(11) **MX 2014012842 A**

IMPI
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(12) **SOLICITUD de PATENTE**

(43) Fecha de publicación: **06/05/2015**

(22) Fecha de presentación: **23/10/2014**
(21) Número de solicitud: **2014012842**

(51) Int. Cl:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

(30) Prioridad(es): **24/10/2013 US 61/894,974**

(71) Solicidante:
INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
Camino a la Presa San Jose No. 2055 78216 SAN LUIS POTOSI San Luís Potosí MX

(72) Inventor(es):
IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO
Francisco de P. Mariel 220 SAN LUIS POTOSI San Luís Potosí 78233 MX
ALEJANDRO DE LAS PEÑAS NAVA

(74) Representante:
NORMA ISABEL GARCIA CALDERON
Camino a la Presa San José No. 2055 San Lusis Potosí San Luís Potosí 78216 MX

(54) Título: **OLIGONUCLEOTIDOS DE CANDIDA PARAPSILOSIS, METODO DE DETECCION Y KIT DE LOS MISMOS.**

(54) Title: **OLIGONUCLEOTIDES OF CANDIDA ALBICANS, , DETECTION METHOD AND KIT COMPRISING SAME.**

(57) Resumen

La invención describe un método in vitro para la identificación de Candida parapsilosis, las secuencias asociadas a dicha identificación, así como kits de diagnóstico para identificar Candida parapsilosis.

(57) Abstract

The invention relates to an in vitro method for the identification of Candida albicans, the sequences associated with said identification, and diagnostic kits for identifying Candida albicans.

OLIGONUCLEOTIDOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS*, METODO DE DETECCION Y KIT DE LOS MISMOS.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología, especialmente a métodos para detectar enfermedades infecciosas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La incidencia de infecciones hospitalarias por patógenos fúngicos oportunísticos se ha incrementado substancialmete en las últimas dos décadas, especialmente entre pacientes inmunosuprimidos o con enfermedades subyacentes graves. Las *Candidas* son los patógenos fúngicos más comunes que afectan a humanos. Diversos estudios epidemiológicos alrededor del mundo reportan que las infecciones invasivas con *Candidas* se han incrementado. Por lo tanto, por ejemplo el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) está requiriendo métodos sensibles, específicos y de rápida detección para este tipo de hongos.

Aún cuando se conocen más de 100 especies de *Candida*, solo cuatro son responsables de aproximadamente el 95% de infecciones hematológicas y 95-97% de infecciones invasivas causadas por *Candida* en hospitales norteamericanos.

En el caso de infecciones hematológicas las especies más frecuentes son: *Candida albicans* (45.6%), *Candida glabrata* (26%), *Candida parapsilosis* (15.7%) y *Candida tropicalis* (8.1%). Estas proporciones varían dependiendo de la condición del paciente, pero son las mismas cuatro especies causantes del 95% de todas las candidiasis.

Los métodos de detección actuales son imprecisos y requiere varios días para determinar el tipo de *Candida* en muestras biológicas. Esto provoca que el tratamiento del paciente sea inadecuado y la mortalidad en hospitales se incrementa sí como los costos de cuidado sanitario. Los métodos de detección moleculares basados en secuencias de ITS o rADN generalmente tienen una alta incidencia de resultados falsos positivos o negativos debido a la relación filogenética cercana entre las diferentes especies de *Candida*. Asimismo, se requiere análisis posteriores, dado que las secuencias de ITS o rADN son de tamaño similar y deben ser resecuenciadas antes de proveer un resultado final. (Chang Chang, H., et al., 2001. J. Clin. Microbiol., 39:3466-3471, el cual señala que C. *parapsilosis* es difícil de diferenciar con respecto a C. *tropicalis*). Ejemplos de este tipo de invenciones son divulgadas en EP2315853B1, US2008305487A1, JP2012120535A, US20100311041A1, CA2136206A1, las cuales se incorporan solo como referencia y no deben ser consideradas como estado de la técnica para la presente invención. C. *parapsilosis* también ha sido detectada

con PCR a partir de fragmentos del gen FKS1 (García-Effron, et al., J. Clin Microbiol. 2011, Vol. 49:3257-3261). Este método requiere sin embargo el paso subsecuente de digestión con EcoRI. Un método adicional es polimorfismo de longitud de fragmento de restricción con alcohol deshidrogenasa secundaria tal como lo describe Tavanti et al. (Tavanti et al., 2005, J Clin Microbiol. 43:284-292)

Por lo tanto, existe una necesidad para el diagnóstico rápido y específico de *Candida parapsilosis,* dado que los métodos actuales necesitan análisis posterior (tales como resecuenciación o digestión enzimática) o no pueden diferenciar entre otras especies de *Candida*.

Se han reportado diversas especies de *Candida* que tienen rearreglos cromosomales que pueden causar la pérdida de material genético. (Butler, G., et al, Nature 459(7247):657-662 (2009)). Esto se puede asociar con variaciones en el diagnóstico molecular, dado que la secuencia blanco puede variar o perderse.

En virtud de lo anterior, la presente invención describe un método in vitro para detectar e identificar *Candida parapsilosis*, con al menos un oligonucleótido específico, así como con un set multiplex en bloque de oligonucleótidos específicos, lo cual permite la identificación de *Candida parapsilosis* en muestras clínicas de diferentes subgrupos de población.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención describe y reclama oligonucleótidos para la identificación específica de *Candida parapsilosis*, que consisten de un ácido nucleico que tiene al menos un 90% de homología en secuencia con una de las SEQ ID Nos. 1 a 4 o un complemento de las mismas.

En una modalidad adicional, se describe además un método in vitro para la identificación específica de *C. parapsilosis*, que comprende los pasos de: a)amplificar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica con al menos un oligonucleótido como se definió anteriormente; y b) identificar los fragmentos de ADN amplificados; en donde en una modalidad específica la amplificación de fragmentos de ADN es llevada a cabo con al menos un par de oligonucleótidos o al menos dos pares de oligonucleótidos.

En una modalidad adicional, se describe un kit para la identificación específica de *Candida parapsilosis*, que comprende al menos un oligonucleótido como se mencionó anteriormente, en donde en una modalidad específica, dicho kit comprende al menos un par de oligonucleótidos o al menos dos pares de oligonucleótidos, en donde dichos oligonucleótidos están en una composición con un vehículo aceptable apropiado.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Gel de agarosa al 2% que muestra la amplificación de ADN ribosomal de múltiples especies de *Candida* utilizando los

oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4. *C. glabrata* fue usada como control positivo (BG14). Para la electroforesis, se utilizó 1/5 del volumen total (2ul) del producto de amplificación de PCR de todas las muestras y productos. Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene); Carril 2: control positivo *C. glabrata*; Carril 3: control negativo sin ADN; Carril 4: *C. glabrata*; Carril 5: *C. albicans*; Carril 6: *C. tropicalis*, Carril 7: *C. parapsilosis*; Carril 8: *C. bracarensis* 1; Carril 9: *C. bracarensis* 2; Carril 10: *C. bracarensis* 3; Carril 11: *C. bracarensis* 4; Carril 12 *C. bracarensis* 5; Carril 13: *C. bracarensis* 6; Carril 14: *C. bracarensis* 7; Carril 15: *C. dubliniensis* 1; Carril 16: *C. dubliniensis* 2; Carril 17: *C. guillermondii*; Carril 18: *C. krusei* 1; Carril 19: *C. krusei* 2 y Carril 20: marcador de peso molecular.

