



(11) **MX 2014012841 A**

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **26/08/2015** (51) Int. Cl: **C12Q 1/68** (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **23/10/2014**
(21) Número de solicitud: **2014012841** **C12Q 1/04** (2006.01)

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

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

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

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

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

(54) Title: **CANDIDA TROPICALIS OLIGONUCLEOTIDES, DETECTION METHOD, AND KIT THEREOF.**

(57) Resumen

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

(57) Abstract

The invention discloses an in vitro method for the identification of Candida tropicalis, the sequences associated to said identification, as well as diagnosis kits for identifying Candida tropicalis.

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

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 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 oportunistas se ha incrementado substancialmete en las últimas dos
10 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
15 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
20 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
5 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
10 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
15 de tamaño similar y deben ser resecuenciadas antes de proveer un resultado final. 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
20 invención. Por lo tanto, existe la necesidad para lograr un diagnóstico específico para *Candida tropicalis*, dado que los métodos actuales no pueden diferenciar entre diversas especies de *Candida*, con cierto

grado de entrecruzamiento (HSEIN CHANG CHANG, et al, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2001, p. 3466–3471; el cual divulga que la detección por PCR con ITSs para *C. tropicalis* produce amplicones de exactamente el mismo tamaño que *C. albicans*, y también es difícil de diferenciarla contra *C. parapsilosis*, por lo que se deben llevar a cabo pruebas posteriores).

Se han reportado diversas especies de *Candida* que tienen rearrreglos 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 tropicalis*, con al menos un oligonucleótido específico, así como con un set multiplex en bloque de oligonucleótidos específicos, lo cual permite la identificación de *Candida tropicalis* 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 tropicalis*, 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 22 o un complemento de las mismas.

En una modalidad adicional, se describe además un método in vitro para la identificación específica de *C. tropicalis*, que comprende los pasos de: a) amplificar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica con al menos un oligonucleótido como se definió
5 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
10 específica de *Candida tropicalis*, 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
15 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
20 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. guillemondii*; 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. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos Ct1. Las bandas inespecíficas para el control positivo desaparecen al aumentar la temperatura de alineamiento, para este par de oligonucleótidos, la temperatura óptima es de 64.4°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. tropicalis* tiene una longitud de 217 bp. PANEL A: Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene); Carriles 2-4 Temperatura de alineamiento 62°C: 2: control positivo *C. tropicalis*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. dubliniensis*. Carriles 5-7 Temperatura de alineamiento 62.6°C: 7: control positivo *C. tropicalis*; 8: control negativo sin ADN; 9: *C. dubliniensis*. Carriles 8-10 Temperatura de alineamiento 63.4°C: 8: control positivo *C. tropicalis*; 9:

control negativo sin ADN; 10: *C. dubliniensis*. Carriles 11-13 Temperatura de alineamiento 64.4°C: 11: control positivo *C. tropicalis*; 12: control negativo sin ADN; 13: *C. dubliniensis*. Carriles 14-16 Temperatura de alineamiento 65.8°C: 14: control positivo *C. tropicalis*; 15: control negativo sin ADN; 16: *C. dubliniensis*. Carriles 17-19 Temperatura de alineamiento 66.9°C: 17: control positivo *C. tropicalis*; 18: control negativo sin ADN; 19: *C. dubliniensis*. Carril 20: marcador de peso molecular. Panel B Carriles 1-3 Temperatura de alineamiento 67.6°C: 1: control positivo *C. tropicalis*; 2: control negativo sin ADN; 3: *C. dubliniensis*. Carriles 4-6 Temperatura de alineamiento 68°C: 4: control positivo *C. tropicalis*; 5: control negativo sin ADN; 6: *C. dubliniensis*. Carril 7: marcador de peso molecular.

Figura 3: Gel de agarosa al 2% mostrando el gradiente de temperatura para la detección de *C. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos Ct3. Para este par de oligonucleótidos, la temperatura óptima es de 60.1°C. Para la electroforesis, las muestras corrieron a una concentración 4 veces más alta que aquella utilizada en los controles. PANEL A: 1: marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder Invitrogene); Carriles 2-4 Temperatura de alineamiento 55°C: 2: control positivo *C. tropicalis*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. dubliniensis*. Carriles 5-7 Temperatura de alineamiento 56.2°C: 5: control positivo *C. tropicalis*; 6: control negativo

sin ADN; 9: *C. dubliniensis*. Carriles 8-10 Temperatura de alineamiento 58°C: 8: control positivo *C. tropicalis*; 9: control negativo sin ADN; 10: *C. dubliniensis*. Carriles 11-13 Temperatura de alineamiento 60.1°C: 11: control positivo *C. tropicalis*; 12: control negativo sin ADN; 13: *C. dubliniensis*. Carriles 14-16 Temperatura de alineamiento 63.1°C: 14: control positivo *C. tropicalis*; 15: control negativo sin ADN; 16: *C. dubliniensis*. Carriles 17-19 Temperatura de alineamiento 65.5°C: 17: control positivo *C. tropicalis*; 18: control negativo sin ADN; 19: *C. dubliniensis*. Carril 20: marcador de peso molecular. Panel B Carriles 1-3 Temperatura de alineamiento 67.1°C: 1: control positivo *C. tropicalis*; 2: control negativo sin ADN; 3: *C. dubliniensis*. Carriles 4-6 Temperatura de alineamiento 68°C: 4: control positivo *C. tropicalis*; 5: control negativo sin ADN; 6: *C. dubliniensis*. Carril 7: marcador de peso molecular.

