



(11) **MX 2014012840 A**

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **06/05/2015** (51) Int. Cl: **C12Q 1/68** (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **23/10/2014**
(21) Número de solicitud: **2014012840** **C12Q 1/04** (2006.01)
C12Q 1/00 (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 Jose 2055 SAN LUIS POTOSI
San Luis Potosí 78216 MX**

(54) Título: **OLIGONUCLEOTIDOS DE CANDIDA ALBICANS, 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 albicans, las secuencias asociadas a dicha identificación, así como kits de diagnóstico para identificar Candida albicans.

(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 ALBICANS*, 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 substancialmente 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
25 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. Ejemplos de este tipo de invenciones son divulgadas en EP2235214B1, AU2014202147A1, CN103740834A, US2013309683A1, las cuales se incorporan solo como referencia y no deben ser consideradas como estado de la técnica para la presente invención. Adicionalmente, se han diseñado métodos de detección moléculas de diversas especies de *Candida*, en donde hay un oligonucleótido en común y un oligonucleótido adicional especie específico, sin embargo estos métodos también necesitan análisis posteriores para diferenciar cada especies. Ejemplos de tales invenciones se describen en los documentos CA2407226C, EP1960536B1, EP2315853B1, US8501408B2, US2013034856A1, los cuales son incorporados únicamente como referencia y no deben ser considerados como estado de la técnica para la presente invención.

Buchman et al. fueron los primeros en describir el uso de PCR para la identificación de *C. albicans* en muestras clínicas (Buchman et al., Surgery 108:338-47 (1990)). Estos investigadores utilizaron PCR para amplificar parte de un gen específico que codificaba para la citocromo lanosterol 14-afla desmetilasa. El producto de PCR predicho tenía aproximadamente 240 pb, sin embargo se observaban patrones de amplificación inexplicables en diversas muestras clínicas que contenían ADN de *C. albicans*. Adicionalmente, el set de primer utilizados por Buchman et al. Amplificaban ADN de especies distintas

de *C. albicans*, resultando en productos de PCR con el tamaño "predicho" de 240 pb.

Se han reportado diversas especies de *Candida* que tienen rearrreglos cromosomales que pueden causar la pérdida de material genético.

5 (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 albicans*, con al menos un
10 oligonucleótido específico, así como con un set multiplex en bloque de oligonucleótidos específicos, lo cual permite la identificación de *Candida albicans* en muestras clínicas de diferentes subgrupos de población.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

15 La presente invención describe y reclama oligonucleótidos para la identificación específica de *Candida albicans*, 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 12 o un complemento de las mismas.

En una modalidad adicional, se describe además un método in vitro
20 para la identificación específica de *C. albicans*, 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
25 de ADN es llevada a cabo con al menos un par de oligonucleótidos o al menos dos pares de oligonucleótidos.

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. albicans* (SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca2. Las bandas inespecíficas para *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* desaparecen al aumentar la temperatura de alineamiento, para este par de oligonucleótidos, la temperatura óptima es de 67.7°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. albicans* tiene una longitud de 202 bp. Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene); Carriles 2-7 temperatura de alineamiento de 61°C: 2: control positivo *C. albicans*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. glabrata*; 5: *C. parapsilosis*; 6: *C. dubliniensis*. Carriles 7-11 temperatura de alineamiento 61.7°C: 7: Control positivo *C. albicans*; 8: control negativo sin ADN; 9: *C. glabrata*; 10: *C. parapsilosis*; 11: *C. dubliniensis*. Carriles 12-16 temperatura de alineamiento 62.6°C: 12: control positivo *C. albicans*; 13: control negativo sin ADN; 14: *C. glabrata*; 15: *C. parapsilosis*; 16: *C. dubliniensis*. Carriles 17 y 18: marcador de peso

molecular. Carriles 19-23 temperatura de alineamiento 63.8°C. 19 control positivo *C. albicans*; 20: control negativo sin ADN; 21: *C. glabrata*; 22: *C. parapsilosis*; 23: *C. dubliniensis*. Carriles 24-28 temperatura de alineamiento 65.4°C: 24: control positivo *C. albicans*;
5 25: control negativo sin ADN; 26: *C. glabrata*; 27: *C. parapsilosis*; 28: *C. dubliniensis*. Carriles 29-33 temperatura de alineamiento 66.7°C 29: control positivo *C. albicans*; 30: control negativo sin ADN; 31: *C. glabrata*; 32: *C. parapsilosis*; 33: *C. dubliniensis*. 34 y 35: marcador de peso molecular. Carriles 36 -40 temperatura de alineamiento 67.6°C: 36:
10 control positivo *C. albicans*; 37: control negativo sin ADN; 38: *C. glabrata*; 39: *C. parapsilosis*; 40: *C. dubliniensis*. Carriles 41-45 temperatura de alineamiento 68°C: 41: control positivo *C. albicans*; 42: control negativo sin ADN; 43: *C. glabrata*; 44: *C. parapsilosis*; 45: *C. dubliniensis*. Carril 46: marcador de peso molecular.