Figura 2: Gel de agarosa al 2% mostrando el gradiente de temperatura para la detección de *C. parapsilosis* (cepa de aislado clínico Cp20), utilizando el par de oligonucleótidos Cp1. Las bandas inespecíficas para *C. dubliniensis* y *C. krusei* desaparecen al aumentar la temperatura de alineamiento, para este par de oligonucleótidos, la temperatura óptima es de 62.0°C. Para la electroforesis, las muestras corrieron a una concentración 4 veces más alta que aquella utilizada en los controles. La banda de amplificación para *C. parapsilosis* tiene una longitud de 311 bp. PANEL A: Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene); Carriles 2-8 Temperatura de

alineamiento 60°C: 2: control positivo *C. parapsilosis*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. albicans* 5: *C. glabrata* 6: *C. dubliniensis* 7: *C. guillermondii*, 8. *C. krusei*. Carriles 9-15 temperatura de alineamiento 60.8°C: 9 :control positivo *C. parapsilosis*; 10: control negativo sin ADN; 11: *C. albicans* 12: *C. glabrata* 13: *C. dubliniensis* 14: *C. guillermondii*, 15. *C. krusei*. Carriles 16-19 temperatura de alineamiento 61.9°C: 16: control positivo *C. parapsilosis*; 17: control negativo sin ADN; 18: *C. albicans* 19: *C. glabrata*. 20: marcador de peso molecular. Panel B: 1: marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder Invitrogene); Carriles 2-4 Temperatura de alineamiento 61.9°C: 2: *C. dubliniensis* 3: *C. guillermondii*, 4. *C. krusei*. Carriles 5-11 Temperatura de alineamiento 63.2°C: 5:control positivo *C. parapsilosis*; 6: control negativo sin ADN; 7: *C. albicans* 8: *C. glabrata* 9: *C. dubliniensis* 10: *C. guillermondii*, 11. *C. krusei*. Carriles 12- 18 Temperatura de alineamiento 65°C: 12: control positivo *C. parapsilosis*; 13: control negativo sin ADN; 14: *C. albicans* 15: *C. glabrata* 16: *C. dubliniensis* 17: *C. guillermondii*, 18. *C. krusei*. Carriles 19-20 Temperatura de alineamiento 66.5°C. 19: Control positivo *C. parapsilosis*; 20: control negativo sin ADN. Panel C: Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder Invitrogene); Carriles 2-6 Temperatura de alineamiento 66.5°C: 2: *C. albicans* 3: *C. glabrata* 4: *C. dubliniensis* 5: *C. guillermondii*, 6. *C. krusei*. Carriles 7-13 Temperatura de alineamiento 67.5°C: 7: control positivo *C. parapsilosis*; 8: control

negativo sin ADN; 9: *C. albicans* 10: *C. glabrata* 11: *C. dubliniensis* 12: *C. guillermondii*, 13. *C. krusei*. Carriles 14-20 Temperatura de alineamiento 68°C: 14: control positivo *C. parapsilosis*; 15: control negativo sin ADN; 16: *C. albicans* 17: *C. glabrata* 18: *C. dubliniensis* 19: *C. guillermondii*, 20. *C. krusei*.

Figura 3: Gel de agarosa al 2% mostrando el gradiente de temperatura para la detección de *C. parapsilosis* (cepa de aislado clínico Cp20), utilizando el par de oligonucleótidos Cp1. Las bandas inespecíficas para *C.glabrata*, *C.tropicalis* , *C. bracarensis* y *C. dubliniensis* desaparecen al aumentar la temperatura de alineamiento, para este par de oligonucleótidos, la temperatura óptima es de 68.4°C. Para la electroforesis, las muestras corrieron a una concentración 4 veces más alta que aquella utilizada en los controles. La banda de amplificación para *C. parapsilosis* tiene una longitud de 174 bp. PANEL A: marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder Invitrogene); Carriles 2-7 Temperatura de alineamiento 56°C: 2: control positivo con *C. parapsilosis*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. glabrata* 5: *C. tropicalis* 6: *C. bracarensis* 7: *C. dubliniensis*. Carriles 8-13 temperatura de alineamiento 57.1°C: 8:control positivo con *C. parapsilosis*; 9: control negativo sin ADN; 10: *C. glabrata* 11: *C. tropicalis* 12: *C. bracarensis* 13: *C. dubliniensis*. Carriles 14-19 temperatura de alineamiento 58.8°C: 14: control positivo con *C. parapsilosis*; 15: control negativo sin ADN; 16: *C.*

glabrata 17: *C. tropicalis* 18: *C. bracarensis* 19: *C. dubliniensis*. Carril 20: marcador de peso molecular. Panel B: Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2-7 Temperatura de alineamiento 60.8°C: 2: control positivo con *C. parapsilosis*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. glabrata* 5: *C. tropicalis* 6: *C. bracarensis* 7: *C. dubliniensis*. Carriles 8-13 temperatura de alineamiento 63.5°C: 8:control positivo con *C. parapsilosis*; 9: control negativo sin ADN; 10: *C. glabrata* 11: *C. tropicalis* 12: *C. bracarensis* 13: *C. dubliniensis*. Carriles 14-19 temperatura de alineamiento 65.7°C: 14:control positivo con *C. parapsilosis*; 15: control negativo sin ADN; 16: *C. glabrata* 17: *C. tropicalis* 18: *C. bracarensis* 19: *C. dubliniensis*. Carril 20: marcador de peso molecular. Panel C: Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2-7 Temperatura de alineamiento 67.2°C: 2: control positivo con *C. parapsilosis*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. glabrata* 5: *C. tropicalis* 6: *C. bracarensis* 7: *C. dubliniensis*. Carriles 8-13 temperatura de alineamiento 68°C: 8:control positivo con *C. parapsilosis*; 9: control negativo sin ADN; 10: *C. glabrata* 11: *C. tropicalis* 12: *C. bracarensis* 13: *C. dubliniensis*. 14: marcador de peso molecular. Panel D: Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2-4 temperatura de alineamiento 68.4°C. 2: control positivo con *C. parapsilosis*, 3: control negativo 4: *C. dubliniensis*. Carriles 5-7 temperatura de alineamiento 69°C. 5: control positivo con *C. parapsilosis*, 6: control negativo 7: *C. dubliniensis*. Carriles 8-10

temperatura de alineamiento 69.6°C. 8: control positivo con *C. parapsilosis*, 9: control negativo 10: *C. dubliniensis*. Panel E: Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2-4 temperatura de alineamiento 71.8°C. 2: control positivo con *C. parapsilosis*, 3: control negativo 4: *C. dubliniensis*. Carriles 5-7 temperatura de alineamiento 72°C. 5: control positivo con *C. parapsilosis*, 6: control negativo 7: *C. dubliniensis*.

Figura 4. Paneles A-H. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de concentración de oligonucleótidos para la detección de *C. parapsilosis* (cepa de aislado clínico Cp20), utilizando el par de oligonucleótidos Cp1. Para este par de oligonucleótidos, la concentración óptima seleccionada es 200 nM. Para la electroforesis, las muestras se corrieron a una concentración 4 veces mayor que aquella utilizada en los controles. Panel A: 100nM; Panel B 200nM; Panel C 400 nM; Panel D 500nM; Panel E 600nM; Panel F 800 nM; Panel G 1000nM; Panel H 1200 nM. Para cada panel, el orden de los carriles es el siguiente: 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene); 2 control positivo *C. parapsilosis*; 3: control negativo sin ADN; 4 *C. glabrata*; 5: *C. albicans*; 6: *C tropicalis*; 7: *C. dubliniensis*; 8: *C. bracarensis*; 9: *C. guillermondii*; 10: *C. krusei*.

Figura 5 Paneles A-H. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de concentración de oligonucleótidos para la detección de *C. parapsilosis* (cepa de aislado clínico Cp20), utilizando el par de

oligonucleótidos Cp2. Para este par de oligonucleótidos, la concentración óptima seleccionada es 600 nM. Para la electroforesis, las muestras se corrieron a una concentración 4 veces mayor que aquella utilizada en los controles. Panel A: 100nM; Panel B 200nM; Panel C 400 nM; Panel D 500nM; Panel E 600nM; Panel F 800 nM; Panel G 1000nM; Panel H 1200 nM. Para cada panel, el orden de los carriles es el siguiente: 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene); 2 control positivo *C. parapsilosis*; 3: control negativo sin ADN; 4 *C. glabrata*; 5: *C. albicans*; 6: *C tropicalis*; 7: *C. dubliniensis*; 8: *C. bracarensis*; 9: *C. guillermondii*; 10: *C. krusei*.