Figura 4. Gel de agarosa al 2% mostrando el gradiente de temperatura para la detección de *C. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos Ct5. Para este par de oligonucleótidos, la temperatura óptima es de 65.5°C. Para la electroforesis, las muestras corrieron a una concentración 4 veces más alta que aquella utilizada en los controles. PANEL A: 1: marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder Invitrogene); Carriles 2-4, Temperatura de alineamiento 55°C. 2: control positivo *C. tropicalis*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. dubliniensis*. Carriles 5-7, Temperatura de

alineamiento 56.2°C. 5: control positivo *C. tropicalis*; 6: control negativo sin ADN; 7: *C. dubliniensis*. Carriles 8-10, Temperatura de alineamiento 58°C. 8: control positivo *C. tropicalis*; 9: control negativo sin ADN; 10: *C. dubliniensis*. Carril 11: marcador de peso molecular. Carriles 12-14, 5 Temperatura de alineamiento 60.1°C. 12: control positivo *C. tropicalis*; 13: control negativo sin ADN; 14: *C. dubliniensis*. Carriles 15-17, Temperatura de alineamiento 63.1°C. 15: control positivo *C. tropicalis*; 16: control negativo sin ADN; 17: *C. dubliniensis*. Carriles 18-20, 10 Temperatura de alineamiento 65.5°C. 18: control positivo *C. tropicalis*; 19: control negativo sin ADN; 20: *C. dubliniensis*. Carriles 21-23, Temperatura de alineamiento 67.2°C. 21: control positivo *C. tropicalis*; 22: control negativo sin ADN; 23: *C. dubliniensis*. Carriles 24-26, 15 Temperatura de alineamiento 68°C. 24: control positivo *C. tropicalis*; 25: control negativo sin ADN; 26: *C. dubliniensis*. 27: marcador de peso molecular.

Figura 5. Paneles A-H. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de concentración de oligonucleótidos para la detección de *C. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos Ct1. Para este par de oligonucleótidos, la concentración óptima 20 seleccionada es 100 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. tropicalis*; 3: control negativo sin ADN; 4 *C. glabrata*; 5: *C. albicans*; 6: *C. parapsilosis*; 7: *C. dubliniensis*; 8: *C. braccarensis*; 9: *C. guillermondii*; 10: *C. krusei*.

Figura 6 Paneles A-H. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de concentración de oligonucleótidos para la detección de *C. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos Ct3. Para este par de oligonucleótidos, la concentración óptima seleccionada es 100 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. tropicalis*; 3: control negativo sin ADN; 4 *C. glabrata*; 5: *C. albicans*; 6: *C. parapsilosis*; 7: *C. dubliniensis*; 8: *C. braccarensis*; 9: *C. guillermondii*; 10: *C. krusei*.

Figura 7 Paneles A-H. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de concentración de oligonucleótidos para la detección de *C. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos

Ct5. 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. tropicalis*; 3: control negativo sin ADN; 4 *C. glabrata*; 5: *C. albicans*; 6: *C. parapsilosis*; 7: *C. dubliniensis*; 8: *C. braccarensis*; 9: *C. guillermondii*; 10: *C. krusei*.

Figura 8. Paneles A-C Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de 36 muestras de aislados clínicos para la detección de *C. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos Ct1. Se detectaron 12 muestras positivas, la muestra aislada AN8 no fue positiva con Ct1 ni Ct5, pero fue positiva con Ct3 (carril 11) En todos los paneles A-C, carriles 1 y 16: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carril 2: control positivo *C. tropicalis*. Carril 3: control negativo sin ADN. Carriles 4 a 15: muestras clínicas.

Figura 9 Paneles A-B. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de 36 muestras de aislados clínicos para la detección de *C. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos Ct3. Se detectaron 12 muestras positivas, la muestra aislada AN8 no fue

positiva con Ct1 ni Ct5, pero fue positiva con Ct3 (carril 11) En el panel A, carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carril 2: control positivo *C. tropicalis*. Carril 3: control negativo sin ADN. Carriles 4 a 20: muestras clínicas. En el Panel B: Carril 1 marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carriles 2 a 20: muestras clínicas.

Figura 10: Paneles A-B. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de 36 muestras de aislados clínicos para la detección de *C. tropicalis* (cepa de aislado clínico Ct18), utilizando el par de oligonucleótidos Ct5. Se detectaron 12 muestras positivas, la muestra aislada AN8 no fue positiva con Ct1 ni Ct5, pero fue positiva con Ct3 (carril 11) En el panel A, carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carril 2: control positivo *C. tropicalis*. Carril 3: control negativo sin ADN. Carriles 4 a 20: muestras clínicas. En el Panel B: Carril 1 marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carriles 2 a 20: muestras de aislados clínicos.

Figura 11. Gel de agarosa mostrando una prueba multiplex para *C. tropicalis*. Los pares de oligonucleótidos Ct1, Ct3 y Ct5 fueron probados en diversas condiciones. Los tamaños de amplificación predichos de 3217, 224 y 254 pb fueron detectados en muestras que contenían únicamente *C. tropicalis*. 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. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *S. cerevisiae*, 100 ng de cada uno. 4: marcador de peso molecular. 5: *C. tropicalis*. 6: control negativo sin ADN. 7: *C. tropicalis*. 8: *C. albicans*. 9: *C. glabrata*. 10: *C. parapsilosis*. 11: *C. dubliniensis*.

Figura 12 Paneles A-B. Panel A: Gel de agarosa al 2% mostrando la prueba de especificidad. Panel A con la pareja de oligonucleotidos Ct1 y panel B con la pareja de oligonucleótidos Ct5. 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. tropicalis*. Carril 3: control negativo sin ADN. Carril 4: *C. tropicalis* 100ng mas 50ng de cada una de: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *S. cerevisiae*. Carril 5: *C. tropicalis* 1ng más 50ng de cada uno de: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *S. cerevisiae* each. Carril 6: *C. tropicalis* 1ng más 50ng de cada uno de: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *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. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *S. cerevisiae*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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
5 bloque de oligonucleótidos específicos, el cual permite la identificación de *Candida tropicalis* 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 tropicalis*.
10 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
15 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 tropicalis* puede ser detectada por cualquier método de amplificación tal como PCR, RT-PCR, Q-PCR, multiplex-PCR,
20 nested-PCR, o cualquier otro método de amplificación o detección de ácidos nucleicos tales como Southern blot, Dot blot, etc. Dichos

oligonucleótidos son parte de una composición que comprende además un vehículo aceptable apropiado.