15 **Figura 3:** Gel de agarosa al 2% mostrando el gradiente de temperatura para la detección de *C. albicans* (SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca5. La banda inespecífica para *C. guilliermondii* desaparece al aumentar la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, para este par de oligonucleótidos, la temperatura
20 óptima seleccionada es 63.5 °C. Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene); Carriles 2-4, temperatura de alineamiento 56°C. 2: control positivo *C. albicans*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. guilliermondii*. Carriles 5-7, temperatura de alineamiento 57.1°C. 5: control positivo *C. albicans*; 6: control negativo sin ADN; 7: *C. guilliermondii*. Carriles 8-10, temperatura de alineamiento 58.8°C. 8:
25 control positivo *C. albicans*; 9: control negativo sin ADN; 10: *C. guilliermondii*. Carriles 11-13, temperatura de alineamiento 60.8°C. 11: control positivo *C. albicans*; 12: control negativo sin ADN; 13: *C. guilliermondii*. Carriles 14-16, temperatura de alineamiento 63.5°C. 14:

control positivo *C. albicans*;15: control negativo sin ADN;16: *C. guillemontii*. Carriles 17-19, temperatura de alineamiento 65.7°C. 17: control positivo *C. albicans*; 18: control negativo sin ADN; 19: *C. guillemontii*. Carriles 20-21: marcador de peso molecular. Carriles 22-24, temperatura de alineamiento 67.2°C. 22: control positivo *C. albicans*; 223: control negativo sin ADN; 4: *C. guillemontii*. Carriles 25-27, temperatura de alineamiento 68°C. 25: control positivo *C. albicans*; 26: control negativo sin ADN; 27: *C. guillemontii*.

Figura 4. Gel de agarosa al 2% mostrando el gradiente de temperatura para la detección de *C. albicans*(SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca6. Para este par de oligonucleótidos, la temperatura óptima seleccionada es 60.8°C. Para la electroforesis, las muestras fueron corridas a una concentración 4 veces mayor que aquella utilizada en los controles. Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene); Carriles 2-4, temperatura de alineamiento 56°C. 2: control positivo *C. albicans*; 3: control negativo sin ADN; 4: *C. guillemontii*. Carriles 5-7, temperatura de alineamiento 57.1°C. 5: control positivo *C. albicans*; 6: control negativo sin ADN; 7: *C. guillemontii*. Carriles 8-10, temperatura de alineamiento 58.8°C. 8: control positivo *C. albicans*; 9: control negativo sin ADN; 10: *C. guillemontii*. Carriles 11-13, temperatura de alineamiento 60.8°C. 11: control positivo *C. albicans*; 12: control negativo sin ADN; 13: *C. guillemontii*. Carriles 14-16, temperatura de alineamiento 63.5°C. 14: control positivo *C. albicans*;15: control negativo sin ADN;16: *C. guillemontii*. Carriles 17-19, temperatura de alineamiento 65.7°C. 17: control positivo *C. albicans*; 18: control negativo sin ADN; 19: *C. guillemontii*. Carriles 20-21: marcador de peso molecular. Carriles 22-24, temperatura de alineamiento 67.2°C. 22: control positivo *C. albicans*; 223: control negativo sin ADN; 4: *C. guillemontii*. Carriles 25-

27, temperatura de alineamiento 68°C. 25: control positivo *C. albicans*; 26: control negativo sin ADN; 27: *C. guillemontii*.

Figura 5 Paneles A-H. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de concentración de oligonucleótidos para la detección de *C. albicans* (SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca2. 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. albicans*; 3: control negativo sin ADN; 4 *C. glabrata*; 5: *C. tropicalis*; 6: *C. parapsilosis*; 7: *C. dubliniensis*; 8: *C. bracarensis*; 9: *C. guillemontii*; 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. albicans* (SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca5. 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. albicans*; 3: control negativo sin ADN; 4 *C. glabrata*; 5: *C. tropicalis*; 6: *C. parapsilosis*; 7: *C. dubliniensis*; 8: *C. bracarensis*; 9: *C. guillemontii*; 10: *C. krusei*.