Figura 6 Paneles A-C Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de 36 muestras de aislados clínicos para la detección de *C. parapsilosis* (cepa de aislado clínico Cp20), utilizando el par de oligonucleótidos Cp1. Se detectaron 3 muestras positivas. En todos los páneles A-C, carriles 1 y 16: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carril 2: control positivo *C. parapsilosis*. Carril 3: control negativo sin ADN. Carriles 4 a 15: muestras clínicas.

Figura 7 Paneles A-B. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de 36 muestras de aislados clínicos para la detección de *C. parapsilosis* (cepa de aislado clínico Cp20), utilizando el par de oligonucleótidos Cp2. Se detectaron 3 muestras positivas. En el panel A, carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carril 2:

control positivo *C. albicans*. Carril 3: control negativo sin ADN. Carriles 4 a 20: muestras clínicas. En el Panel B: Carriles 1 a 19: muestras clínicas. 20: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene).

Figura 8: Gel de agarosa mostrando una prueba multiplex para *C. parapsilosis*. Los pares de oligonucleótidos Cp1 y Cp2 fueron probados en diversas condiciones. Los tamaños de amplificación predichos de 311 y 174 pb fueron detectados en muestras que contenían únicamente *C. parapsilosis*. Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carril 2: *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. dubliniensis, S. cerevisiae*, 100 ng de cada uno. Carril 3: control negativo con *C. glabrata, C. tropicalis, C. albicans, C. dubliniensis, S. cerevisiae*, 100 ng de cada uno. 4: marcador de peso molecular. 5: *C. parapsilosis*. 6: control negativo sin ADN. 7: *C. parapsilosis*. 8: *C. albicans*. 9: *C. glabrata*. 10: *C. tropicalis*. 11: *C. dubliniensis*.

Figura 9 Paneles A-C. Panel A: Gel de agarosa al 2% mostrando la prueba de especificidad. Panel A con la pareja de oligonucleotidos Cp1 y panel B con la pareja de oligonucleótidos Cp2. Para cada panel el orden de los carriles es: Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carril 2: control positivo *C. parapsilosis*. Carril 3: control negativo sin ADN. Carril 4: *C. parapsilosis* 100ng mas 50ng de cada una de: *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata, C. dubliniensis, C.*

bracarensis, C. guilliermondii, C. krusei, C. metapsilosis, C. orthopsilosis, S. cerevisiae. Carril 5 *C. parapsilosis* 10ng más 50ng de cada uno de: *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata, C. dubliniensis, C. bracarensis, C. guilliermondii, C. krusei, C. metapsilosis, C. orthopsilosis, S. cerevisiae* each. Carril 6: *C. parapsilosis* 1ng más 50ng de cada uno de: *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata, C. dubliniensis, C. bracarensis, C. guilliermondii, C. krusei, C. metapsilosis, C. orthopsilosis, S. cerevisiae each.* Carril 7: 50ng de cada uno de: *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata, C. dubliniensis, C. bracarensis, C. guilliermondii, C. krusei, C. metapsilosis, C. orthopsilosis, S. cerevisiae.*

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención divulga un método in vitro para detectar e identificar *Candida parapsilosis*, con al menos un set de oligonucleótidos específicos, así como también un set multiplex en bloque de oligonucleótidos específicos, el cual permite la identificación de *Candida parapsilosis* en muestras clínicas de diferentes subgrupos de población con un 100% de especificidad y sensibilidad.

Diversos oligonucleótidos han sido diseñados para detectar específicamente distintos sitios cromosomales de *Candida parapsilosis*. Las secuencias amplificadas están localizadas en distintos cromosomas y en contigs (set de segmentos sobrelapantes de ADN que juntos

representan una región consenso de DNA, clonas sobrelapantes que forman un mapa físico del genoma que se utiliza para guiar la secuenciación y ensamblado) que tienen regiones únicas que permiten dicha detección específica. Los diferentes tamaños entre los productos de amplificación de cada par de oligonucleótidos permiten que sean rápidamente reconocidos por separado o en un solo ensayo multiplex. *Candida parapsilosis*puede ser detectada por cualquier método de amplificación tal como PCR, RT-PCR, Q-PCR, multiplex-PCR, nested-PCR, o cualquier otro método de amplificación o detección de ácidos nucleicos tales como Southern blot, Dot blot, etc.

El término "amplificación" debe ser interpretado como un proceso para el incremento artificial del número de copias de fragmentos particulares de ácidos nucleicos en millones de copias a través de la replicación del segmento blanco.

Por "complementario" se entiende como una secuencia contigua que es capaz de hibridar con otra secuencia por enlaces de hidrógeno entre una serie de bases complementarias, las cuales pueden ser complementarias en cada posición en la secuencia por apareamiento de bases estándar (por ej. por apareamiento G:C, A:T o A:U) o puede contener una o más posiciones, incluyendo las básicas, las cuales no son bases complementarias por enlaces de hidrógeno estándar. Las bases contiguas son al menos 80%, preferiblemente 90% y más

preferiblemente aproximadamente 100% complementarias a una secuencia a la cual un oligómero debe ser específicamente hibridado. Las secuencias que son "suficientemente complementarias" permiten una hibridación estable de un oligómero de ácido nucleico a su secuencia blanco bajo condiciones de hibridación seleccionadas, aún si las secuencias no son completamente complementarias.

"Preparación de muestra" se refiere a cualquier paso o métodos que preparan una muestra para amplificación subsecuente y detección de ácidos nucleicos de *Candida* presentes en una muestra. La preparación de la muestra puede incluir cualquier método conocido para concentrar componentes a partir de un volumen de muestra mayor o a partir de una muestra sustancialmente acuosa, por ejemplo, cualquier muestra biológica que incluya ácidos nucleicos. La preparación de la muestra puede incluir lisis de componentes celulares y remoción de restos, por ejemplo, por filtración o centrifugación, y puede incluir el uso de oligómeros de ácidos nucleicos para capturar selectivamente el ácido nucléico blanco de otros componentes de la muestra.

La presente invención describe una composición que comprende diversos oligonucleótidos para la identificación de *C. parapsilosis*, en un vehículo aceptable apropiado, en donde dichos oligonucleótidos comprenden una secuencia contigua de aproximadamente 18 a 22

nucleotidos de una secuencia blanco. Dicha secuencia blanco está localizada a lo largo de los cromosomas de dicha *C. parapsilosis*, en sitios exclusivos que permiten reacciones no-cruzadas con cualquier otro tipo de organismo, incluyendo otras especies de *Candida* y ácidos nucleicos microbianos o eucariotas que pudieran estar contenidas en una muestra biológica.

Asimismo, los oligonucleótidos para la identificación específica de *Candida parapsilosis*, consisten de un ácido nucleico que tiene al menos un 90% de homología de secuencia con una de las SEQ ID Nos. 1 a 4 o complementos de la misma.

Dichos oligonucleótidos son suficientemente complementarios para secuencias blanco de *C. parapsilosis*. Para los procedimientos experimentales, las secuencias amplificadas fueron resecuenciadas para tener la certeza de que el producto amplificado corresponda con la región genómica descrita.