El término "amplificación" debe ser interpretado como un proceso para el incremento artificial del número de copias de fragmentos
5 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
10 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
15 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
20 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 nucleico blanco de otros componentes de la muestra.

La presente invención describe una composición que comprende diversos oligonucleótidos para la identificación de *C. tropicalis*, 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. tropicalis*, 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 tropicalis*, consisten de un ácido nucleico que tiene al menos

un 90% de homología de secuencia con una de las SEQ ID Nos. 1 a 22 o complementos de la misma.

Dichos oligonucleótidos son suficientemente complementarios para secuencias blanco de *C. tropicalis*. Para los procedimientos
5 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. tropicalis*, que comprende los pasos de: obtener
10 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 22 o un complemento de las mismas; y B) identificar los fragmentos de ácido nucleico amplificados. En este
15 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,
20 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 tropicalis*, 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 tropicalis* tales como aquellos descritos en las SEQ ID Nos. 1 a 22 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 tropicalis*.

Como una modalidad adicional, la presente invención describe al
5 menos una sonda útil para la identificación de *Candida tropicalis*. 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
10 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.

15 Método tradicional de identificación de *Candida tropicalis* 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
20 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 5 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 10 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 15 periodo de 24 a 48 horas, momento en el que se leen las tarjetas. El tiempo total mínimo para identificar *C. tropicalis* es de 6 días, con una sensibilidad de alrededor del 85%.

En el método para identificar *C. tropicalis* de la presente invención, las muestras de orina son analizadas en un analizador de orina automático 20 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.

- 5 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
- 10 donde se utilizan los primers generables a partir de las SEQ ID Nos. 1 a 22, 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. tropicalis*. El tiempo total de la prueba es de 6 horas.
- 15 Método tradicional de identificación de *Candida tropicalis* 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 CO₂. La liberación de CO₂ es detectada
- 20 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 5 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 10 durante 24 a 48 horas y son leídas para identificar *C. tropicalis*. El tiempo total mínimo para la identificación es de 9 días.

Método para detectar *C. tropicalis* de la presente invención en muestras sanguíneas: Las muestras de sangre se incuban durante 72 horas en el equipo automatizado BACTEC9240. Cuando hay 15 crecimiento de los microorganismos, estos metabolizan los nutrientes contenidos en el medio de cultivo liberando CO₂. La liberación de CO₂ 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 20 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. tropicalis*. El tiempo total de la prueba es de 3 días.

- 5 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
10 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,
15 pero no limitado a electroforesis en gel de agarosa, hibridaciones 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
20 identificación de *C. tropicalis*. 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 tropicalis* 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 tropicalis*.

| Número de par de oligonucleótido | Seq. ID. No. | Forward (Fw) o Reverse (Rv) | No. de pb | Secuencia 5' a 3' | Longitud del amplicon pb (bp) | Nombre del Config |
|----------------------------------|----------------|-----------------------------|-----------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Ct1 | Seq. ID. No. 1 | Fw | 22 | CTG TCA TGG TTT ATG TTC CAC C | 217 | XM_00254611 3.1 |
| | Seq. ID. No. 2 | Rv | 20 | GAA TCA GTA CCA CCT GGC TC | | |
| Ct2 | Seq. ID. No. 3 | Fw | 18 | CCC AAG AAT GGA CAA GAG | 211 | XM_00254231 |

| | | | | | | |
|-----|--------------------|----|----|----------------------------|-----|---------------------|
| | Seq. ID. No. 4 | Rv | 18 | CTT CAG CAA GTA AGC CAG | | |
| C13 | Seq. ID. No. 5 | Fw | 18 | CAC TGT GAC GAC CAT AGA | 224 | RG_04063 |
| | Seq. ID. No. 6 | Rv | 18 | GCG CCA TAT ATC TGT GTG | | |
| C14 | Seq. ID. No. 7 | Fw | 18 | CGT ATT TCG TGT CGC ATC | 310 | RG_06258 |
| | Seq. ID. No. 8 | Rv | 18 | CTT TGC TGT GTT TGG CAG | | |
| C15 | Seq. ID. No. 9 | Fw | 18 | CAT GTG TAC ACA TGC GAC | 254 | RG_06258 |
| | Seq. ID. No. 10 | Rv | 18 | CTT TGC TGT GTT TGG CAG | | |
| C16 | Seq. ID. No. 11 | Rv | 18 | CAA CCA TGT CGC TGT TAC | 279 | RG_06258 |
| | Seq. ID. No. 12 | Rv | 18 | CTT TGC TGT GTT TGG CAG | | |
| C17 | Seq. ID. No. 13 | Fw | 18 | CAG TTG CAC TCT GTT TGG | 178 | XM_00254551 88.1 |
| | Seq. ID. No. 14 | Rv | 18 | GTT CCC AAA CTT ACA CCG | | |
| C18 | Seq. ID. No. 15 | Fw | 18 | CTC ACT TCG TTA TGG AGC | 359 | XM_00254551 88.1 |
| | Seq. ID. No. 16 | Rv | 20 | CAC CTT TGA TAG GTC TCT CG | | |
| C19 | Seq. ID. No. 17 | Fw | 18 | CTC ACT TCG TTA TGG AGC | 153 | XM_00254551 88.1 |

| | | | | | | |
|------|--------------------|----|----|-------------------------|-----|---------------------|
| | Seq. ID. No. 18 | Rv | 18 | GTT GTC CAA CTG CTC AAG | | |
| Ct10 | Seq. ID. No. 19 | Fw | 18 | CTC ACT TCG TTA TGG AGC | 601 | XM_00254551 88.1 |
| | Seq. ID. No. 20 | Rv | 18 | GAT TGG CAC ACC ATA ACG | | |
| Ct11 | Seq. ID. No. 21 | Fw | 18 | CTC ACT TCG TTA TGG AGC | 662 | XM_00254551 88.1 |
| | Seq. ID. No. 22 | Rv | 18 | CCA CCG GTA CCA AAT ACA | | |

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

- 5 Dichos pares de oligonucleótidos fueron probados para optimizar las condiciones de amplificación. Así, los pares de oligonucleótidos Ct1 a Ct11 tienen temperaturas de alineamiento entre 54°C y 61°C. Estos pares de oligonucleótidos fueron probados en ADN genómico para probar amplificación llevando a cabo reacciones de PCR. Los
- 10 oligonucleótidos están contenidos en una composición que comprende además un vehículo aceptable adecuado, tal como, pero no limitado a, agua, buffer, etc. 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 Genómico | 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 | TCC TCC GCT ATT GAT ATGC | 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.

