His	Asp	Thr	Thr	Val	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Cys	Ser	305	310	315	320
Asn	Ser	Val	Cys	Thr	Glu	Ser	Glu	Val	Thr	Thr	Gly	Val	Ile	Val	Ile	325	330	335	
Thr	Ser	Lys	Asp	Thr	Ile	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Cys	Pro	Leu	Thr	Glu	Thr	340	345	350	
Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Ala	Pro	Ala	Thr	Glu	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	Val	355	360	365	
Ser	Thr	Ser	Thr	Glu	Gln	Ser	Thr	Thr	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Ser	Cys	370	375	380	
Ser	Glu	Ser	Ser	Cys	Thr	Glu	Ser	Glu	Val	Thr	Thr	Gly	Val	Val	Val	385	390	395	400

ES 2 777 205 T3

Val	Thr	Ser	Glu	Glu	Thr	Val	Tyr	Thr	Thr	Phe	Cys	Pro	Leu	Thr	Glu	405	410	415	
Asn	Thr	Pro	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Met	420	425	430	
Glu	Thr	Ile	Pro	Ala	Gly	Ser	Glu	Ser	Ser	Met	Pro	Ala	Gly	Glu	Thr	435	440	445	
Ser	Pro	Ala	Val	Pro	Lys	Ser	Asp	Val	Pro	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Pro	450	455	460	
Val	Pro	Glu	Met	Thr	Pro	Ala	Gly	Ser	Gln	Pro	Ser	Ile	Pro	Ala	Gly	465	470	475	480
Glu	Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Pro	Lys	Ser	Asp	Val	Pro	Ala	Thr	Glu	Ser	485	490	495	
Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Met	Thr	Pro	Ala	Gly	Thr	Glu	Thr	Lys	Pro	Ala	500	505	510	
Ala	Pro	Lys	Ser	Ser	Ala	Pro	Ala	Thr	Glu	Pro	Ser	Pro	Val	Ala	Pro	515	520	525	
Gly	Thr	Glu	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser	Pro	Lys	530	535	540	
Ser	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Glu	Thr	Ser	Pro	Ile	Ala	Pro	Gly	Ala	Glu	545	550	555	560
Thr	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Thr	Ile	Pro	Glu	Ser	Ser	565	570	575	
Ala	Val	Val	Ser	Thr	Thr	Glu	Gly	Ala	Ile	Pro	Thr	Thr	Leu	Glu	Ser	580	585	590	
Val	Pro	Leu	Met	Gln	Pro	Ser	Ala	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Ala	Pro	Ile	595	600	605	
Ser	Thr	Phe	Glu	Gly	Ala	Gly	Asn	Asn	Met	Arg	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	610	615	620	
Ala	Ile	Ile	Gly	Ile	Ala	Ala	Phe	Leu	Ile							625	630		

<210> 9

<211> 1137

5 <212> ADN

<213> *Candida albicans*

<220>

5 <221> misc_feature <222> (1)..(1137)

<223> Manoproteína 65

<400> 9

```

atgttattca agtccttcgt tacttttact gtcttagcca atgctttggc tgctccatta      60
gctcatcaac atcatcaaca taaagaagaa aaaagagctg ttcatgttgt taccaccacc      120
aatgttggtg ttgtcactat tggtaatggt gatcaaacta ccacttttgc tgctccatct      180
gtagctgctg aatctagtgt tagtgtttct gtcaacactg aaccacctca aaatcatcca      240
actactactc aagatgttgc ttctgcttct acttatccat cttccactga tggttctgcc      300
gcttcttctt ctgctgccgc ttcttcgtct tctcaagctg gttctgaacc ttctggtggt      360
gttggatctg gtggtgctaa aggtattact tattctccat acagtgacaa tggtggtatgt      420
aaatcagaat ctcaaattgc cagtgaatg gctcaattat ctggatttga tggtattcgt      480
ttatacgggg ttgattgtag tcaagttgaa gctgttttaa aagctaaaac ttcattctcaa      540
aaaattttcg ctggtatttt cgatgtttct agtattacat ctggtattga aagtttagct      600
gaagccggtt aaagttgcgg tagttgggat gatatttaca ctgtctctat tggtaatgaa      660
ttggttaatg ctggttctgc cactccaagt caaattaaag cttatgttga agaaggtaga      720
aaagctttta aagctgctgg ttacactggt ccagttgttt ctgttgatac ttttattgct      780
gttattaaca acccagattt atgtgattac tctgattaca tggctgttaa tgctcatgct      840
ttctttgatg gtcacgttgt tgctgaaaac tctggtgctt gggctcttga acaaatccaa      900
agagtttgga ctgcttgctg tggtaaaaag aatgttttaa ttactgaaac tggttggcca      960
tctagaggtg attctaattg tgctgccgtt ccatctaaga gtaaccaaca agctgctatc     1020
agttctatta aatcttcttg tggtgccctt gctatattat tctactgctt caatgacctt     1080
tggaaggccg atggtccata caatgctgaa aaatactggg gtatttactc taactaa      1137

```

10

<210> 10

<211> 378

<212> PRT

15 <213> *Candida albicans*

<220>

<221> MISC_FEATURE <222> (1)..(378)

20 <223> Manoproteína 65

<400> 10

Met Leu Phe Lys Ser Phe Val Thr Phe Thr Val Leu Ala Asn Ala Leu

ES 2 777 205 T3

1		5		10		15									
Ala	Ala	Pro	Leu	Ala	His	Gln	His	His	Gln	His	Lys	Glu	Glu	Lys	Arg
			20					25					30		
Ala	Val	His	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Asn	Val	Val	Val	Val	Thr	Ile	Gly
		35					40					45			
Asn	Gly	Asp	Gln	Thr	Thr	Thr	Phe	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Glu
	50					55					60				
Ser	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Val	Asn	Thr	Glu	Pro	Pro	Gln	Asn	His	Pro
65					70					75					80
Thr	Thr	Thr	Gln	Asp	Val	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Thr
				85					90					95	
Asp	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln
			100					105					110		
Ala	Gly	Ser	Glu	Pro	Ser	Gly	Gly	Val	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Lys	Gly
		115					120					125			
Ile	Thr	Tyr	Ser	Pro	Tyr	Ser	Asp	Asn	Gly	Gly	Cys	Lys	Ser	Glu	Ser
	130					135					140				
Gln	Ile	Ala	Ser	Glu	Ile	Ala	Gln	Leu	Ser	Gly	Phe	Asp	Val	Ile	Arg
145					150					155					160
Leu	Tyr	Gly	Val	Asp	Cys	Ser	Gln	Val	Glu	Ala	Val	Leu	Lys	Ala	Lys
				165					170					175	
Thr	Ser	Ser	Gln	Lys	Ile	Phe	Ala	Gly	Ile	Phe	Asp	Val	Ser	Ser	Ile
			180					185					190		
Thr	Ser	Gly	Ile	Glu	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Val	Lys	Ser	Cys	Gly	Ser
		195					200					205			
Trp	Asp	Asp	Ile	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Gly	Asn	Glu	Leu	Val	Asn	Ala
	210					215					220				
Gly	Ser	Ala	Thr	Pro	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Tyr	Val	Glu	Glu	Gly	Arg
225					230					235					240
Lys	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Val	Val	Ser	Val	Asp
				245					250					255	