Esta invención también describe un método in vitro para la identificación de *C. parapsilosis*, que comprende los pasos de: obtener ADN de una muestra y A) amplificar los fragmentos de ácido nucleico de una muestra biológica por un método de amplificación con al menos uno de los oligonucleótidos diseñados, tales como aquellos descritos en las SEQ ID Nos. 1 a 4 o un complemento de las mismas; y B) identificar los fragmentos de ácido nucleico amplificados. En este

método la muestra biológica se deriva a partir de un sujeto de estudio. El sujeto de estudio es un mamífero, en donde en una modalidad preferida, pero no limitada, es un humano. Adicionalmente, en una modalidad preferida, dicha muestra biológica es seleccionada a partir del grupo que consiste de cualquier muestra que contenga ADN, fluidos, tejidos, restos celulares, orina chorro medio, cultivo de orina por sonda, cultivo por nefrostomía (riñón derecho e izquierdo), agua de hemodiálisis, líquido pleural, cultivo piógenos, mielocultivo, médula ósea, hemocultivo por lisis (sangre periférica), cultivo de sangre (hemocultivo), concentrado leucocitario, concentrado eritrocitario, exudado faríngeo, exudado nasal, exudado vaginal, exudado prostático, expectoración, catéter, biopsias de diferentes tejidos, tales como: ganglio, tejido subcutáneo, cornea, pulmón, nódulo pulmonar, páncreas, maxilar, piel, piel cuantitativa (celulitis, mama, escroto, brazo, mano), pelo, uñas, tibia, músculo, hueso, mama, sinovial, escara, muslo, cápsula articular, rodilla, epiplón; lavado bronquioalveolar (lingula, lóbulo superior e inferior (izquierdo y derecho), LBA derecho e izquierdo (vías aéreas)); post-mortem (hígado, pulmón, bazo); herida; hisopado (perianal, vaginal, úlcera (pie, mano)); absceso (muslo, riñón, perianal); ó peripancreático.

Adicionalmente, se describe un kit para la identificación específica de *Candida parapsilosis*, con al menos un oligonucleótido o como un kit

de identificación multiplex. Dichos kits comprenden al menos un oligonucleótido específicamente diseñado para la identificación de *Candida parapsilosis* tales como aquellos descritos en las SEQ ID Nos. 1 a 4 o complementos de las mismas. En la modalidad multiplex, el kit comprende al menos un par de oligonucleótidos o más preferiblemente al menos dos pares de oligonucleótidos.

Se describe asimismo, el uso de dichos oligonucleótidos específicamente diseñado para la identificación específica de *Candida parapsilosis*.

Como una modalidad adicional, la presente invención describe al menos una sonda útil para la identificación de *Candida parapsilosis*. Dicha identificación es llevada a cabo por un método in vitro que comprende acoplar fragmentos de ácidos nucleicos de una muestra biológica con dichas sondas e identificar los fragmentos de ácido nucleico hibridados, en donde dichos pasos son llevados a cabo por cualquier método de hibridación.

Con el fin de probar completamente la ventaja competitiva de los métodos de la presente invención contra métodos de diagnóstico tradicionales, a continuación está una comparación de tiempos de dos pruebas.

Método tradicional de identificación de *Candida parapsilosis* en muestra de orina: las muestras de orina son analizadas en un analizador

de orina automático tipo URISYS acoplado a UF-100i. El análisis se realiza mediante citometría de flujo con laser de argón. El UF-100i mide las propiedades de luz dispersa y fluorescencia para contar y determinar las partículas presentes en la orina. El volumen de las partículas se determina a partir de las señales de impedancia. De esta forma, de acuerdo a los diagramas de dispersión, el resultado final indica cuales muestras de orina son las que probablemente contengan células levaduriformes. Estas muestras son marcadas como muestras de orina YLC(células levaduriformes). De las muestras de orina marcadas como YLC se toma 1µl y se siembra en placas de medio Sabourand/Dextrosa (SDA) y medio Sabourand/Dextrosa con cefoperazona (CFP). Dichas placas se incuban a 30°C por 72 horas. Los urocultivos con crecimiento menor a 10,000 UFC/ml, al igual que las placas sin crecimiento, se reportan como No Desarrolló Hongo (negativo); los urocultivos con desarrollo igual o mayor a 10,000 UFC/ml pasan a la prueba de tubo germinal, con una incubación de 2 horas a 35°C. En el caso de los tubos germinales negativos se reporta como *Candida sp.* Para identificar a la especie a partir del reporte de *Candida sp.* se utilizan las tarjetas Vitek, que permiten la identificación por medio de la asimilación de carbohidratos. Dichas tarjetas se incuban por un periodo de 24 a 48 horas, momento en el que se leen

las tarjetas. El tiempo total mínimo para identificar C. *parapsilosis* es de 6 días, con una sensibilidad de alrededor del 85%.

En el método para identificar C. *parapsilosis* de la presente invención, las muestras de orina son analizadas en un analizador de orina automático tipo URISYS acoplado a UF-100i. El análisis se realiza mediante citometría de flujo con laser de argón. El UF-100i mide las propiedades de luz dispersa y fluorescencia para contar y determinar las partículas presentes en la orina. El volumen de las partículas se determina a partir de las señales de impedancia. De esta forma, de acuerdo a los diagramas de dispersión, el resultado final indica cuales muestras de orina son las que probablemente contengan células levaduriformes. Estas muestras son marcadas como muestras de orina YLC (células levaduriformes). El tiempo de esta primera etapa es de 2 horas. A continuación, de las muestras de orina marcadas como YLC se toma 1 ml, se centrifuga, se descarta el sobrenadante, se resuspende y se hierve la pastilla. El ADN genómico obtenido es el templado del PCR donde se utilizan los primers generables a partir de las SEQ ID Nos. 1 a 4, en condiciones óptimas de reacción Los productos de PCR son separados mediante electroforesis en gel de agarosa y dichos productos son analizados para la correcta identificación de C. *parapsilosis*. El tiempo total de la prueba es de 6 horas.

Método tradicional de identificación de *Candida parapsilosis* en muestras sanguíneas: Las muestras de sangre se incuban durante 72 horas en el equipo automatizado BACTEC9240. Cuando hay crecimiento de los microorganismos, estos metabolizan los nutrientes contenidos en el medio de cultivo liberando CO_2. La liberación de CO_2 es detectada por el equipo y automáticamente el hemocultivo se marca como positivo para levaduras. Los hemocultivos positivos para levaduras son sembrados en placas de Sabourand/Dextrosa (SDA) y Sabourand/Dextrosa con cefoperazona (CFP) y se incuban a 30°C por 72 horas. Los hemocultivos con un crecimiento menor a 10,000 UFC/ml al igual que aquellos sin crecimiento, se reportan como No desarrolló hongo (negativo); los hemocultivos con un crecimiento igual o mayor a 10,000 UFC/ml se realiza la prueba de tubo germinal durante 2 horas a 35°C. En el caso de los tubos germinales negativos se reporta como *Candida sp*. Para identificar a la especie a partir del reporte de *Candida sp*. se utilizan las tarjetas Vitek, que permiten la identificación por medio de la asimilación de carbohidratos. Estas tarjetas se incuban durante 24 a 48 horas y son leídas para identificar *C. parapsilosis*. El tiempo total mínimo para la identificación es de 9 días.

Método para detectar *C. parapsilosis* de la presente invención en muestras sanguíneas: Las muestras de sangre se incuban durante 72 horas en el equipo automatizado BACTEC9240. Cuando hay

crecimiento de los microorganismos, estos metabolizan los nutrientes contenidos en el medio de cultivo liberando CO_2. La liberación de CO_2 es detectada por el equipo y automáticamente el hemocultivo se marca como positivo para levaduras. De las muestras de sangre marcadas como positivas para levaduras se toman 100µl, se centrifugan, se descarta el sobrenadante, se resuspende y se hierve la pastilla. El ADN genómico obtenido es el templado del PCR donde se utilizan cualesquiera de los oligonucleótidos generados a partir de las SEQ ID Nos. 1 a 12, en condiciones óptimas de reacción. Los productos de PCR son separados mediante electroforesis en gel de agarosa y dichos productos son analizados para la correcta identificación de C. *parapsilosis*. El tiempo total de la prueba es de 3 días.