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

10 **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.

- 15 Los pares de oligonucleótidos Ct1, Ct3 y Ct5 fueron analizados para reflejar la sensibilidad y selectividad de los oligonucleotidos y sondas para identificar *C. tropicalis*. Estos ejemplos son ilustrativos pero no limitativos para el alcance de la invención.

- 20 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 calcularon las temperaturas intermedias.

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

| No. | Oligonucleotido | Umbral de Temperatura (°C) | | | | | | | | Temperatura (°C) |
|-----|-----------------|----------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|------------------|
| | | Min | | | | | | | Max | |
| 1 | Ct1 | 62 | 62.6 | 63.4 | 64.4 | 65.8 | 66.9 | | 68 | 64.4 |
| 2 | Ct3 | 55 | 56.2 | 58 | 60.1 | | 65.5 | 67.1 | 68 | 60.1 |
| 3 | Ct5 | 55 | 56.2 | 58 | 60.1 | 63.1 | 65.5 | 67.1 | 68 | 65.5 |

- Las figuras 2 a 4 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 5 a 7 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. tropicalis*.

| No | Par | Mejor concentración |
|----|------------|---------------------|
| 1 | C11 | 100nM |
| 2 | C13 | 100nM |
| 3 | C15 | 200nM |

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. tropicalis*, el ADN genómico puede ser detectado en una cantidad de al menos 0.5 ng.

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

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

Las figuras 8 a 10 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
10 oligonucleótidos detectan las mismas muestras positivas con una excepción: el par Ct3 de *C. tropicalis* detecta una muestra adicional (carril 11) que los otros dos pares de la misma especie (Ct1 y Ct5). Todos los geles de agarosa están en una concentración del 2% y fueron corridos a 110-130V.

15 Comparando los resultados de PCR con métodos de identificación Vitek, se revela que la prueba de PCR tiene al menos una sensibilidad del 98% y una especificidad de 100% en contraste con pruebas VITEK que tienen un 85% y 33% respectivamente. La prueba Vitek no pudo identificar una muestra de *C. tropicalis* (el resultado fue *C. albicans*), sin
20 embargo el resultado por PCR fue positivo. Para confirmar este resultado, dicha muestra clínica fue reanalizada utilizando API ID32 C (BioMerieux ®), la cual reconfirmó que dicha muestra era

efectivamente *C. tropicalis*. La prueba Vitek identificó tres aislados clínicos como *C. tropicalis*, sin embargo por medio de las pruebas de PCR de la presente invención se les identificó como *C. parapsilosis* y dos *C. albicans*. Estos resultados también fueron confirmados con la
5 prueba API ID32C.

Ejemplo 4: Ensayo multiplex

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

La figura 11 muestra el uso de los pares de oligonucleótidos Ct1, Ct3 y Ct5 simultáneamente en muestras que contienen *C. tropicalis* sola o en
15 mezcla con *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *S. cerevisiae*, en donde cada ADN de cada microorganismo está en una Cantidad de 100 ng. Como se predijo, los fragmentos de amplificación están presentes solo en aquellos carriles que contiene *C. tropicalis*, y no en los carriles control (carriles 3,6, 8 y 11). Por lo tanto se ha diseñado un
20 kit multiplex para detectar *C. tropicalis* con un 100% de sensibilidad y especificidad.

Ejemplo 5. Ensayo de Especificidad.

La figura 12 p neles A a C muestran que los oligonucleótidos probados son específicos para *C. tropicalis* y no cruzan con otras especies microbianas. Por ejemplo, se probó el ADN de *C. tropicalis* mezclado con otras 10 especies microbianas tales como *C. parapsilosis*, *C.*
5 *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. tropicalis* 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
10 tamaño predicho (217 pb para Ct1, 224 pb para Ct3 y 254 pb para Ct5) y su prueba de resecuenciación. El control negativo sin ADN de *C. tropicalis* no mostró ninguna banda de amplificación. Esto confirma que el ensayo es 100% específico para *C. tropicalis*.

Finalmente, del total de muestras clínicas probadas, 13 fueron
15 clasificadas como *C. tropicalis* con un 100% de sensibilidad y especificidad, en comparación con la prueba Vitek.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

- 1.- Un oligonucleótido para la identificación específica de *Candida tropicalis*, caracterizado porque consiste de un ácido nucleico que
5 tiene al menos un 90% de homología de secuencia con una de las SEQ. ID. Nos. 1 a 22 o un complemento de las mismas.
- 2.- Un método in vitro para la identificación específica de *C. tropicalis*, caracterizado porque comprende los pasos de: a) amplificar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica con al menos un
10 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
15 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.
- 20 5.- Un kit para la identificación específica de *Candida tropicalis*, 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
5 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 tropicalis*, las secuencias asociadas a dicha identificación, así como kits de diagnóstico para identificar *Candida tropicalis*.