Figura 7 Paneles A-I. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de concentración de oligonucleótidos para la detección de *C. albicans* (SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca6. Para este par de

oligonucleótidos, la concentración óptima seleccionada es 300 nM. En todos los paneles A a I: A: 100nM; B 200nM; C 300nM; D 400 nM; E 500nM; F 600nM; G 800 nM; H 1000nM; I 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. albicans*; 3: control negativo sin ADN; 4 *C. glabrata*; 5: *C. tropicalis*; 6: *C. parapsilosis*; 7: *C. dubliniensis*; 8: *C. bracarensis*; 9: *C. guilliermondii*; 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. albicans* (SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca2. Se detectaron 12 muestras positivas. En todos los paneles A-C, carriles 1 y 16: marcador de peso molecular (1 Kb ADN Ladder Invitrogene). Carril 2: control positivo *C. albicans*. 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. albicans* (SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca6. Se detectaron 12 muestras positivas. En los paneles A y B, 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.

Figura 10 Paneles A-B. Geles de agarosa al 2% mostrando el análisis de 36 muestras de aislados clínicos para la detección de *C. albicans* (SC5314) utilizando el par de oligonucleótidos Ca6. Se detectaron 11 muestras positivas el aislado AN17 no fue detectado como positivo con Ca6, pero fue positivo con Ca2 y Ca5 (carril 10). En los paneles A y B: 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.

Figura 11: Gel de agarosa mostrando una prueba multiplex para *C. albicans*. Los pares de oligonucleótidos Ca2, Ca5 y Ca6 fueron probados en diversas condiciones. Los tamaños de amplificación predichos de 173, 202 y 203 pb fueron detectados en muestras que

5 contenían únicamente *C. albicans*. 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. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *S. cerevisiae*, 100 ng de cada

10 uno. 4: marcador de peso molecular. 5: *C. albicans*. 6: control negativo sin ADN. 7: *C. albicans*. 8: *C. glabrata*. 9: *C. tropicalis*. 10: *C. parapsilosis*. 11: *C. dubliniensis*.

Figura 12 Paneles A-C. Panel A: Gel de agarosa al 2% mostrando la prueba de especificidad con el par de oligonucleótidos Ca2. Panel B:

15 Gel de agarosa al 2% mostrando la prueba de especificidad para el par de oligonucleótidos Ca5. Panel C: Gel de agarosa al 2% mostrando la prueba de especificidad para el par de oligonucleótidos Ca6. 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. albicans*. Carril 3: control negativo sin ADN. Carril 5: *C. albicans* 100ng mas 50ng de cada una de: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *S. cerevisiae*. Carril 5 *C. albicans* 10ng más 50ng de cada uno de: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*,

20 *C. bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *S. cerevisiae* each. Carril 6: *C. albicans* 1ng más 50ng de cada uno de: *C. tropicalis*, *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.*

tropicalis, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *S. cerevisiae*.

Figura 13. Ejemplo de PCR en tiempo real con el par de oligonucleótidos Ca2. Panel A: curva resultante de PCR después de 40
5 ciclos. Eje de ordenadas: número de ciclos. Eje de las abscisas: ΔRn . Panel B: resultado de número de copias. Eje de ordenadas: cantidad, eje de las abscisas: C_T .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención divulga un método in vitro para detectar e
10 identificar *Candida albicans*, 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 albicans* en muestras clínicas de diferentes subgrupos de población con un 100% de especificidad y sensibilidad.

15 Diversos oligonucleótidos han sido diseñados para detectar específicamente distintos sitios cromosomales de *Candida albicans*. 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
20 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 separados o en un solo ensayo
25 multiplex. *Candida albicans* puede ser detectada por cualquier método de amplificación tal como PCR, RT-PCR, Q-PCR, Southern blot, Dot blot, multiplex-PCR, nested-PCR, o cualquier otro método de amplificación o detección de ácidos nucleicos.

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.

- 5 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
- 10 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.
- 15 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
- 20 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,
- 25 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 diversos oligonucleótidos para la identificación de *C. albicans*, en donde dichos oligonucleótidos
5 comprenden una secuencia contigua de aproximadamente 18 a 21 nucleotidos de una secuencia blanco. Dicha secuencia blanco está localizada a lo largo de los cromosomas de dicha *C. albicans*, en sitios exclusivos que permiten reacciones no-cruzadas con cualquier otro tipo de organismo, incluyendo otras especies de *Candida* y ácidos
10 nucleicos microbianos o eucariotas que pudieran estar contenidas en una muestra biológica.

Asimismo, los oligonucleótidos para la identificación específica de *Candida albicans*, consisten de un ácido nucleico que tiene al menos un 90% de homología de secuencia con una de las SEQ ID Nos. 1 a 12 o
15 complementos de la misma.