ES 2 777 205 T3

Thr Phe Ile Ala Val Ile Asn Asn Pro Asp Leu Cys Asp Tyr Ser Asp
260 265 270

Tyr Met Ala Val Asn Ala His Ala Phe Phe Asp Gly His Val Val Ala
275 280 285

Glu Asn Ser Gly Ala Trp Val Leu Gln Gln Ile Gln Arg Val Trp Thr
290 295 300

Ala Cys Gly Gly Lys Lys Asn Val Leu Ile Thr Glu Thr Gly Trp Pro
305 310 315 320

Ser Arg Gly Asp Ser Asn Gly Val Ala Val Pro Ser Lys Ser Asn Gln
325 330 335

Gln Ala Ala Ile Ser Ser Ile Lys Ser Ser Cys Gly Ala Ser Ala Ile
340 345 350

Leu Phe Thr Ala Phe Asn Asp Leu Trp Lys Ala Asp Gly Pro Tyr Asn
355 360 365

Ala Glu Lys Tyr Trp Gly Ile Tyr Ser Asn
370 375

<210> 11

5 <211> 1137

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (1)..(1137)

<223> ScwI

15

<400> 11

```

atgttattca agtctttcgt tacttttact gtcttagcca atgctttggc tgctccatta      60
gctcatcaac atcatcaaca taaagaagaa aaaagagctg ttcattgttg taccaccacc      120
aatgttggtg ttgtcactat tggtaatggt gatcaaaacta ccacttttgc tgctccatct      180
gtagctgctg aatctagtgt tagtgtttct gtcaaacactg aaccacctca aaatcatcca      240
actactactc aagatgttgc ttctgcttct acttatccat cttccactga tggttctgcc      300
gcttcttctt ctgctgccgc ttcttcgtct tctcaagctg gttctgaacc ttctggtggt      360
gttgatctg gtggtgctaa aggtattact tattctccat acagtgacaa tggtggtatgt      420
aaatcagaat ctcaaattgc cagtgaatt gctcaattat ctggatttga tgttattcgt      480
ttatacgggg ttgattgtag tcaagttgaa gctgttttaa aagctaaaac ttcattctaa      540
aaaattttcg ctggtatttt cgatgtttct agtattacat ctggtattga aagtttagct      600

gaagccgtta aaagttgcgg tagttgggat gatatttaca ctgtctctat tggtaatgaa      660
ttggttaatg ctggttctgc cactccaagt caaattaaag cttatgttga agaaggtaga      720
aaagctttaa aagctgctgg ttacactggt ccagttgttt ctgttgatac ttttattgct      780
gttattaaca acccagattt atgtgattac tctgattaca tggctgttaa tgctcatgct      840
ttctttgatg gtcacgttgt tgctgaaaac tctggtgctt gggctcttgc acaaatccaa      900
agagtttgga ctgcttggtg tggtaaaaag aatgttttaa ttactgaaac tggttggcca      960
tctagagggt attctaattg tgcgcccgtt ccatctaaga gtaaccaaca agctgctatc     1020
agttctatta aatcttcttg tggcgctct gctatattat tcaactgctt caatgacctt     1080
tggaaggccg atggtccata caatgctgaa aaatactggg gtattttact taactaa      1137

```

<210> 12

<211> 378

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

10 <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(378)

<223> ScwI

<400> 12

ES 2 777 205 T3

Met	Leu	Phe	Lys	Ser	Phe	Val	Thr	Phe	Thr	Val	Leu	Ala	Asn	Ala	Leu
1				5					10					15	
Ala	Ala	Pro	Leu	Ala	His	Gln	His	His	Gln	His	Lys	Glu	Glu	Lys	Arg
			20					25					30		
Ala	Val	His	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Asn	Val	Val	Val	Val	Thr	Ile	Gly
		35					40					45			
Asn	Gly	Asp	Gln	Thr	Thr	Thr	Phe	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Glu
	50					55					60				
Ser	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Val	Asn	Thr	Glu	Pro	Pro	Gln	Asn	His	Pro
65					70					75					80
Thr	Thr	Thr	Gln	Asp	Val	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Thr
				85					90					95	
Asp	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln
			100					105					110		
Ala	Gly	Ser	Glu	Pro	Ser	Gly	Gly	Val	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Lys	Gly
		115					120					125			

ES 2 777 205 T3

Ile	Thr	Tyr	Ser	Pro	Tyr	Ser	Asp	Asn	Gly	Gly	Cys	Lys	Ser	Glu	Ser	130	135	140
Gln	Ile	Ala	Ser	Glu	Ile	Ala	Gln	Leu	Ser	Gly	Phe	Asp	Val	Ile	Arg	145	150	155
Leu	Tyr	Gly	Val	Asp	Cys	Asp	Gln	Val	Ser	Ala	Val	Leu	Lys	Ala	Lys	165	170	175
Thr	Ser	Ser	Gln	Lys	Ile	Phe	Ala	Gly	Ile	Phe	Asp	Val	Ser	Asn	Ile	180	185	190
Ala	Ser	Gly	Ile	Glu	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Val	Glu	Ala	Cys	Gly	Ser	195	200	205
Trp	Asp	Asp	Ile	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Gly	Asn	Glu	Leu	Val	Asn	Ala	210	215	220
Gly	Ser	Ala	Thr	Pro	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Tyr	Val	Asp	Glu	Gly	Arg	225	230	235
Lys	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Val	Val	Ser	Val	Asp	245	250	255
Thr	Phe	Ile	Ala	Val	Ile	Asn	Asn	Pro	Glu	Leu	Cys	Glu	Tyr	Ser	Asp	260	265	270
Tyr	Met	Ala	Val	Asn	Ala	His	Ala	Phe	Phe	Asp	Gly	His	Val	Ala	Ala	275	280	285
Glu	Asn	Ser	Gly	Pro	Trp	Val	Leu	Gln	Gln	Ile	Gln	Arg	Val	Trp	Thr	290	295	300
Ala	Cys	Ser	Gly	Lys	Lys	Asn	Val	Leu	Ile	Thr	Glu	Thr	Gly	Trp	Pro	305	310	315
Ser	Lys	Gly	Asp	Ser	Asn	Gly	Leu	Ala	Val	Pro	Ser	Lys	Ser	Asn	Gln	325	330	335
Gln	Ala	Ala	Ile	Ser	Ser	Ile	Lys	Ser	Ser	Cys	Gly	Ala	Ser	Ala	Leu	340	345	350
Leu	Phe	Thr	Ala	Phe	Asn	Asp	Leu	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Pro	Tyr	Asn	355	360	365
Ala	Glu	Lys	Tyr	Trp	Gly	Ile	Tyr	Ser	Asn									

370

375

<210> 13
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> péptido
 <400> 13

Ser Thr Asp Glu Pro Ala Gly Glu Ser Ala
 1 5 10

15
 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> péptido
 <400> 14

25
 Leu Ser Arg Glu Met
 1 5

<210> 15
 <211> 6
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 35
 <400> 15

Leu Lys Val Ile Arg Lys
 1 5

40 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> péptido
 <400> 16

Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Met Ile Glu
 1 5 10

50
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

 <400> 17
 5 caaggtgaaa cagaggaagc t 21

 <210> 18
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 18

 tcaagcagga atgtttggag tagt 24

 20 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 19

 30 atgtcttacg ccactaaaat ccacgc 26

 <210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 40 <400> 20

 ttacaattga gaagcctttt ggaaatcttt ac 32

 <210> 21
 45 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> cebador

 <400> 21

 gctcatcaac atcatcaaca t 21
 55
 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> cebador