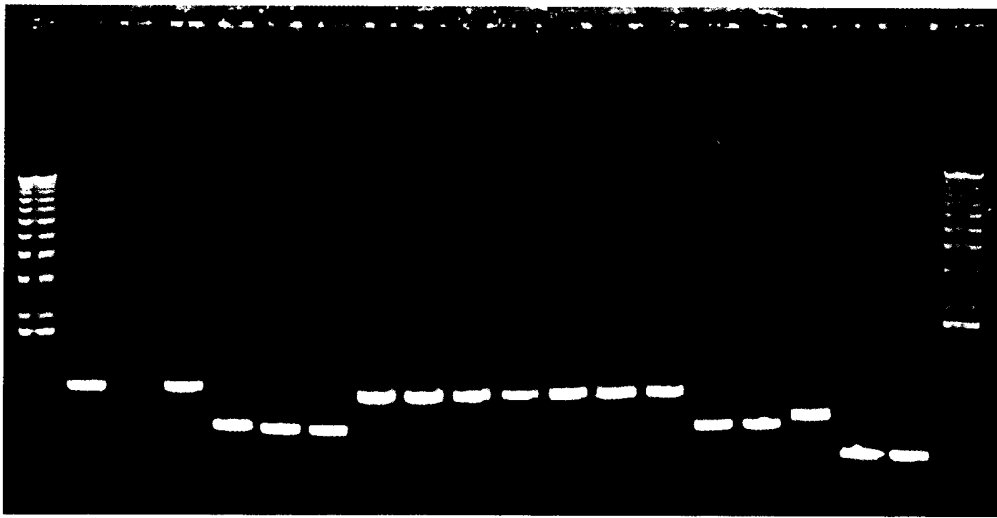


FIGURA 1

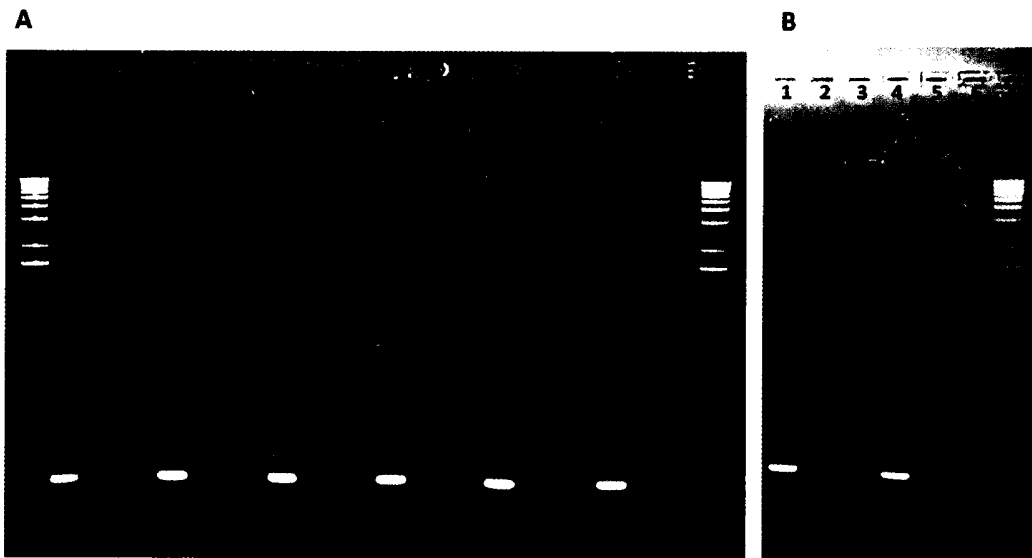


FIGURA 2

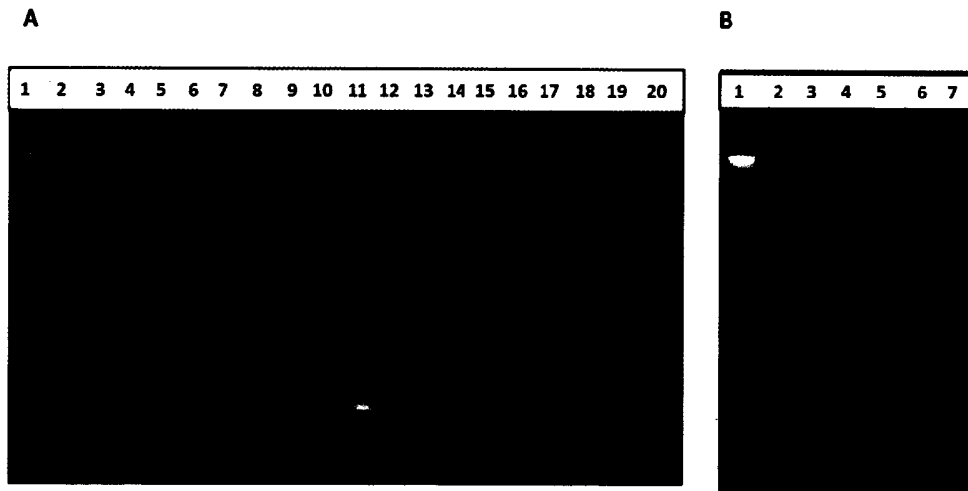


FIGURA 3

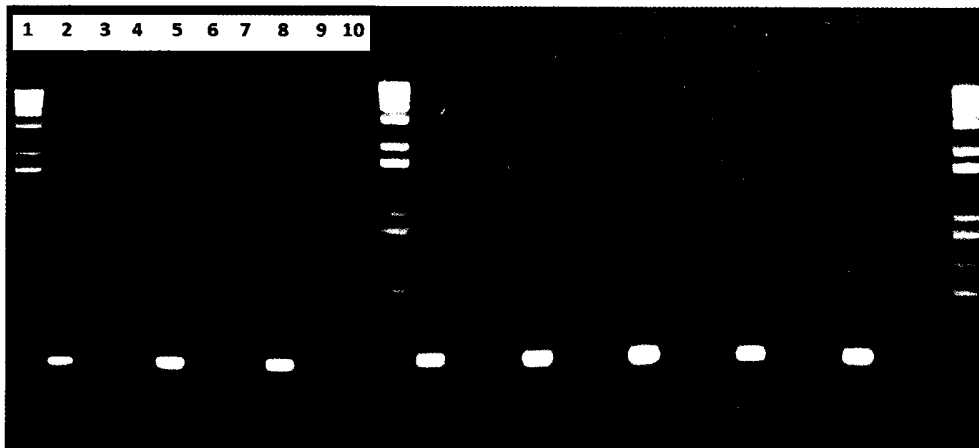


FIGURA 4

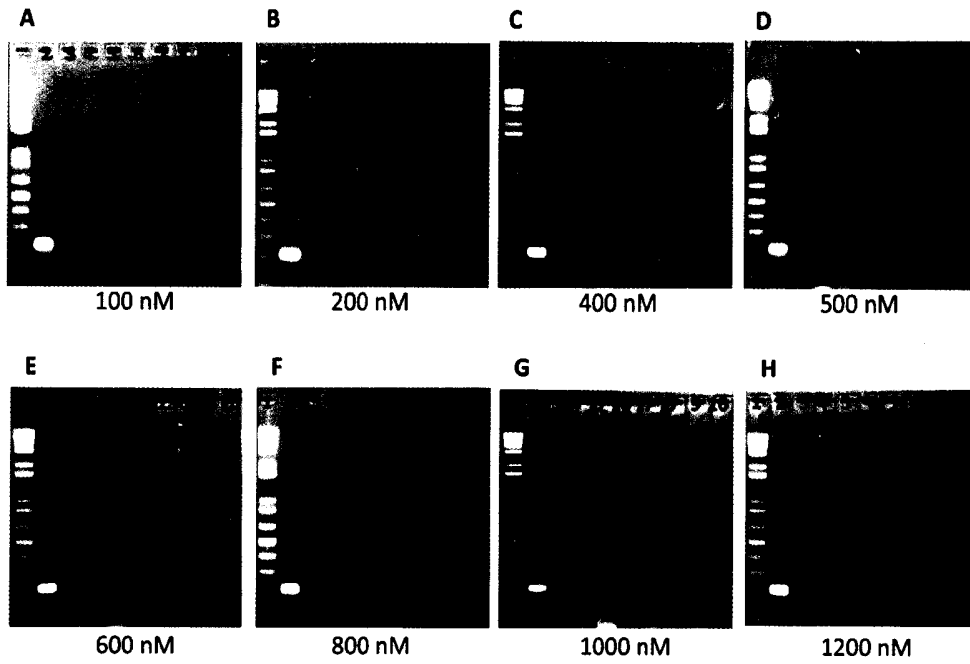


FIGURA 5

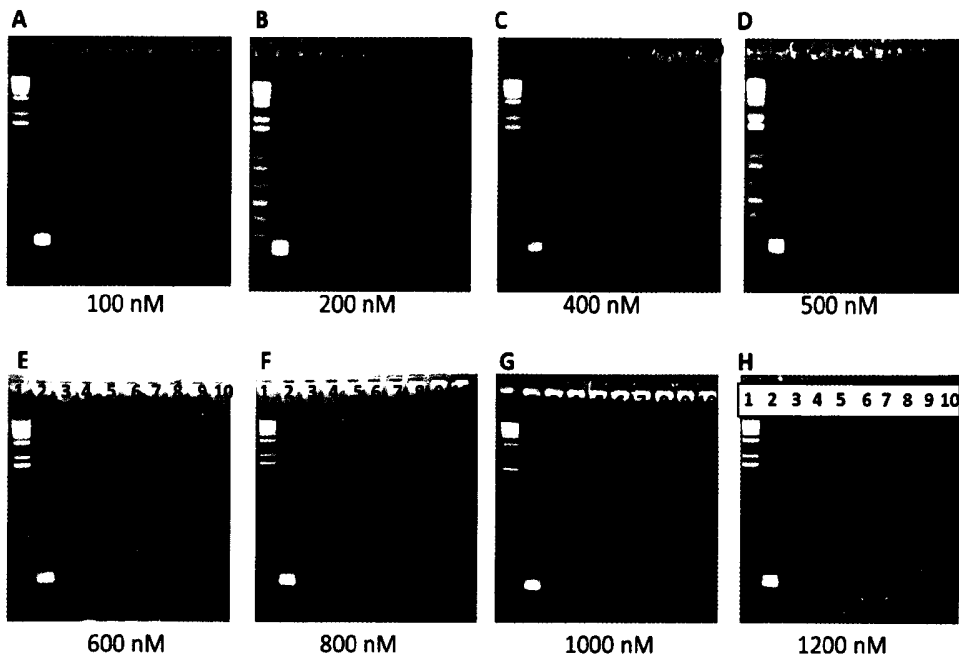


FIGURA 6

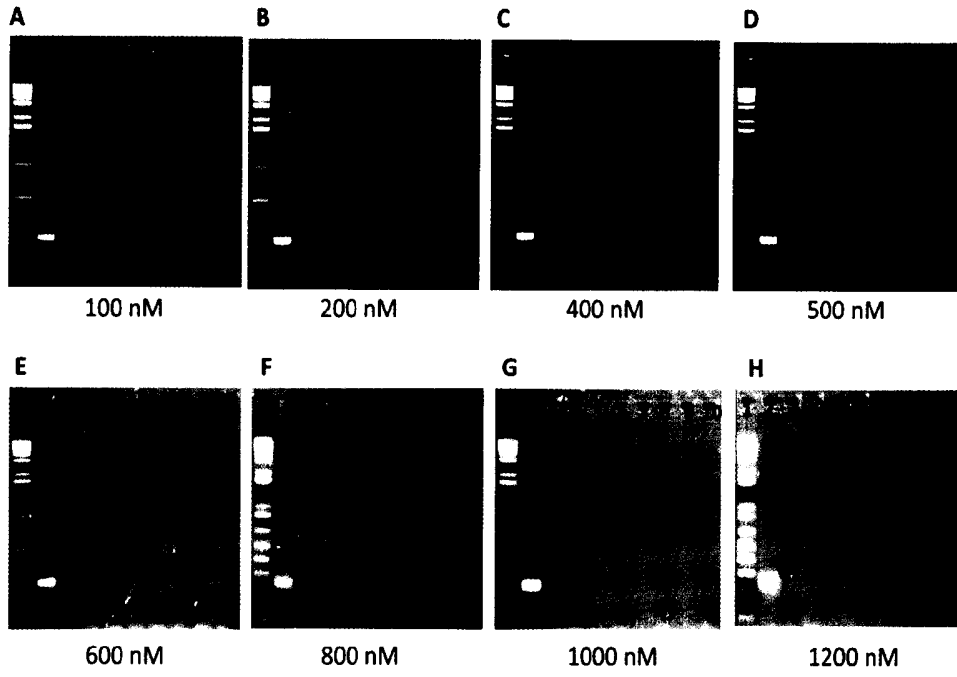


FIGURA 7

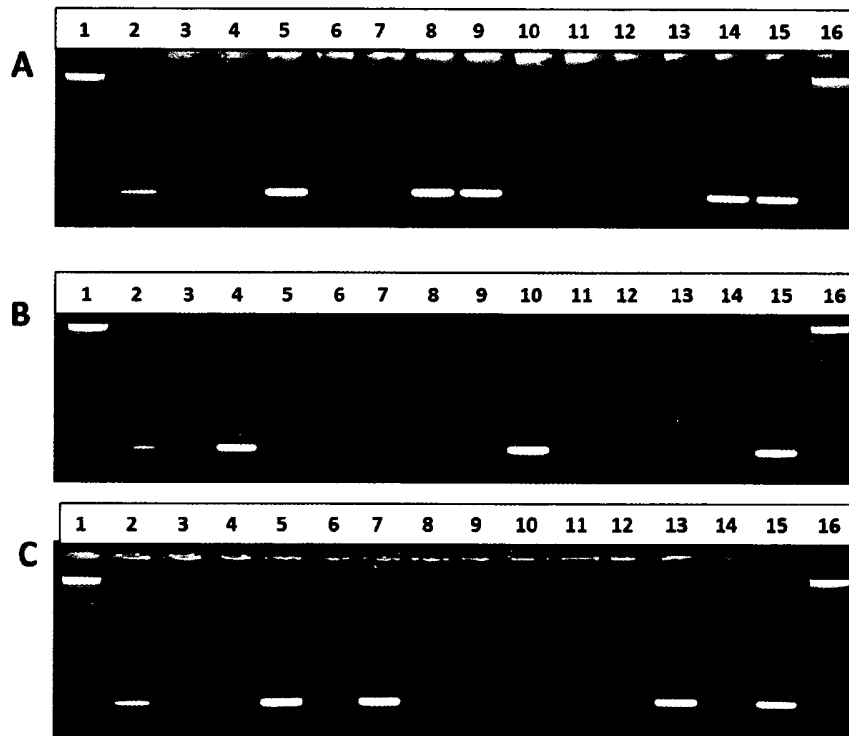


FIGURA 8

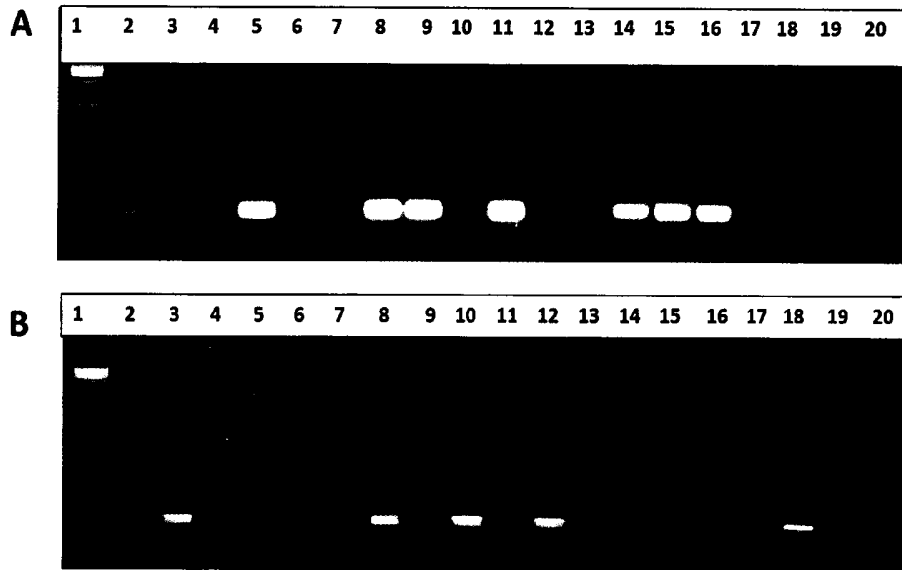


FIGURA 9

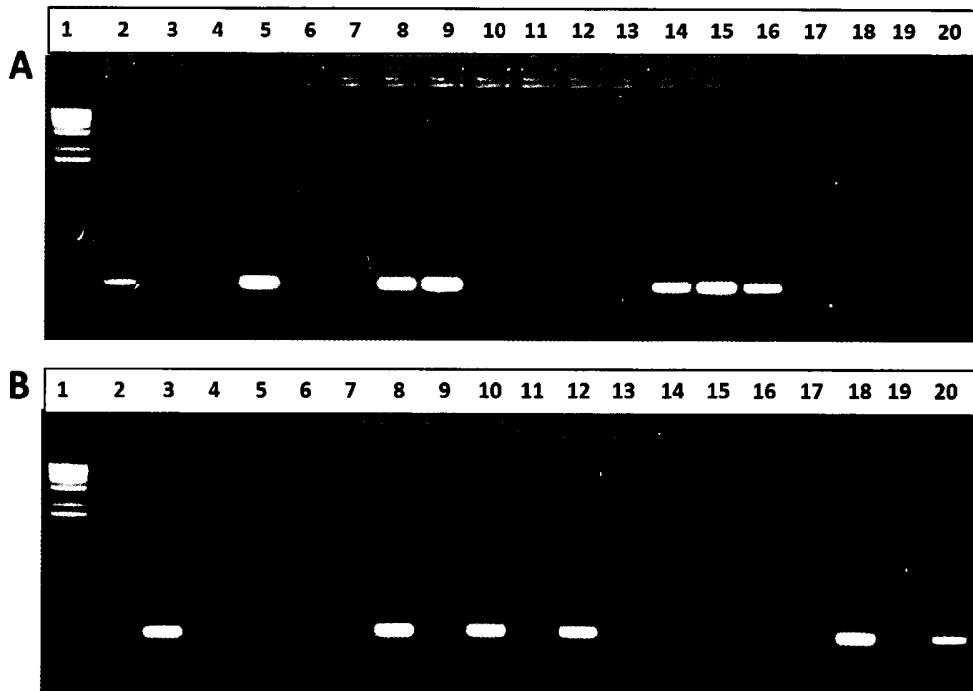


FIGURA 10

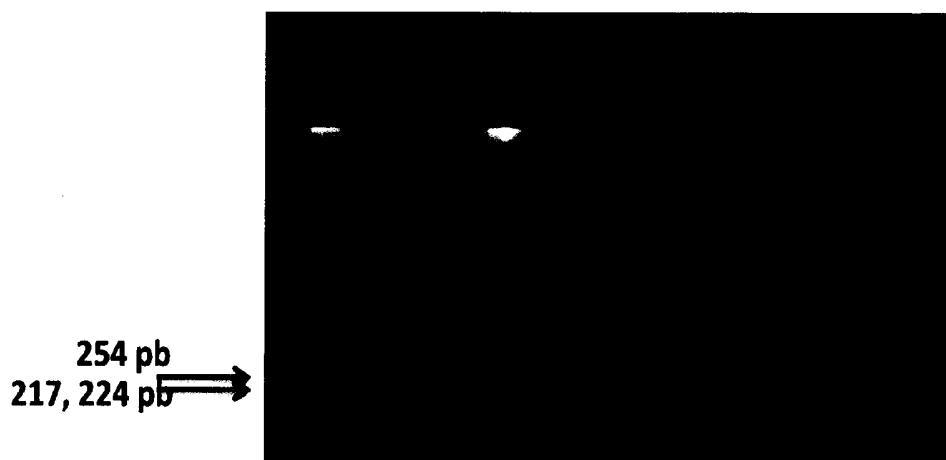


FIGURA 11

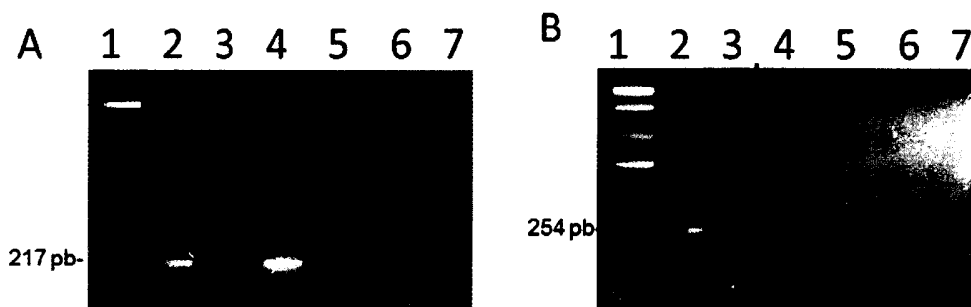


FIGURA 12

LISTADO DE SECUENCIAS

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

CASTAÑO NAVARRO, IRENE BEATRIZ

5 DE LAS PEÑAS NAVA, ALEJANDRO

<120> **OLIGONUCLEOTIDOS DE *Candida tropicalis*, METODO DE DETECCION Y KIT DE LOS MISMOS**