Un método alternativo es tomar como muestra sangre del paciente sin ser preclasificada por hemocultivo. En este caso, se sigue el procedimiento anterior y el tiempo total de la prueba es de 4 horas.

De tal manera, el paso crítico es obtener ADN genómico suficiente de cualquiera de los tipos de muestras descritos anteriormente y a partir de las mismas, se utiliza el ADN genómico obtenido como el templado del PCR donde se utilizan cualesquiera de los oligonucleótidos generados en las regiones descritas, tales como, pero no limitado a las 4 secuencias descritas. Los productos de PCR son obtenidos y analizados por cualquier método convencional, como por ejemplo,

pero no limitado a electroforesis en gel de agarosa, hibridizaciones tipo Dot-Blot, Southern Blot, Northern Blot y similares; RT-PCR, PCR-ELISA, y los demás conocidos en el campo de la técnica (por ejemplo, pero no limitado a Molecular Diagnostic PCR handbook. (2005), Gerrit J. Viljoen, Louis H. Nel and John R. Crowther. Springer Publishers), para la correcta identificación de *C. parapsilosis*. Cabe señalar que dichos oligonucleótidos pueden estar conformados por nucleótidos sin marcar o marcados, como por ejemplo, pero no limitado a, marca radioactiva, marca quiomiluminiscente, luminiscente, fluorescente, biotinilada.

Los ejemplos experimentales seleccionados, los cuales deben ser considerados solo como evidencia técnica de soporte, pero sin limitar el alcance de la invención, son provistos a continuación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Diseño de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos y sondas de *Candida parapsilosis* fueron diseñados específicamente para sitios únicos localizados en el genoma. Ejemplos no limitativos de los oligonucleótidos específicamente diseñados se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de oligonucleótidos para la identificación de *Candida parapsilosis*.

Número de par de	Seq. ID. No.	Forward (Fw) o Reversa (Rv)	No. de pb	Secuencia 5´ a 3´	Longitud del amplicon pb	Nombre del Contig
Cp1	Seq. ID. No. 1	Fw	19	GTC AGT TCG GGA GCA ATA G	311	AG_03079
	Seq. ID. No. 2	Rv	20	GTT GCT TCT CCT TCA CTT GC		
Cp2	Seq. ID. No. 3	Fw	20	GGG TGT ATG AGA CTA CTT GG	174	CPAG_00126
	Seq. ID. No. 4	Rv	18	CTG AAA GAG GAA CGT CAC		

Las localizaciones de los contigs correspondientes están de conformidad con la base de datos de GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Dichos pares de oligonucleótidos fueron probados para optimizar las condiciones de amplificación. Así, los pares de oligonucleótidos Cp1 y Cp2 tienen temperaturas de alineamiento entre 56°C y 72°C. Estos pares de oligonucleótidos fueron probados en ADN genómico para probar amplificación llevando a cabo reacciones de PCR. Por ejemplo, los pares de oligonucleótidos fueron analizados en un volumen final de 30 µL, como sigue (Tabla 2):

Tabla 2: Condiciones experimentales generales de PCR.

Reactivos	***Concentración***	***Volumen* (µL)**
ADN Genomico	Variable	0.5 µL
Buffer 10 X	1X	3.0 µL
$MgCl_2$ 20X	1X	1.5 µL
dNTPs 2Mm	30 µM	0.45 µL
Primer Forward	500 Nm	3.0 µL
Primer Reverse	500 nM	3.0 µL
Amplificasa	500 U	0.4 µL
Agua		18.15 µL
	Volumen Final	30.0 µL

Como control, la calidad del ADN genómico fue evaluada amplificando regiones de rADN con oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 (Tabla 3), utilizando las mismas concentraciones y volumen final arriba descritos. El ADN genómico estuvo puro, no degradado y libre de moléculas que pudieran interferir con reacciones posteriores de PCR (figura 1).

Tabla 3. Oligonucleótidos universales para amplificar ITS en genes fúngicos.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Longitud
ITS1	**TCCGTAGGTGAACCTGCGG**	19
ITS4	**TCCTCCGCTTATTGATATGC**	20

Los fragmentos amplificados resultantes a partir de las reacciones de PCR para cada par de oligonucleótidos fueron probadas en geles de agarosa al 2% durante 60 minutos a 100-130 volts.

Durante la electroforesis, las muestras que pertenecieron a otras especies de *Candida* diferente a *Candida parapsilosis*, fueron cargadas a mayores concentraciones que aquellas utilizadas en controles positivos y negativos. Esto fue hecho para asegurar la sensibilidad de los oligonucleótidos.

Ejemplo 2. Técnicas de Estandarización

A continuación se presentan los resultados de la estandarización de algunos oligonucleótidos seleccionados. Esta selección no debe tomarse como limitante al alcance de la invención, sino para ilustrar la aplicabilidad de todos los oligonucleótidos diseñados.

Los pares de oligonucleótidos Cp1 y Cp2 fueron analizados para reflejar la sensibilidad y selectividad de los 4 oligonucleotidos y sondas para identificar C. *parapsilosis*. Estos ejemplos son ilustrativos pero no limitativos para el alcance de la invención.

Condiciones óptimas de reacción de PCR: Primeramente, las condiciones de alineamiento fueron probadas con un umbral de temperatura. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Las temperaturas de alineamiento fueron probadas en cada par de oligonucleótidos, las temperaturas máximas y mínimas en donde la

reacción es efectiva se señalaron en el termociclador y se calcularos las temperaturas intermedias.

Tabla 4. Temperaturas de alineamiento probadas para cada par de oligonucleótidos.

No.	Par de Oligonucleotido	Umbral de Temperatura (°C)								Temperatura (°C)
		Min							Max	
1	Cp1	60	60.8	61.9	63.2	65	66.5		68	64.4
2	Cp2	56 68	57.1 68.4	58.8 69	60.8 69.6	[illegible] 70.5	65.7 71.3	67.2 71.8	68 72	68.4

Las figuras 2 y 3 muestran el umbral mínimo de temperatura en donde los oligonucleótidos son más específicos en comparación con otras especies que muestran bandas inespecíficas en el primer análisis. Todos los geles de agarosa están a una concentración de 2% y fueron corridos a 110-130V.

Concentración de oligonucleótidos

Una vez que se seleccionó la temperatura óptima de alineamiento para cada par de oligonucleótidos, se determinó la concentración óptima de oligonucleótidos para reacciones de PCR.

Las concentraciones probadas fueron: 100nM, 200nM, 400nM, 500nM, 600nM, 800nM, 1000nM y 1200nM.

La concentración mínima de oligonucleótidos en donde se detecta una banda clara en el control positivo, fue seleccionada. La tabla 5 muestra las mejores concentraciones. Las figuras 4 y 5 muestran los resultados de optimización con pares de oligonucleótidos ilustrativos. Todos los geles de agarosa están a una concentración de 2% y fueron corridos a 110-130V.

Tabla 5. Mejor concentración de oligonucleótidos para los pares de oligonucleótidos diseñados para *C. parapsilosis*.

No	Par	Mejor concentración
1	**Cp1**	200nM
2	**Cp2**	600nM

ADN genómico detectado. La cantidad de ADN genómico que puede ser detectado con cada par de oligonucleótidos fue probada desde 100 ng a 0.02 ng con un control sin ADN. Para *C. parapsilosis*, el ADN genómico puede ser detectado en una cantidad de al menos 0.1 ng.

Ejemplo 3. Detección de *Candida* en muestras de aislados clínicos.

Los pares de oligonucleótidos arriba ejemplificados fueron probados para detectar *Candida parapsilosis* en muestras de aislados clínicos de pacientes hospitalizados.

Las figuras 6 y 7 muestran los resultados de dichas pruebas. Todos los pares de oligonucleótidos detectan solo la especie de *Candida* para la cual fueron diseñados. En la mayoría de los casos todos los pares de oligonucleótidos detectan las mismas muestras positivas.