<400> 22

ttagttagag taaatacccc agta 24

5 <210> 23
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 23

15 atggctctc cagcagttt a 21

<210> 24
<211> 21
<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

25 <400> 24

ttacaattgt ccttggtgt g 21

<210> 25
30 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> cebador

<400> 25

gatgcaccaa tctcaactga c 21

40 <210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> cebador

<400> 26

50 ttaaccttga ggagcagtag aagc 24

<210> 27
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

60 <400> 27

atggctgacg caaaagttga a 21

<210> 28

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 28

ttaatcaact tctccatag c 21

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar la candidiasis invasiva (CI) en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) detectar el nivel de un glicano de *Candida* que es un manano en una muestra de sangre, plasma o suero del sujeto;
- b) detectar el nivel de anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1) y manoproteína 65 (Mp65) en la misma muestra de sangre, plasma o suero del sujeto o en otra muestra de sangre, plasma o suero obtenida secuencialmente del mismo paciente, esencialmente simultáneamente o con una separación de no más de 3 horas; y
- c) donde se realiza un análisis combinado del nivel de dicho glicano de *Candida* y el nivel de anticuerpo dirigido contra dicha proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65, calculando el nivel de un marcador virtual $Z = \sum a_i \times [\text{Marcador}_i]$, donde $[\text{Marcador}_i]$ son niveles individuales de marcador de glicano de *Candida* y de anticuerpo dirigido contra dicha proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65, y a_i son coeficientes cuyos valores se determinan para maximizar el área bajo la curva (AUC) de la curva de característica operativa relativa (ROC) para la combinación de Marcador_i; y
- d) donde si el nivel del marcador virtual Z calculado en la etapa c) es más alto que un nivel de referencia del marcador virtual Z, entonces el sujeto está desarrollando o ha desarrollado candidiasis invasiva.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde en la etapa b) se detecta la presencia o el nivel de anticuerpos contra Fba1, o anticuerpos contra Eno1, o anticuerpos contra Hsp90, o anticuerpos contra Hwp1, o anticuerpos contra Mp65.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde dicho procedimiento no comprende detectar un anticuerpo dirigido contra manano.

4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho glicano de *Candida* y/o dichos anticuerpos dirigidos contra una proteína seleccionada del grupo que consiste en Fba1, Eno1, Hsp90, Hwp1 y Mp65 se detectan mediante un inmunoensayo.

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de glicano de *Candida* que se determina es el nivel de manano, solamente.

6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el manano se detecta mediante un inmunoensayo enzimático tipo sándwich que usa, como anticuerpos de captura y detección, un anticuerpo que reconoce secuencias de oligomanosas enlazadas a α formadas por más de cuatro residuos.

7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho nivel de referencia del marcador virtual Z es un valor único o un intervalo de valores determinados basados en el nivel de dicho glicano de *Candida* o el nivel de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de *Candida*, según corresponda, medido en una población de sujetos sanos, en una población de sujetos infectados superficialmente con una cepa de *Candida*, en una población de sujetos que padecen candidiasis invasiva o en una muestra del mismo sujeto obtenida en un punto de tiempo anterior.

8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la candidiasis invasiva se debe a la infección con una especie de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Geotrichum capitatum* y *Candida norvegensis*.

9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde en la etapa b) se detecta el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Fba1.

10. El procedimiento según la reivindicación 9, donde el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Fba1 se detecta usando un polipéptido que comprende:

- a) SEQ ID NO:2;
- b) un fragmento epitópico del polipéptido de secuencia SEQ ID NO:2, que consiste en un tramo de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:2 y comprende uno o más epítomos de dicho polipéptido de secuencia SEQ ID NO:2; o
- c) un polipéptido variante del polipéptido definido en a) o b), donde dicho polipéptido variante tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido definido en a) o b), en toda la longitud del polipéptido definido en a) o b) y donde dicho polipéptido variante conserva la capacidad de unirse a todos los anticuerpos que se unen al polipéptido definido en a) o b).

11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde en la etapa b) se detecta el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Eno1.

5 12. El procedimiento según la reivindicación 11, donde el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Eno1 se detecta usando un polipéptido que comprende:

a) SEQ ID NO:4;

10 b) un fragmento epitópico del polipéptido de secuencia SEQ ID NO:4, que consiste en un tramo de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:4 y comprende uno o más epítomos de dicho polipéptido de secuencia SEQ ID NO:4; o
c) un polipéptido variante del polipéptido definido en a) o b), donde dicho polipéptido variante tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido definido en a) o b), en toda la longitud del polipéptido definido en a) o b), y donde dicho polipéptido variante conserva la capacidad de unirse a todos los anticuerpos que se unen al polipéptido definido en a) o b).

15 13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde en la etapa b) se detecta el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Hsp90.

14. El procedimiento según la reivindicación 13, donde el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida*
20 Hsp90 se detecta usando un polipéptido que comprende:

a) SEQ ID NO:6;

25 b) un fragmento epitópico de un polipéptido de secuencia SEQ ID NO:6, que consiste en un tramo de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:6 y comprende uno o más epítomos de dicho polipéptido de secuencia SEQ ID NO:6;
c) aminoácidos en las posiciones 313 a 707 de la SEQ ID NO:6;
d) una secuencia SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, o SEQ ID NO:16; o
e) un polipéptido variante del polipéptido definido en a), b), c), o d), donde dicho polipéptido variante comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido definido en a) o b), en toda la longitud del polipéptido definido en a), b), c) o d), y donde dicho polipéptido variante conserva la capacidad de unirse a todos los anticuerpos que se unen al polipéptido definido en a), b), c), o d).

15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde en la etapa b) se detecta el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Hwp1.

35 16. El procedimiento según la reivindicación 15, donde el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Hwp1 se detecta usando un polipéptido que comprende:

a) SEQ ID NO:8;

40 b) un fragmento epitópico de un polipéptido de secuencia SEQ ID NO:8, que consiste en un tramo de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:8 y comprende uno o más epítomos de dicho polipéptido de secuencia SEQ ID NO:8;
c) aminoácidos en las posiciones 41 a 200 o en las posiciones 27 a 203 de SEQ ID NO:8; o
d) un polipéptido variante del polipéptido definido en a), b), o c) donde dicho polipéptido variante tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido definido en a) o b), en toda la longitud del polipéptido definido en a), b), o c), y donde dicho polipéptido variante conserva la capacidad de unirse a todos los anticuerpos que se unen al polipéptido definido en a), b), o c).

17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde en la etapa b) se detecta el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Mp65.

50 18. El procedimiento según la reivindicación 17, donde el nivel de anticuerpos dirigidos contra *Candida* Mp65 se detecta usando un polipéptido que comprende:

a) SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12;

55 b) un fragmento epitópico de un polipéptido de secuencia SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12, que consiste en un tramo de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:8 y comprende uno o más epítomos de dicho polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 8, o que consiste en un tramo de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 12 y comprende uno o más epítomos de dicho polipéptido de secuencia SEQ ID NO:12; o
c) un polipéptido variante del polipéptido definido en a) o b), donde dicho polipéptido variante tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido definido en a) o b), en toda la longitud del polipéptido definido en a) o b), y donde dicho polipéptido variante conserva la capacidad de unirse a todos los anticuerpos que se unen al polipéptido definido en a) o b).