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

Esta invención también describe un método in vitro para la identificación de *C. albicans*, 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
25 menos uno de los oligonucleótidos diseñados, tales como aquellos descritos en las SEQ ID Nos. 1 a 12 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 albicans*, 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 albicans* tales como aquellos descritos en las SEQ ID Nos. 1 a 12 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 albicans*.

Como una modalidad adicional, la presente invención describe al menos una sonda útil para la identificación de *Candida albicans*. 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 albicans* 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. albicans* es de 6 días, con una sensibilidad de alrededor del 85%.

En el método para identificar *C. albicans* 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 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. albicans*. El tiempo total de la prueba es de 6 horas.

Método tradicional de identificación de *Candida albicans* 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 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. albicans*. El tiempo total mínimo para la identificación es de 9 días.

Método para detectar *C. albicans* 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 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 centrifugan, se descarta el sobrenadante, se resuspende y se hierva 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. albicans*. 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
5 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
10 generados en las regiones descritas, tales como, pero no limitado a las 12 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, hibridaciones tipo Dot-Blot, Southern Blot, Northern Blot y similares; RT-PCR, PCR-ELISA, y los
15 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. albicans*. Cabe señalar que dichos oligonucleótidos pueden estar conformados por nucleótidos sin marcar
20 o marcados, como por ejemplo, pero no limitado a, marca radioactiva, marca quimiluminiscente, luminiscente, fluorescente, biotinilada.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Diseño de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos y sondas de *Candida albicans* 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 albicans*.

Número de par de oligonucleótido	Seq. ID. No.	Forward (Fw) o Reverse (Rv)	No. de pb	Secuencia 5' a 3'	Longitud del amplicon pb	Nombre del Contig
Ca1	Seq. ID. No. 1	Fw	18	AAAGAGCCTGCGACTATG	322	XM_707573.1 (ALS3-like)
	Seq. ID. No. 2	Rv	18	GGCTGATTCTTCGGTTG		
Ca2	Seq. ID. No. 3	Fw	20	CTACTCCACAGCTGCTTCC	202	XM_707573.1 (Chrom R)
	Seq. ID. No. 4	Rv	20	GTTGAAGTGCAGATGGAGC		
Ca3	Seq. ID. No. 5	Fw	20	CCTCCTGTAGTATTCTCCC	266	WG_03305 (MYO5)
	Seq. ID. No. 6	Rv	20	GGAGGGAAGAGATGGTATC		
Ca4	Seq. ID. No. 7	Fw	20	CATCAATACCACCCACAA GC	221	WG_03305 (MYO5)
	Seq. ID. No. 8	Rv	20	CACCTACTGGAATCCTCCTC		
Ca5	Seq. ID. No. 9	Fw	20	GGTAGCTGGATCTACAGTTC	203	WG_03305 (Chrom 4)
	Seq. ID. No. 10	Rv	18	GAACAACGTATCTCCACG		
Ca6	Seq. ID. No. 11	Fw	18	CAGTGAACGGAAGCTAAG	173	WG_03102 (Chrom R)
	Seq. ID. No. 12	Rv	21	CTCTTGATTAACCTGGCCA GG		

Por ejemplo, el par de oligonucleótidos Ca2 está localizado en el Cromosoma R, se encuentra en el CGD (*Candida* Genome Database) como ALS3 orf19.1816 en Ca21 chrR_Ca_SC5314 nt 1535813-1532346. El par de oligonucleótidos Ca5 se localiza en MYO5 orf19.738 en Ca21 chr4_Ca_SC5314 nt 1096185-1092235. Los pares de oligonucleótidos Ca3 y Ca4 están localizados en la región intergénica entre la proteína hipotética CaO19.740 mRNA y CAWG_03305, proteína MYO5 mRNA. El par de oligonucleótidos Ca6 está localizado en el Cromosoma R en el Supercontig 2: 2296345-2296656 + Broad Institute MIT Data *Candida* CAWG_031102.

Dichos pares de oligonucleótidos fueron probados para optimizar las condiciones de amplificación. Así, los pares de oligonucleótidos Ca 1 a Ca6 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. 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	TCCTCCGCTATTGATATGC	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 albicans*, 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.

Tres pares de oligonucleótidos se muestran para reflejar la sensibilidad y selectividad de los 12 oligonucleotidos y sondas para identificar *C. albicans*. Estos ejemplos son ilustrativos pero no limitativos para el alcance de la invención.

Condiciones óptimas de reacción de PCR: tres pares de oligonucleótidos seleccionados fueron probados para las 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.