Comparando los resultados de PCR con métodos de identificación Vitek, se revela que la prueba de PCR tiene al menos una sensibilidad del 100% y una especificidad de 100% en contraste con pruebas VITEK que tienen un 85% y 33% respectivamente. La prueba Vitek identificó un aislado clínico como *C. tropicalis*, sin embargo, el método de la presente invención lo identificó como *C. parapsilosis*. Este resultado también fue confirmado con la prueba API ID32C.

Ejemplo 4: Ensayo multiplex

Dado que es posible tener rearreglos dentro del genoma de *C. parapsilosis*, se diseñó un ensayo multiplex para confirmar con 100% de especificidad, la presencia del microorganismo en muestras clínicas. Dado que los pares de oligonucleótidos están localizados en varios cromosomas, la probabilidad de tener más de un rearreglo dentro de una muestra clínica es bajo.

La figura 8 muestra el uso de los pares de oligonucleótidos Cp1 y Cp2 simultáneamente en muestras que contienen *C. parapsilosis* solo o en mezcla con *C. glabrata, C. tropicalis, C. albicans, C. dubliniensis, S. cerevisiae*, en donde cada ADN de cada microorganismo está en una *Candidad* de 100 ng. Como se predijo, los fragmentos de amplificación están presentes solo en aquellos carriles que contiene *C. parapsilosis*, y no en los carriles control (carriles 3,6, 8 y 11). Por lo tanto se ha diseñado un kit multiplex para detectar *C. parapsilosis* con un 100% de sensibilidad y especificidad.

Ejemplo 5. Ensayo de Especificidad.

La figura 9 páneles A a C muestran que los oligonucleótidos probados son específicos para *C. parapsilosis* y no cruzan con otras especies microbianas. Por ejemplo, se probó el ADN de *C. parapsilosis* mezclado con otras 10 especies microbianas tales como *C. tropicalis, C. albicans, C. glabrata, C. dubliniensis, C. bracarensis, C. guilliermondii, C. krusei, C. metapsilosis, C. orthopsilosis, S. cerevisiae*(50ng de cada una para un total de 500 ng). El ADN de *C. parapsilosis* fue añadido en diferentes cantidades: 100 ng, 10 ng, 1 ng y un control sin ADN. Como se muestra, las bandas amplificadas detectadas corresponden con el tamaño predicho (311 pb para Cp1 y 174 pb para Cp2) y su prueba de resecuenciación. El control negativo sin ADN de *C. parapsilosis* no

mostró ninguna banda de amplificación. Esto confirma que el ensayo es 100% específico para *C. parapsilosis*.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

1.- Un oligonucleótido para la identificación específica de *Candida parapsilosis*, caracterizado porque consiste de un ácido nucleico que tiene al menos un 90% de homología de secuencia con una de las SEQ. ID. Nos. 1 a 4 o un complemento de las mismas.

2.- Un método in vitro para la identificación específica de *C. parapsilosis*, caracterizado porque comprende los pasos de: a) amplificar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica con al menos un oligonucleótido como se definió en la cláusula 1; b) identificar los fragmentos de ADN amplificados.

3.- El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque la amplificación de fragmentos de ADN es llevada a cabo con al menos un par de oligonucleótidos como se definen en la reivindicación 1.

4.- El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque la amplificación de fragmentos de ADN es llevada a cabo con al menos dos pares de oligonucleótidos como se definen en la reivindicación 1.

5.- Un kit para la identificación específica de *Candida parapsilosis*, caracterizado porque comprende al menos un oligonucleótido como el que se reclama en la reivindicación 1.

6.- El kit de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque comprende al menos un par de oligonucleótidos como se definen en la reivindicación 1.

7.- El kit de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque comprende al menos dos pares de oligonucleótidos como se definen en la reivindicación 1.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención describe un método in vitro para la identificación de *Candida parapsilosis*, las secuencias asociadas a dicha identificación, así como kits de diagnóstico para identificar *Candida parapsilosis*.