19. Un procedimiento para determinar un régimen de tratamiento en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:

65

- a) diagnosticar si el sujeto presenta candidiasis invasiva llevando a cabo el procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y
- b) si el sujeto es diagnosticado con candidiasis invasiva, determinar un tratamiento antifúngico para dicho sujeto.

5 20. El procedimiento según la reivindicación 19, donde dicho tratamiento antifúngico puede ser un tratamiento con equinocandinas, anfotericina B o derivados de azol antifúngicos.

21. Un kit que comprende:

- 10 a) un anticuerpo como se define en la reivindicación 6, para determinar la presencia o nivel de un glicano de *Candida* que es manano; y
- b) un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10, 12, 14, 16 y 18, para determinar la presencia o nivel de anticuerpos dirigidos contra una proteína de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), enolasa 1 (Eno1), proteína de choque térmico 90 (Hsp90), proteína de pared de la hifa (Hwp1) y manoproteína 65 (Mp65).
- 15

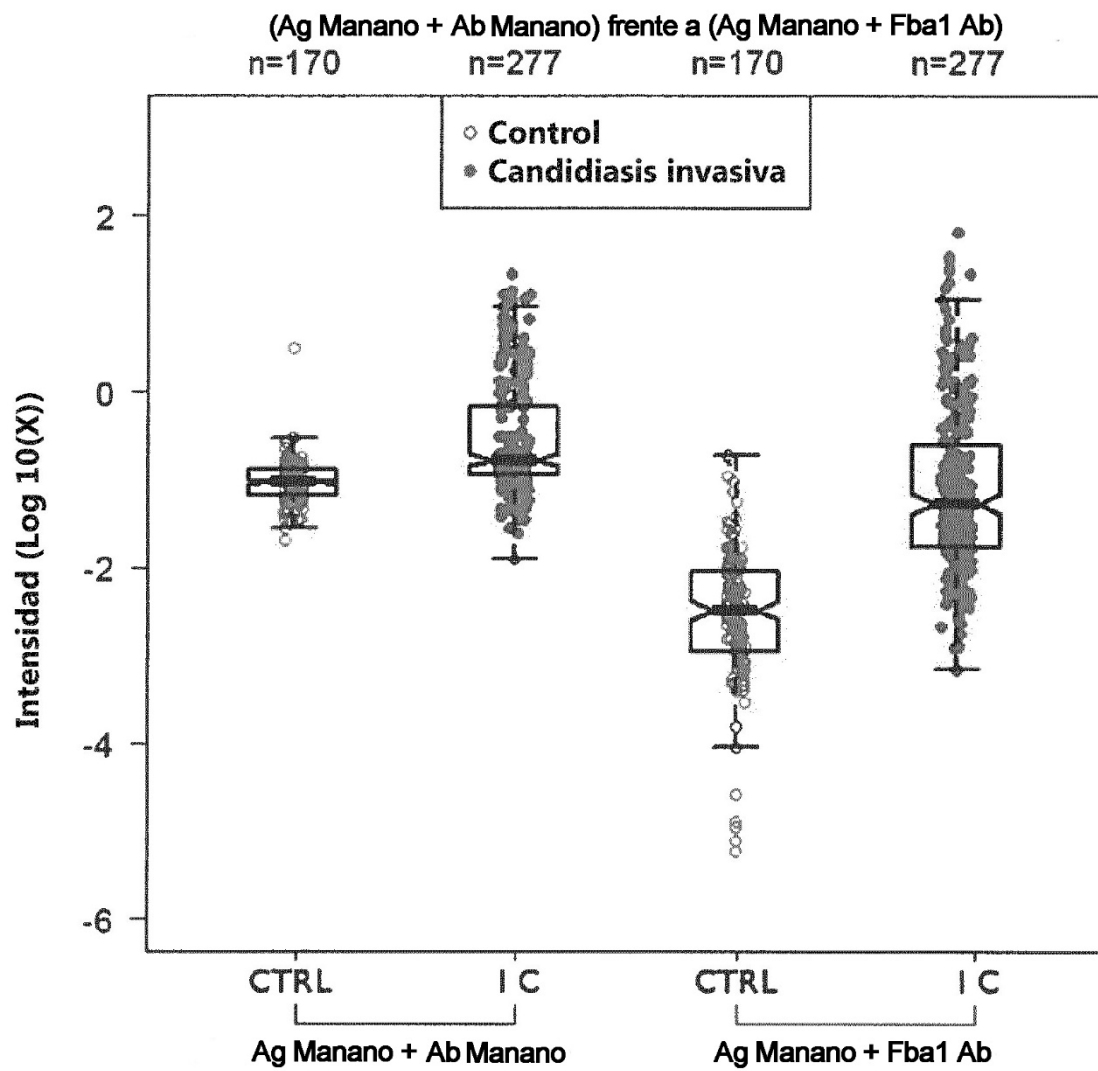


FIG.1

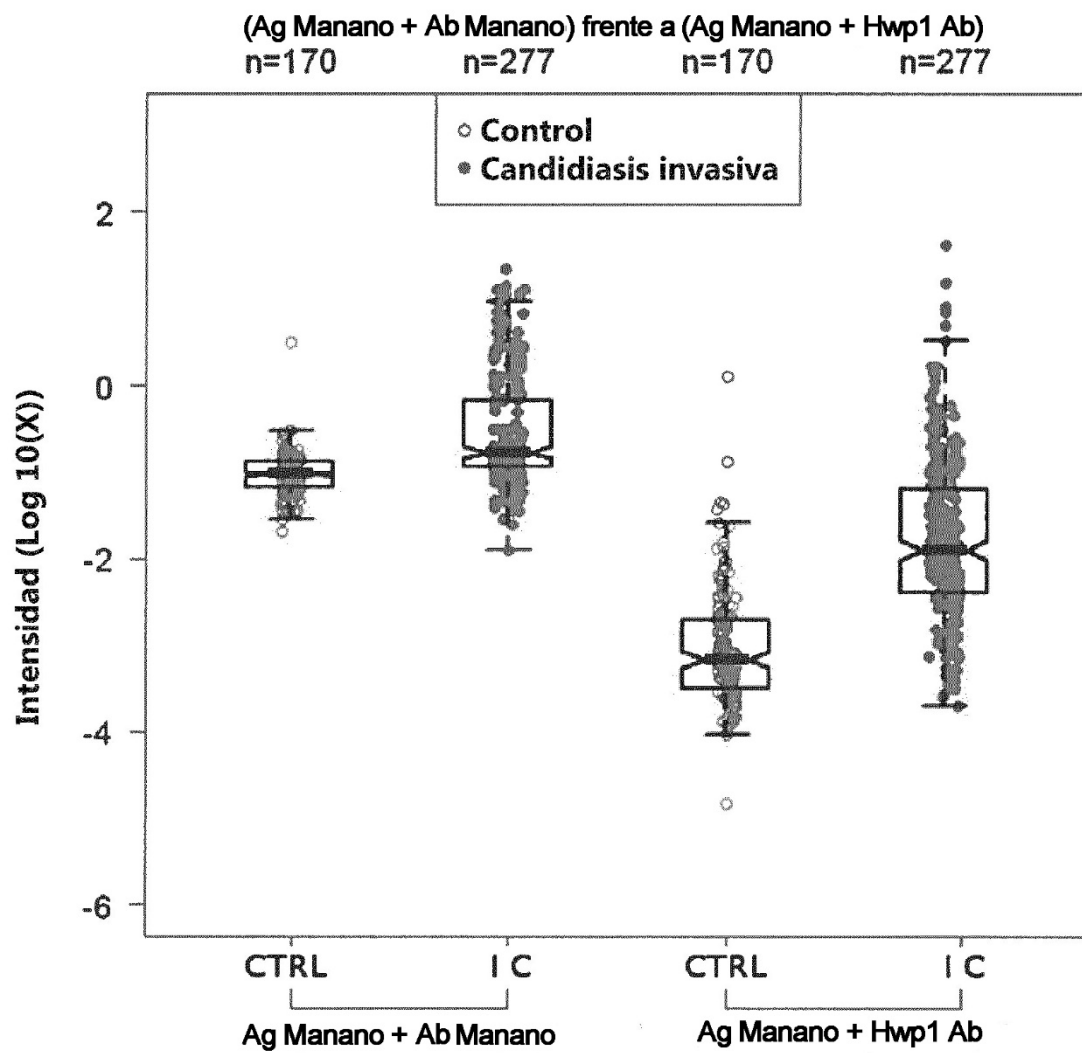


FIG.2

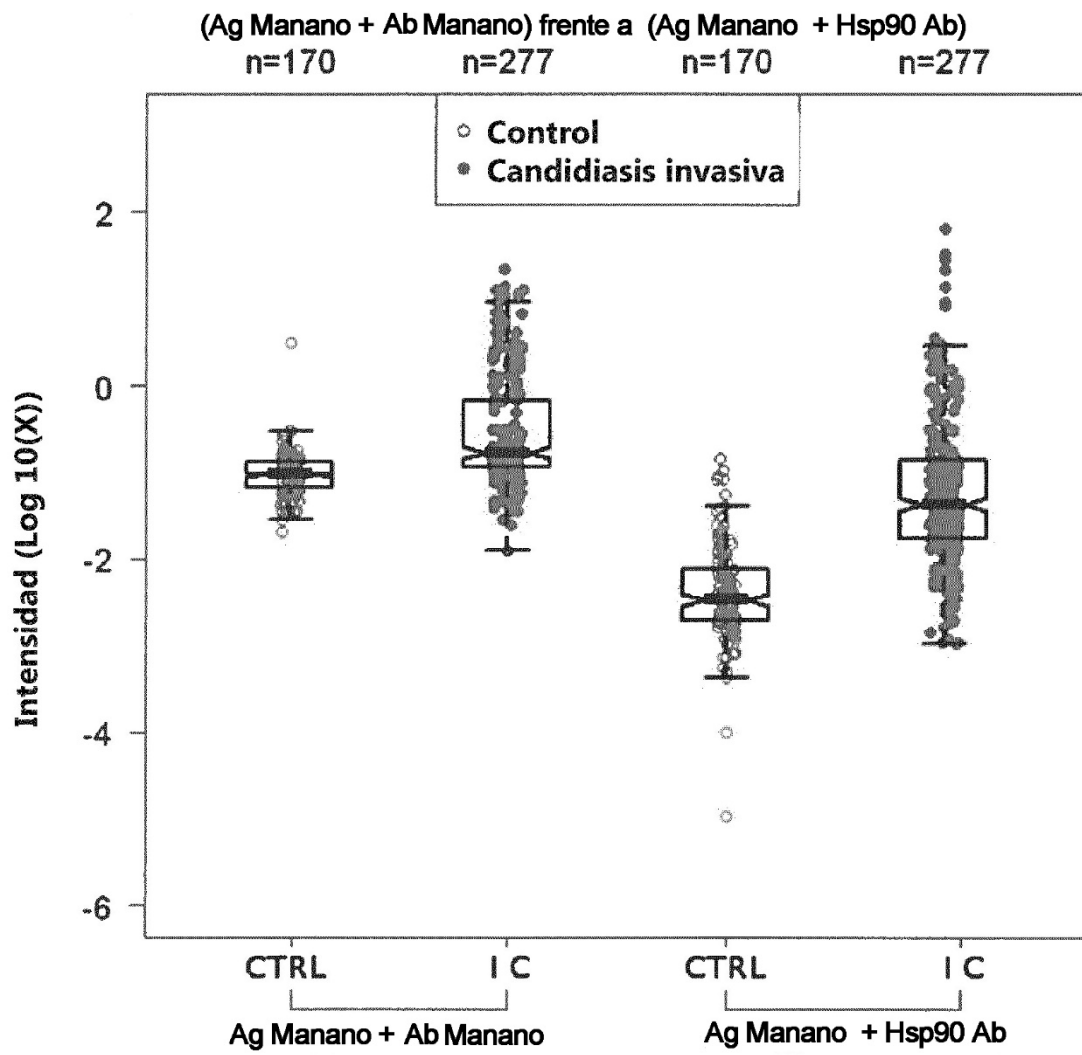


FIG.3

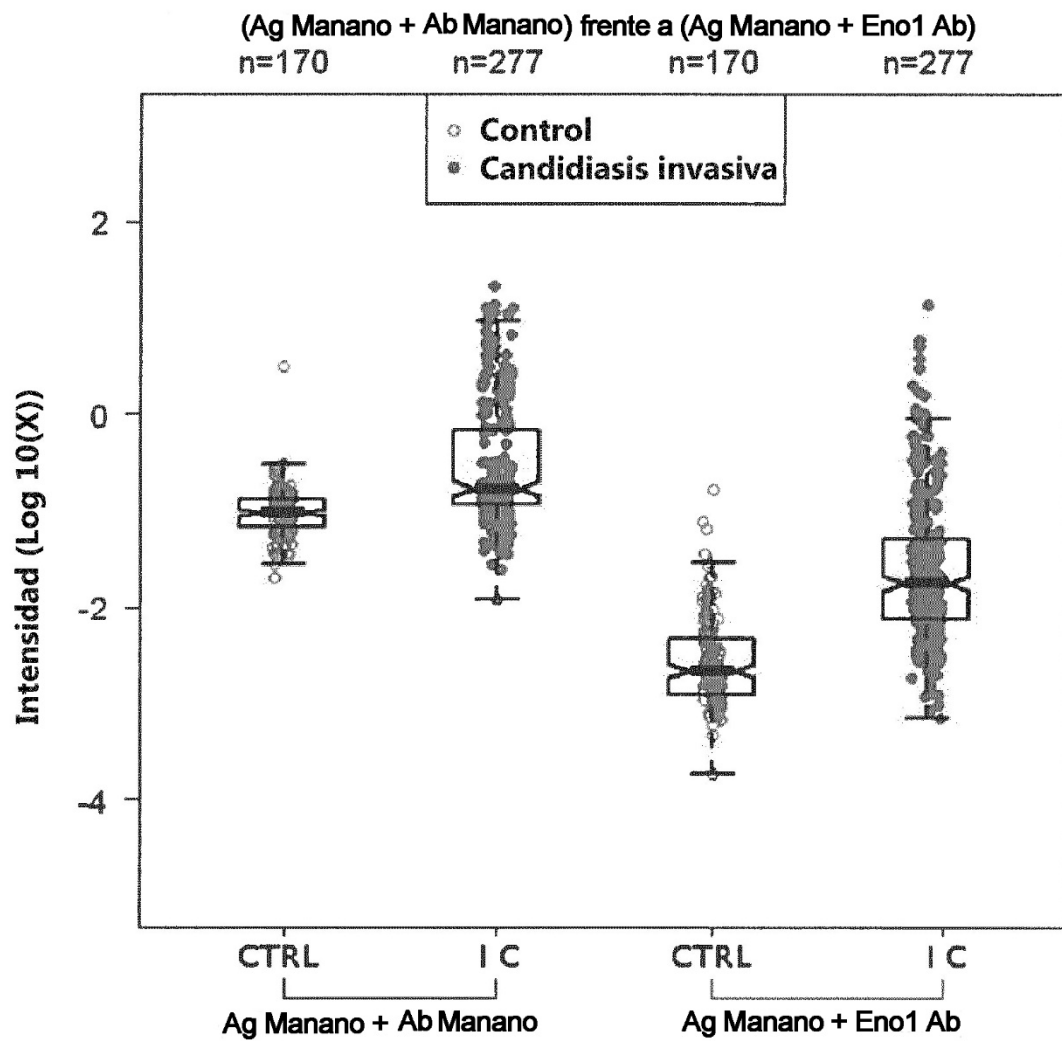