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

No.	Par de Oligonucleótido	Umbral de Temperatura (°C)								Mejor Temperatura (°C)
		Min							Max	
1	Ca2	61	61.7	62.6	63.8	65.4	66.7	67.6	68	67.6
2	Ca5	56	57.1	58.8	60.8	62.8	65.7	67.2	68	63.5
3	Ca6	56	57.1	58.8	60.8	63.5	65.7	67.2	68	60.8

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 gels 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. albicans*.

No	Par	Mejor concentración
1	Ca2	200nM
2	Ca5	200nM
3	Ca6	300nM

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. albicans*, el ADN genómico puede ser detectado en una cantidad de al menos 1 ng.

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

Los pares de oligonucleótidos arriba ejemplificados fueron probados para detectar *Candida albicans* 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 oligonucleótidos detectan las mismas muestras positivas excepto Ca6 de *C. albicans*, la cual detectó una muestra menos que los otros dos pares de la misma especie (Ca2 y Ca5). Todos los geles de agarosa están a una concentración del 2% y fueron corridos a 110-130 V.

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.

Ejemplo 4: Ensayo multiplex

Dado que es posible tener rearrreglos dentro del genoma de *C. albicans*, como se muestra en la muestra clínica 17 (ver figura 10, carril 20), 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 rearrreglo dentro de una muestra clínica es bajo.

La figura 11 muestra el uso de los pares de oligonucleótidos Ca2, Ca5, y Ca6 simultáneamente en muestras que contienen *C. albicans* solo o en mezcla con *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *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. albicans*, y no en los carriles control (carriles 3,6, 8 y 11). Por lo tanto se ha diseñado un kit multiplex para detectar *C. albicans* 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. albicans* y no cruzan con otras especies microbianas. Por ejemplo, se probó el ADN de *C. albicans* mezclado con otras 10 especies microbianas tales como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *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. albicans* 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 (202 pb para Ca2, 203 pb para Ca5 y 173 para Ca6) y su prueba de resecuenciación. El control negativo sin ADN de *C. albicans* no mostró ninguna banda de amplificación. Esto confirma que el ensayo es 100% específico para *C. albicans*.

Finalmente, para la totalidad de muestras clínicas probadas, 12 fueron clasificadas como *C. albicans* con una sensibilidad y especificidad del 100%, comparado con pruebas Vitek.

Ejemplo 6 Ensayo de PCR tiempo real.

Se generó un control positivo subclonando amplicones derivados de los pares de oligonucleótidos en un vector adecuado, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN fue calculada por lecturas de absorbancia 260/280.

Las reacciones de PCR tiempo real fueron llevadas a cabo como sigue: Temperatura de alineamiento 67 C, concentración de oligonucleótidos 150 nM (forward y reverse), cada punto de la curva standard se corrió por duplicado en diluciones de 10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 . Se corrieron 40 ciclos. El rango de detección lineal fue de 10^8 a menos de 100 copias por reacción. Para confirmar la calidad de la amplificación, los productos del PCR tiempo real fueron resecuenciados por quintuplicado y corresponden a la secuencia predicha del amplicon. Dado que las

muestras no formaron dímeros de primer, esto indica que la capacidad del PCR tiempo real para amplificar eficientemente un blanco específico no sólo del plásmido control positivo, sino también de ADNs más complejos, tales como muestras clínicas. En muestras clínicas, no

5 hay diferencias significativas en el parámetro C_t (datos no mostrados). La figura 13 muestra un ejemplo de la curva estándar de PCR tiempo real utilizando uno de los pares de oligonucleótidos (Ca2). Como se muestra en el panel B, el número de copias detectadas es 85 copias. Cuando se resecuenció, el amplicón contenía la secuencia predicha

10 de 202 pb con un 100% de coincidencia.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

- 1.- Un oligonucleótido para la identificación específica de *Candida albicans*, 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 12 o un complemento de las mismas.
- 2.- Un método in vitro para la identificación específica de *C. albicans*, 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 albicans*, 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
25 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 INVENCIÓN