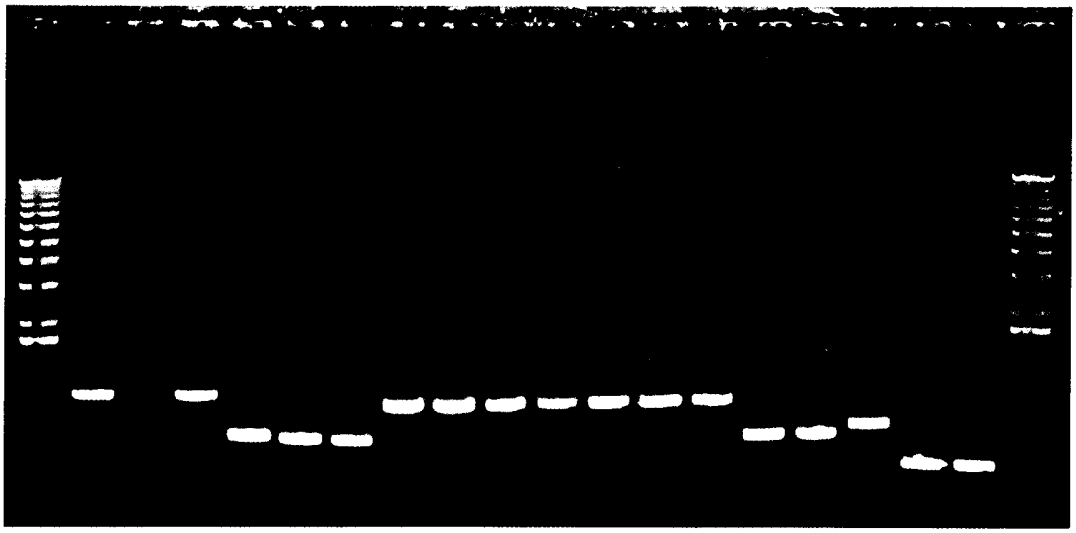

FIGURA 1

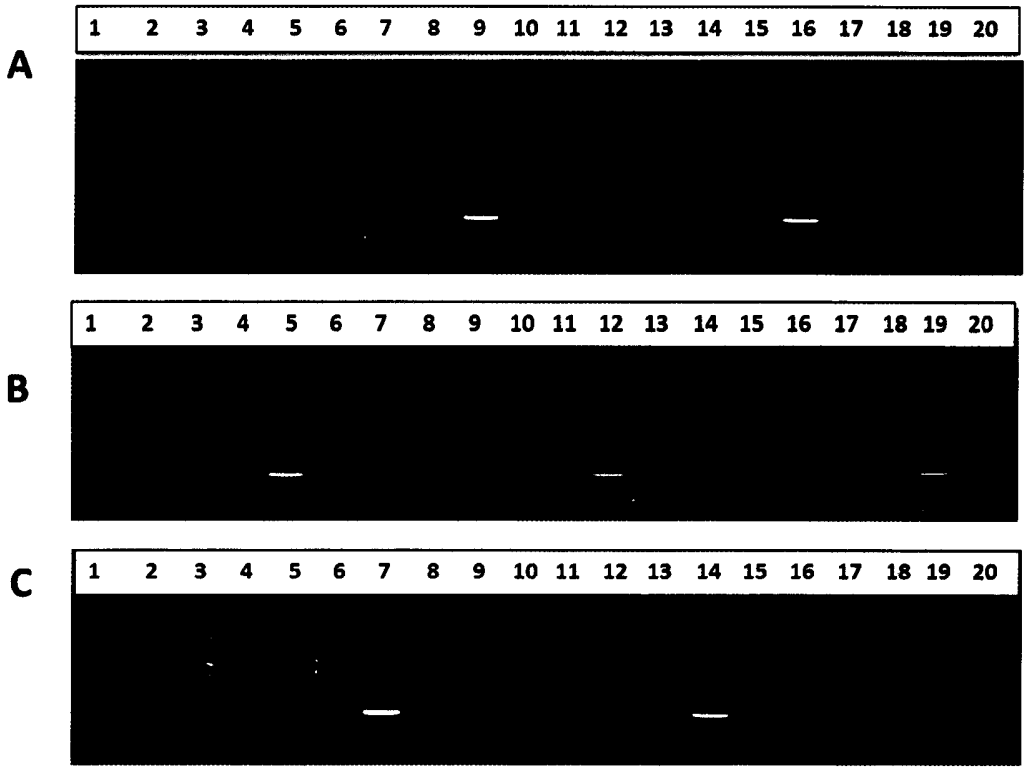

FIGURA 2

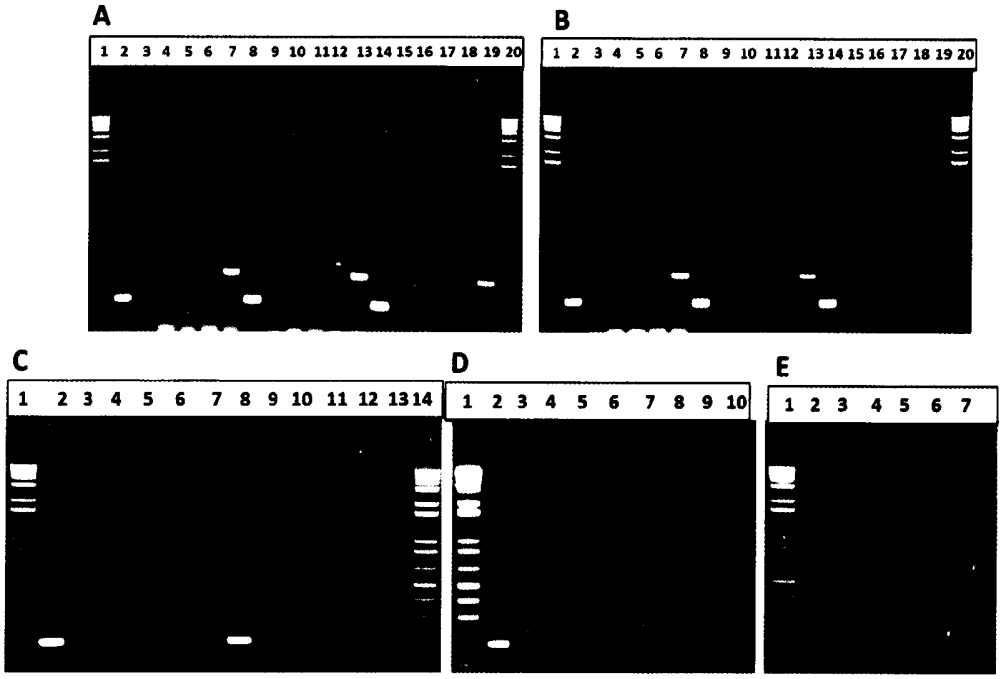

FIGURA 3

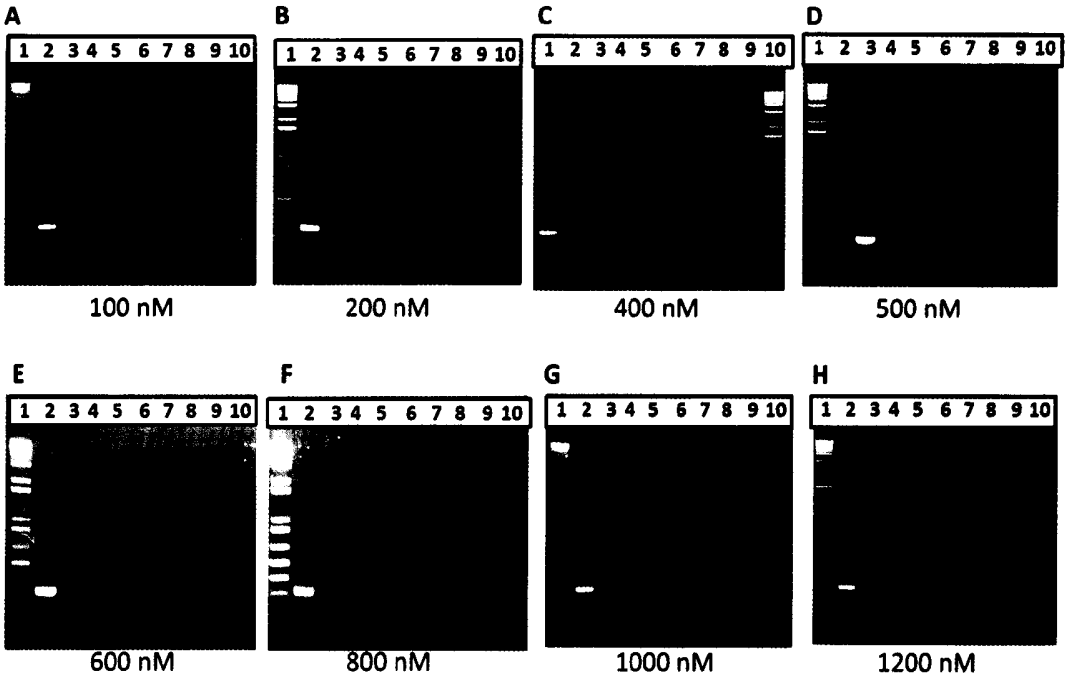

FIGURA 4

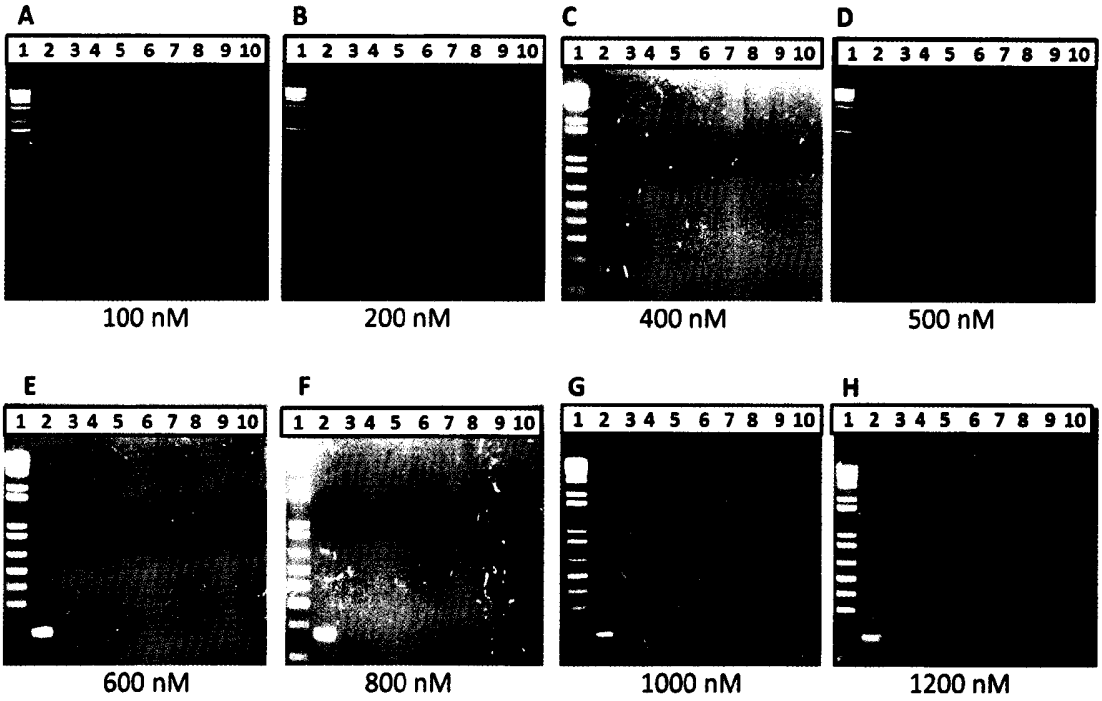

FIGURA 5

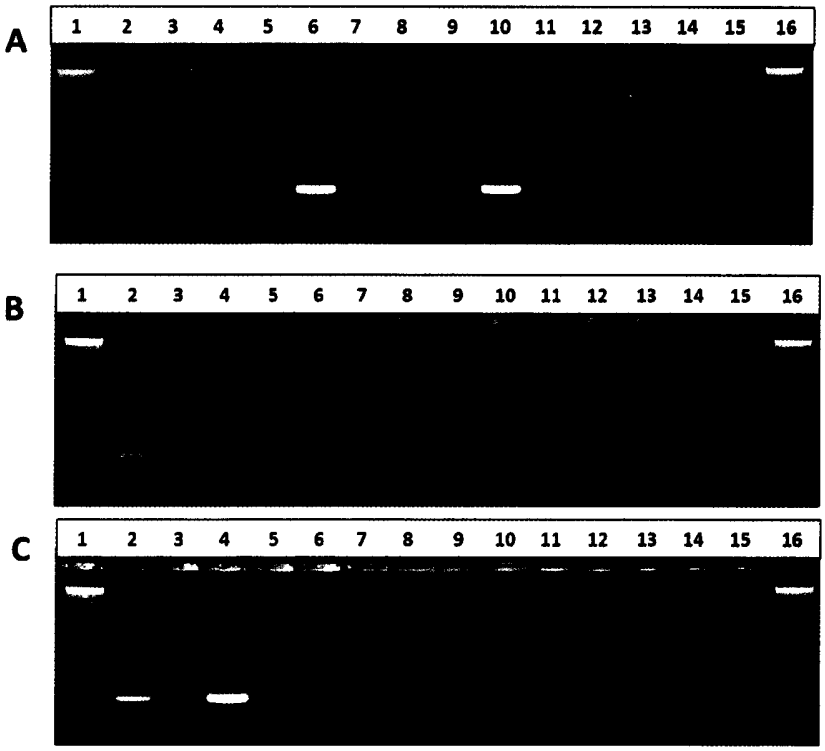

FIGURA 6

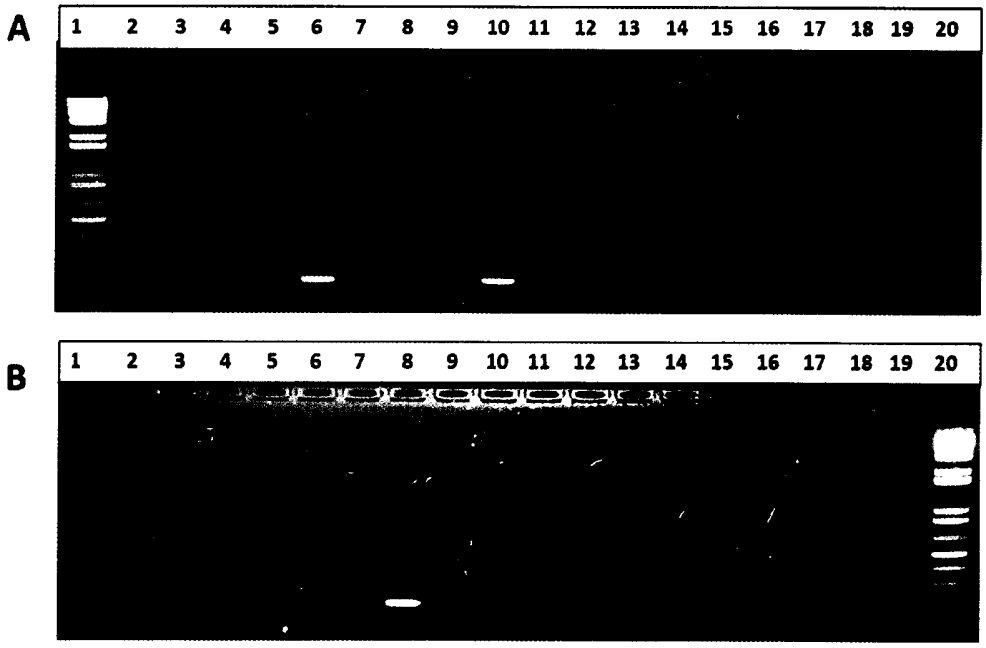

FIGURA 7

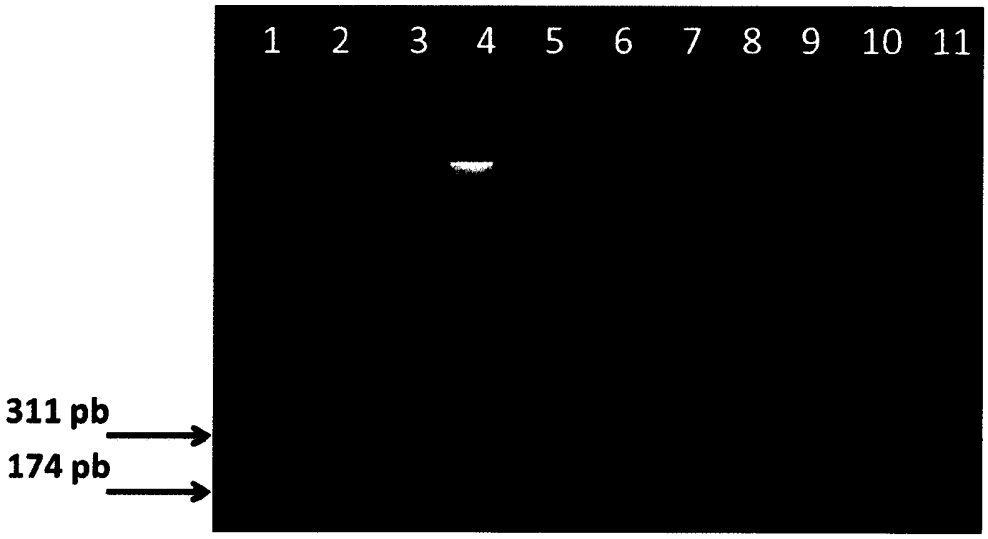

FIGURA 8

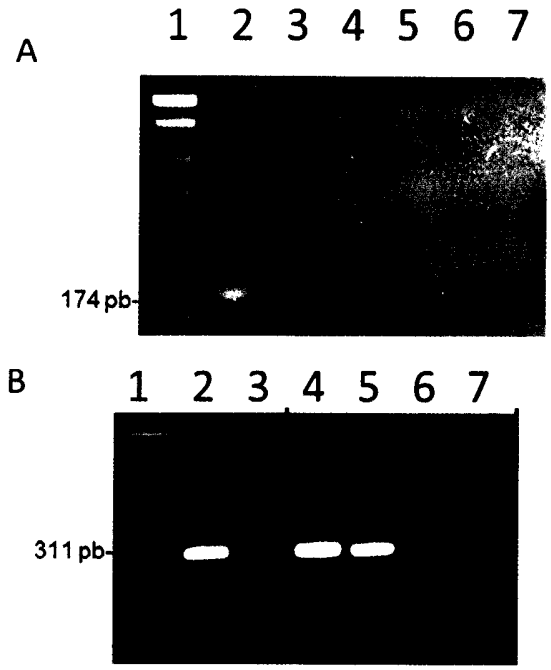

FIGURA 9

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA A.C.

CASTAÑO NAVARRO, IRENE BEATRIZ

DE LAS PEÑAS NAVA, ALEJANDRO

<120> **OLIGONUCLEOTIDOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS*, METODO DE DETECCION Y KIT DE LOS MISMOS.**

<130> 1009.22

<150> US 61/894,974

<151> 2013-10-24

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Candida parapsilosis

<400> 1

gtcagttcgg gagcaatag 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Candida parapsilosis

400> 2

gttgcttctc cttcacttgc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Candida parapsilosis

<400> 3

gggtgtatga gactacttgg 20

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Candida parapsilosis

<400> 4

ctgaaagagg aacgtcac 18