FIG.4

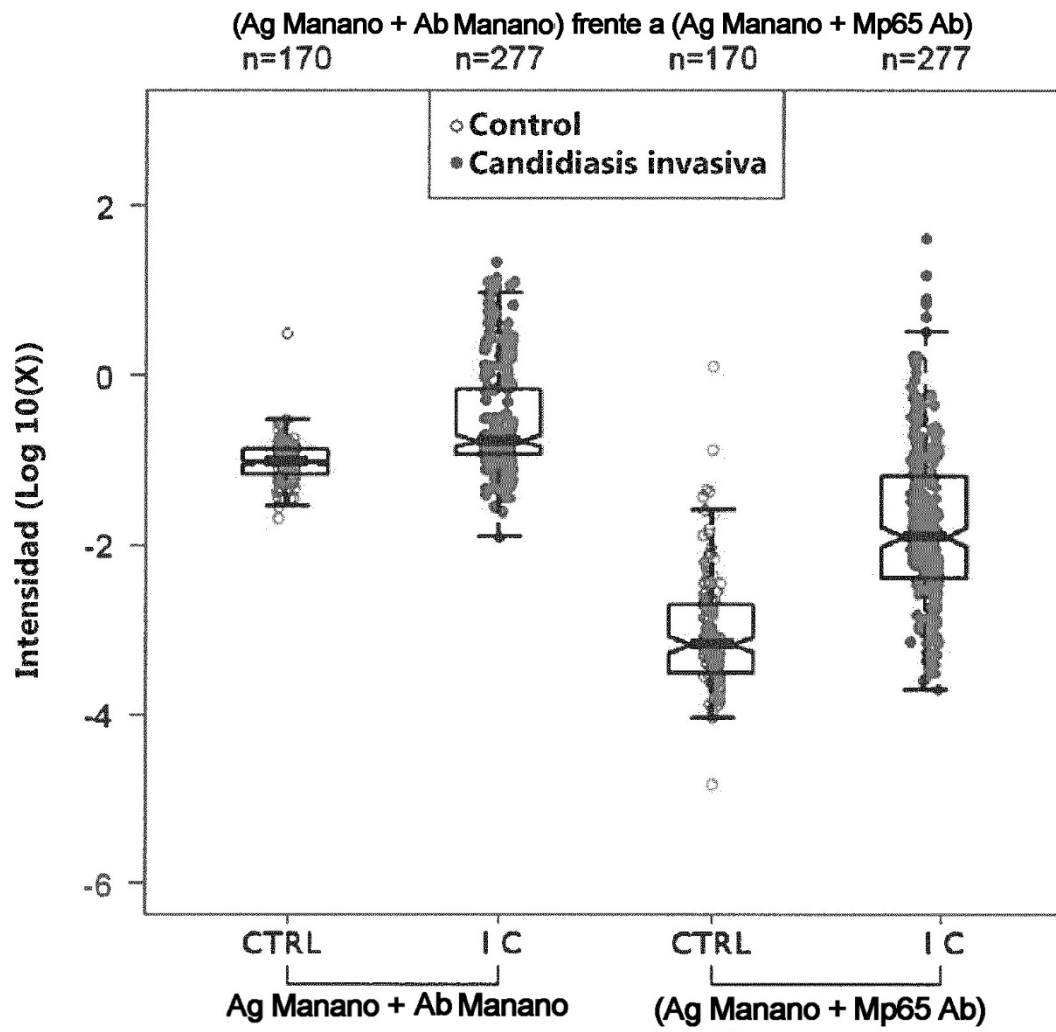


FIG.5

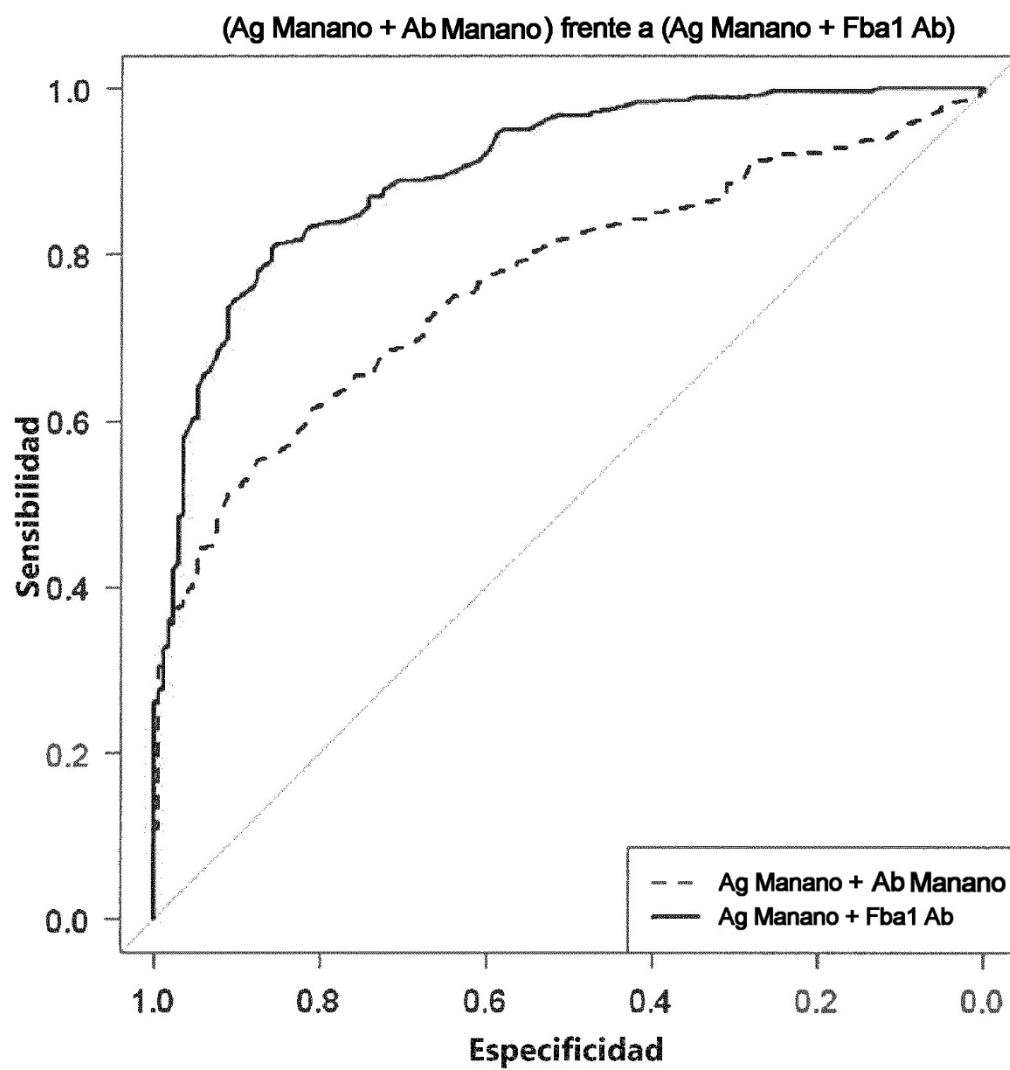


FIG.6

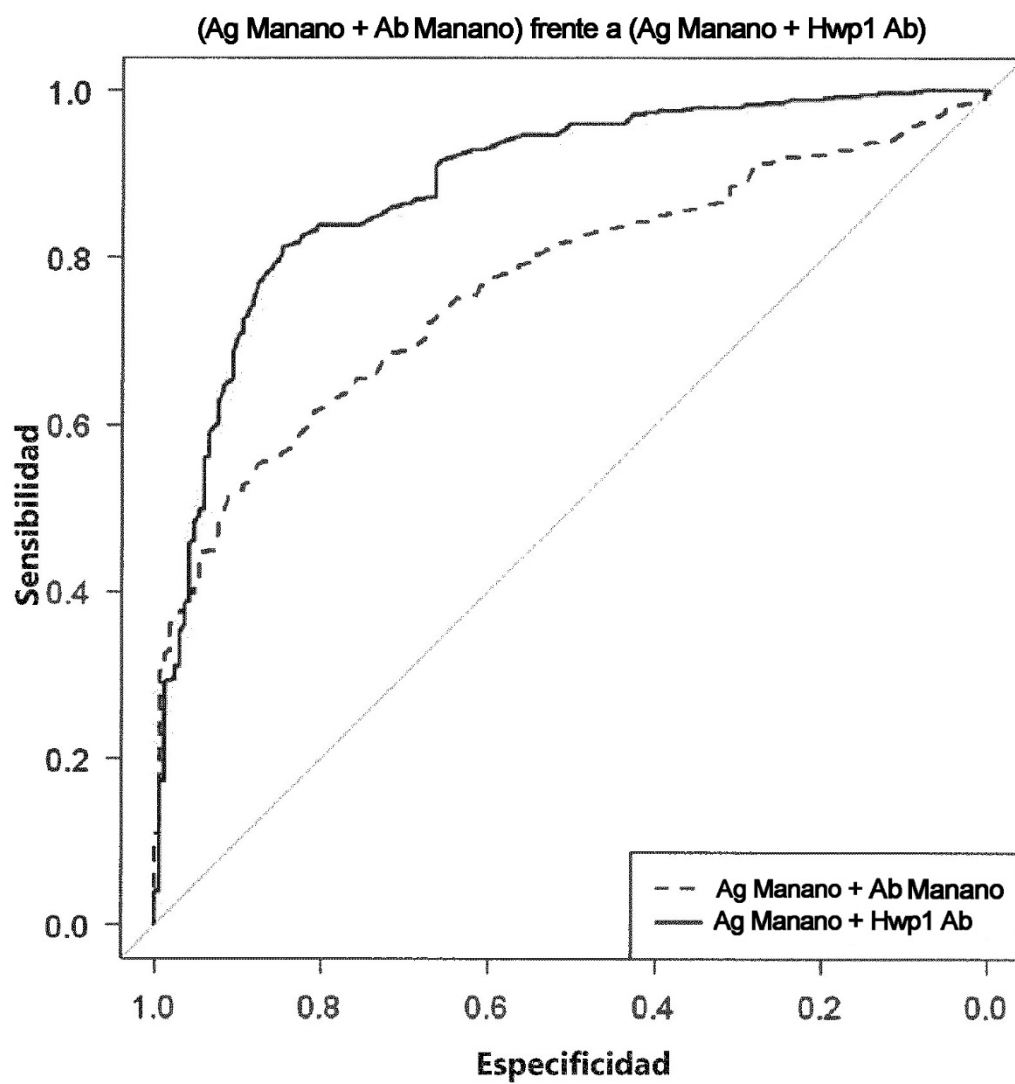


FIG.7

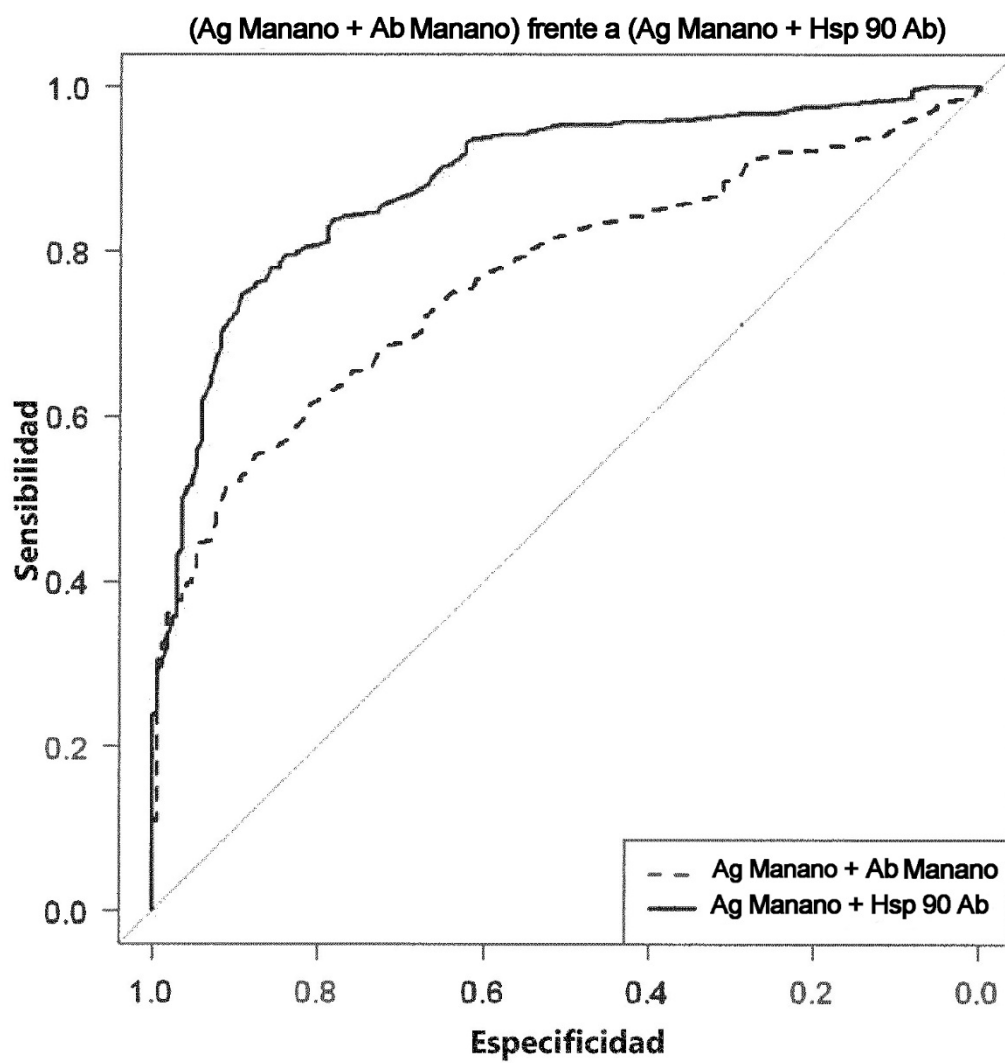


FIG.8

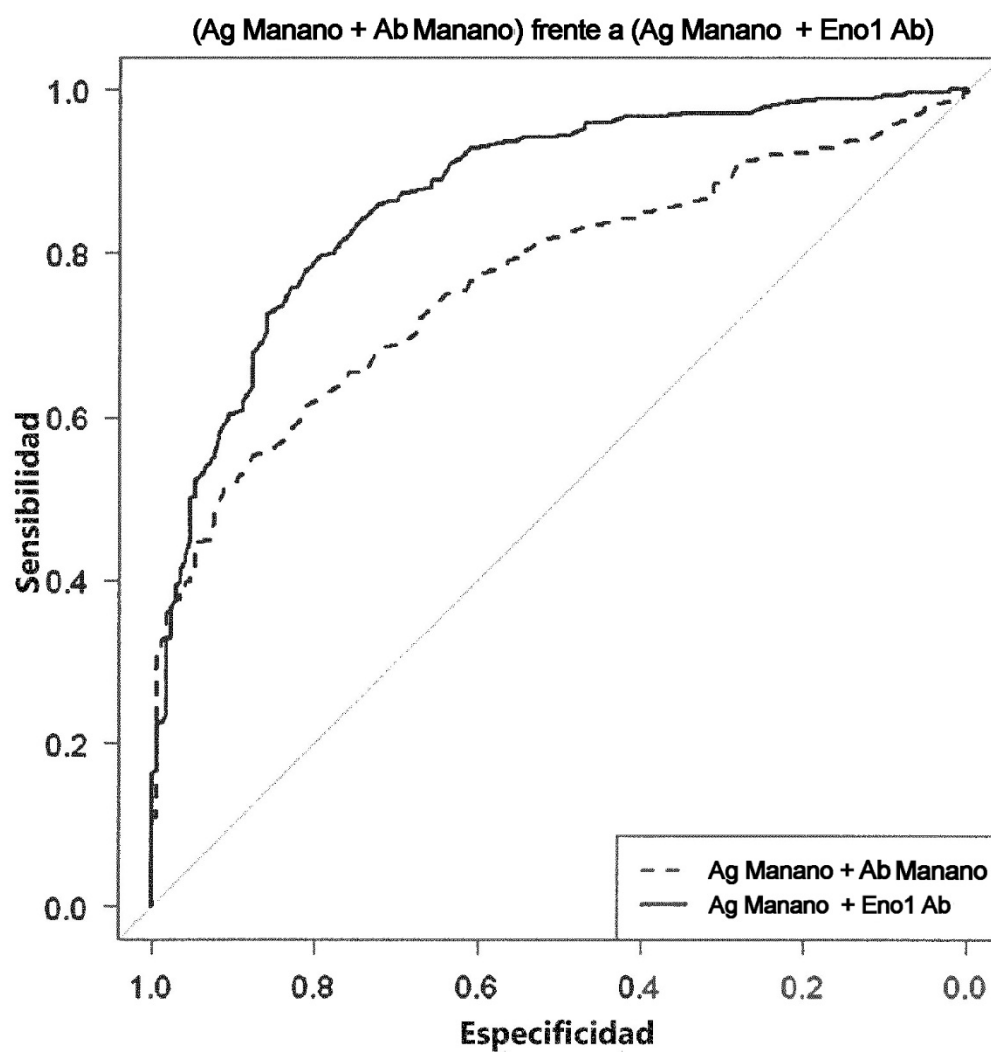


FIG.9

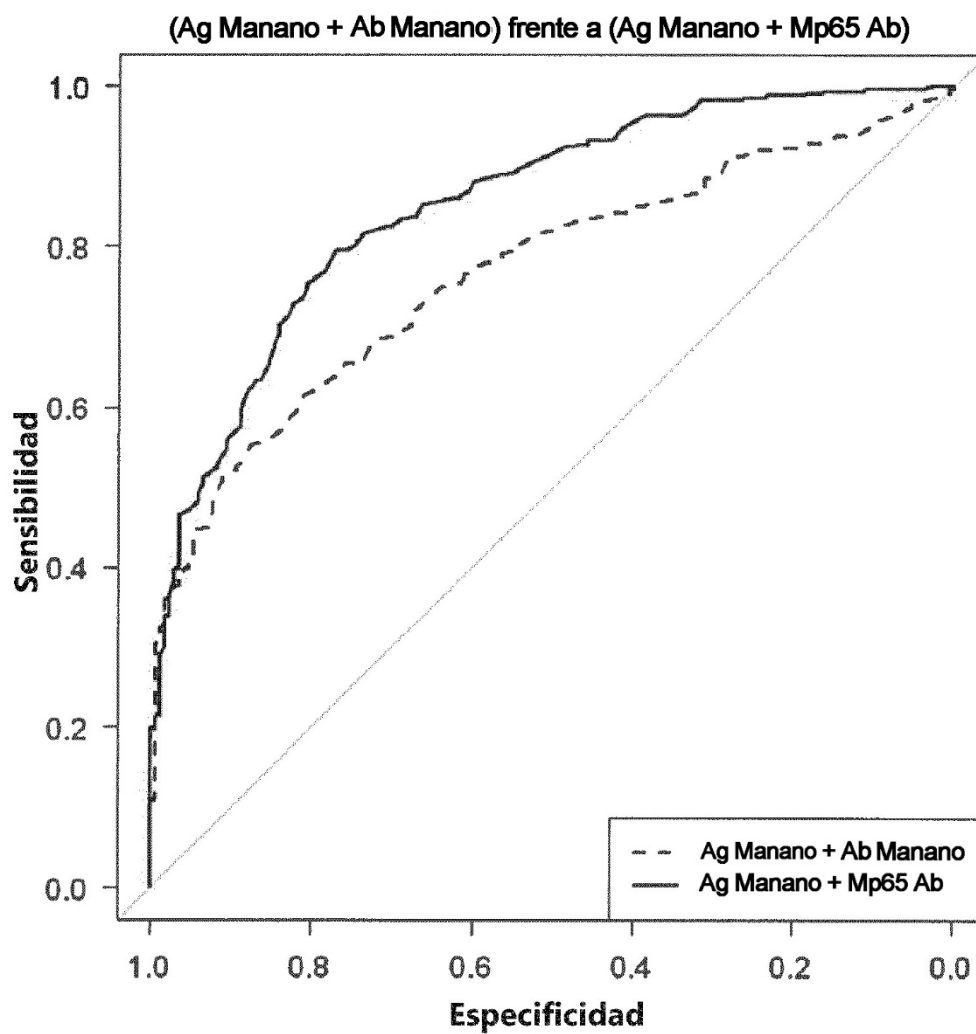


FIG.10