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

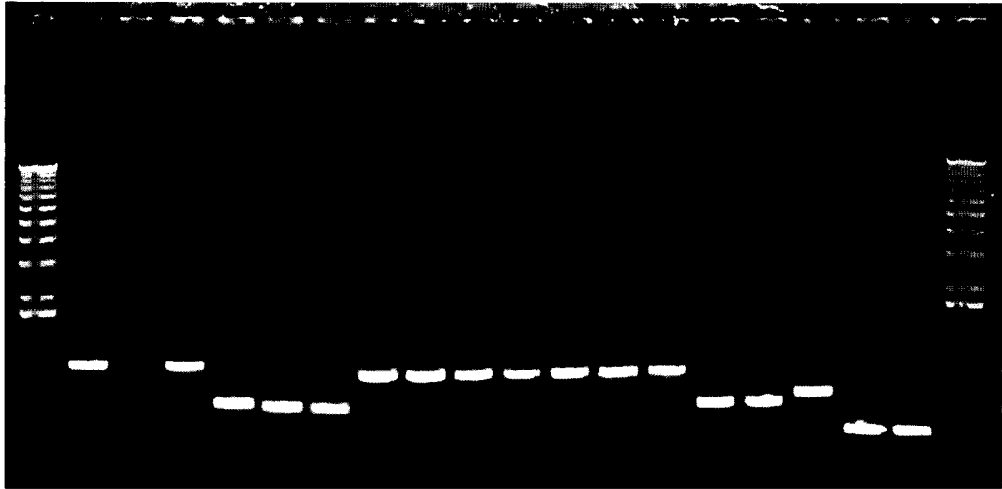


FIGURA 1

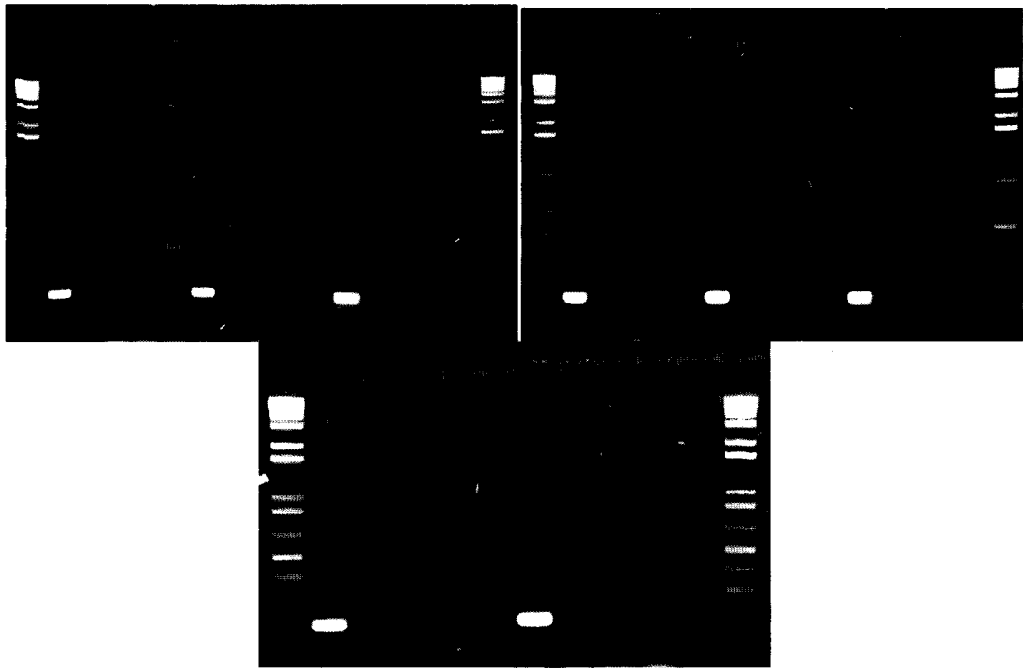