<130> 1009.21

<150> 61/894,974

10 <151> 2013-10-24

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 22

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 1

ctgtcatggt ttatgttcca cc 22

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

25 <400> 2

gaatcagtac cacctggctc 20

<210> 3
<211> 20
5 <212> DNA
<213> Candida tropicalis
<400> 3
gaatcagtac cacctggctc 20

10
<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Candida tropicalis
15 <400> 4
cttcagcaag taagccag 18

<210> 5
<211> 18
20 <212> DNA
<213> Candida tropicalis
<400> 5
cactgtgacg accataga 18

25 <210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 6

5 gcgccatata tctgtgtg 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

10 <213> *Candida tropicalis*

<400> 7

cgtatttcgt gtcgcatc 18

<210> 8

15 <211> 18

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 8

ctttgctgtg tttggcag 18

20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

25 <400> 9

| | | |
|----|--------------------------|----|
| | catgtgtaca catgcgac | 18 |
| | <210> 10 | |
| | <211> 18 | |
| 5 | <212> DNA | |
| | <213> Candida tropicalis | |
| | <400> 10 | |
| | cttgctgtg ttggcag | 18 |
| 10 | <210> 11 | |
| | <211> 18 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Candida tropicalis | |
| | <400> 11 | |
| 15 | caaccatgtc gctgttac | 18 |
| | <210> 12 | |
| | <211> 18 | |
| | <212> DNA | |
| 20 | <213> Candida tropicalis | |
| | <400> 12 | |
| | cttgctgtg ttggcag | 18 |
| 25 | <210> 13 | |

<211> 18

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 13

5 cagttgcact ctgtttgg 18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

10 <213> *Candida tropicalis*

<400> 14

gttcccaaac ttacaccg 18

<210> 15

15 <211> 18

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 15

ctcacttcgt tatggagc 18

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

25

<400> 16

caccttgat aggtctctcg 20

5 <210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 17

10 ctcacttcgt tatggagc 18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

15 <213> *Candida tropicalis*

<400> 18

gtgtccaac tgctcaag 18

<210> 19

20 <211> 18

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 19

ctcacttcgt tatggagc 18

25

<210> 20
<211> 18
<212> DNA
5 <213> *Candida tropicalis*
<400> 20
gattggcaca ccataacg 18

<210> 21
10 <211> 18
<212> DNA
<213> *Candida tropicalis*
<400> 21
ctcacttcgt tatggagc 18

15
<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> *Candida tropicalis*
20 <400> 22
ccaccgtac caatata 18