FIGURA 2

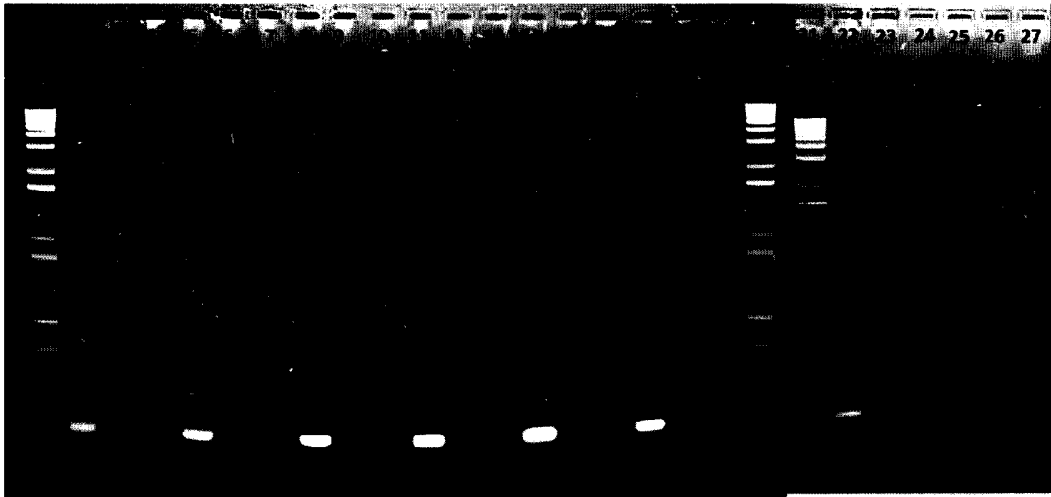


FIGURA 3

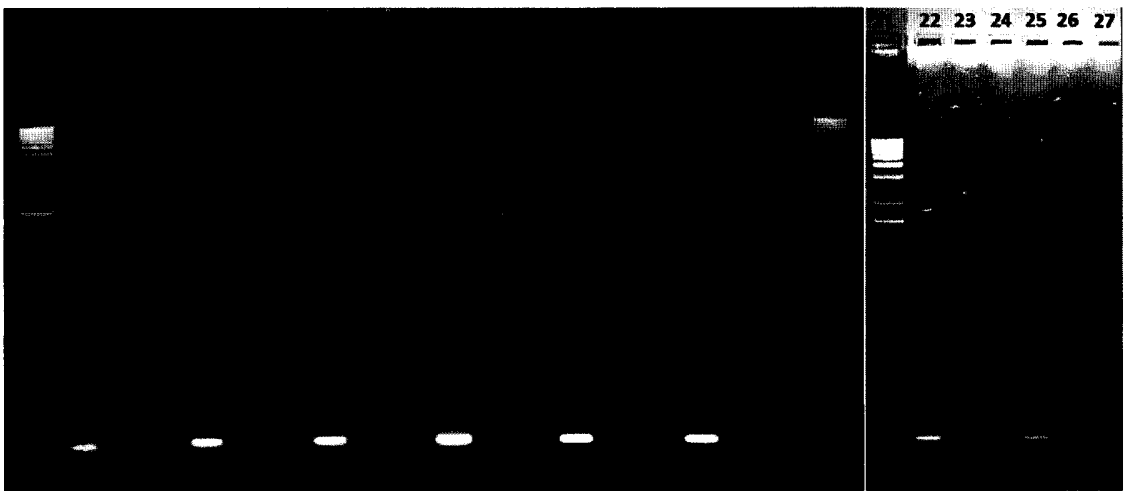


FIGURA 4

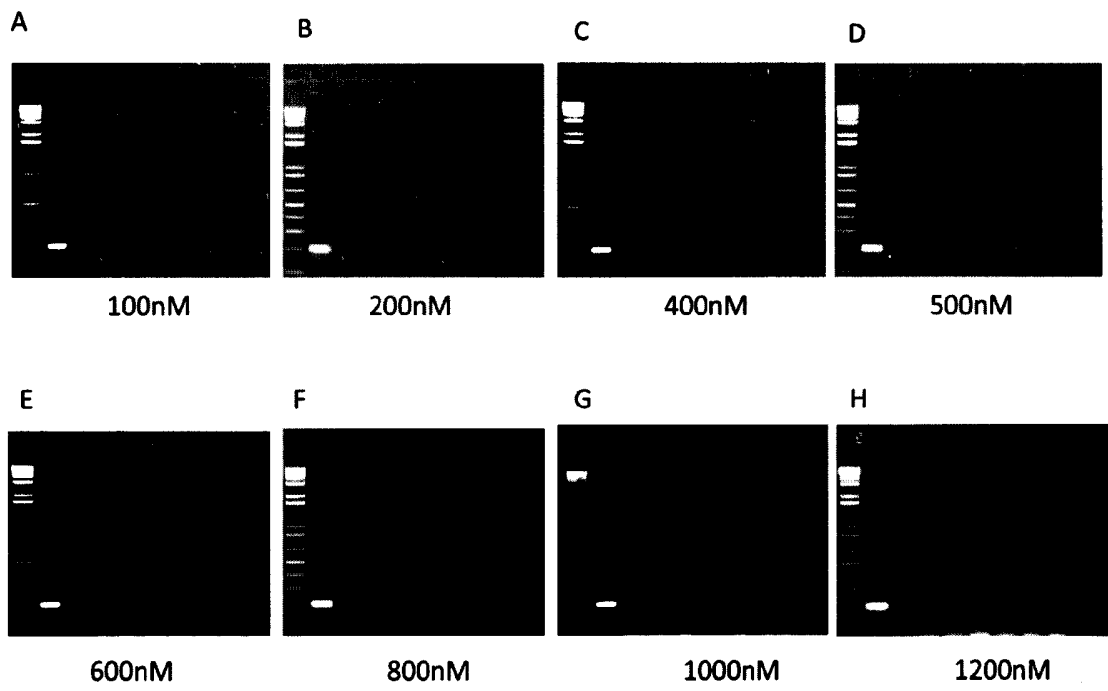


FIGURA 5

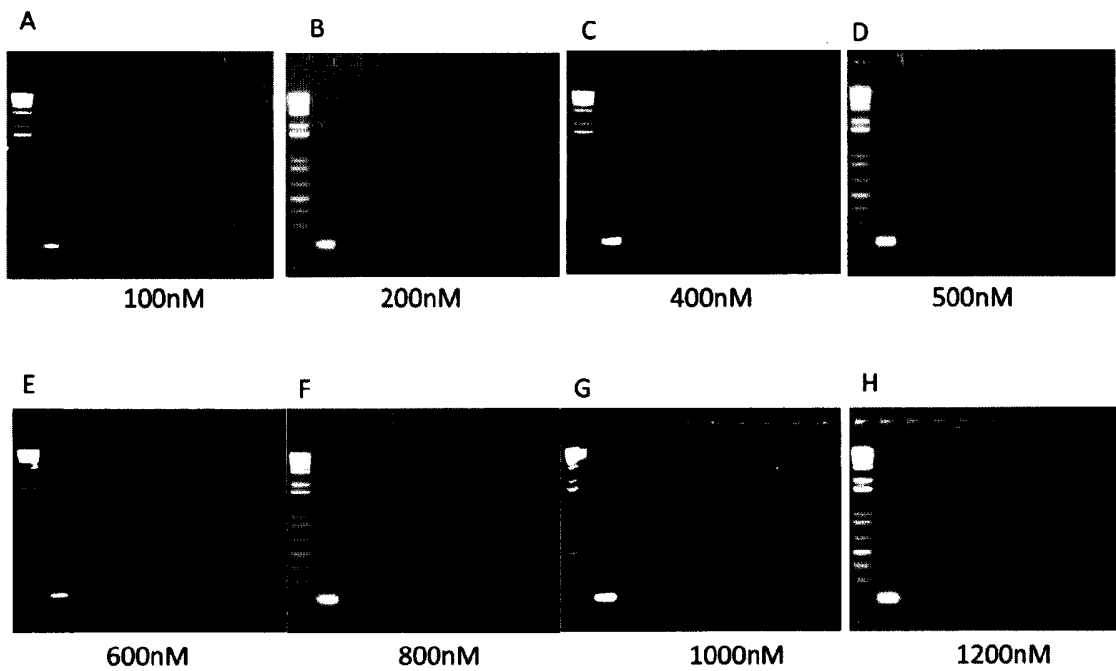


FIGURA 6

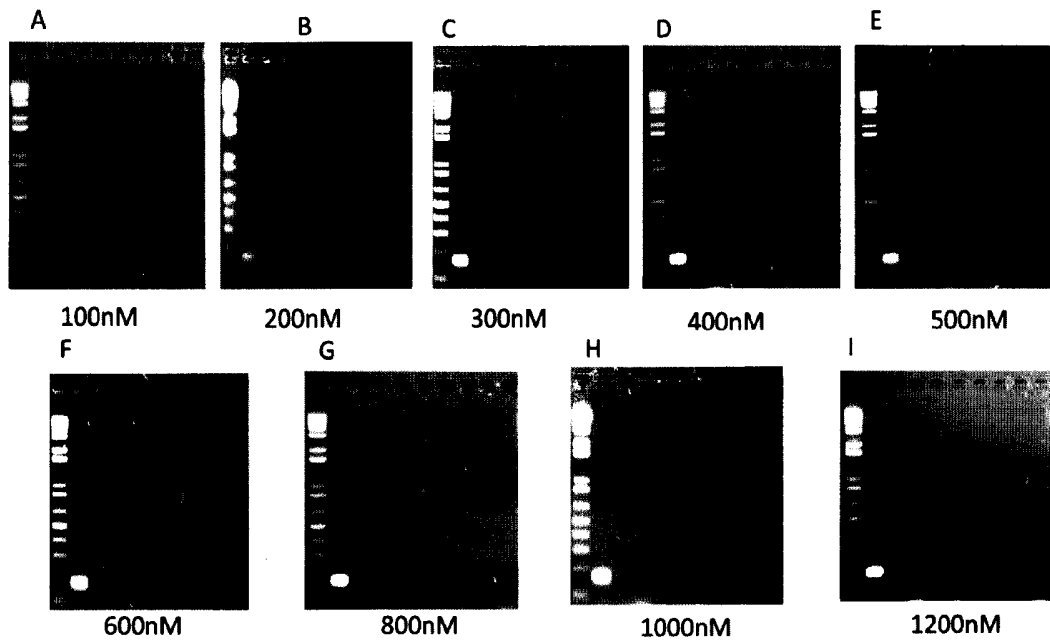


FIGURA 7

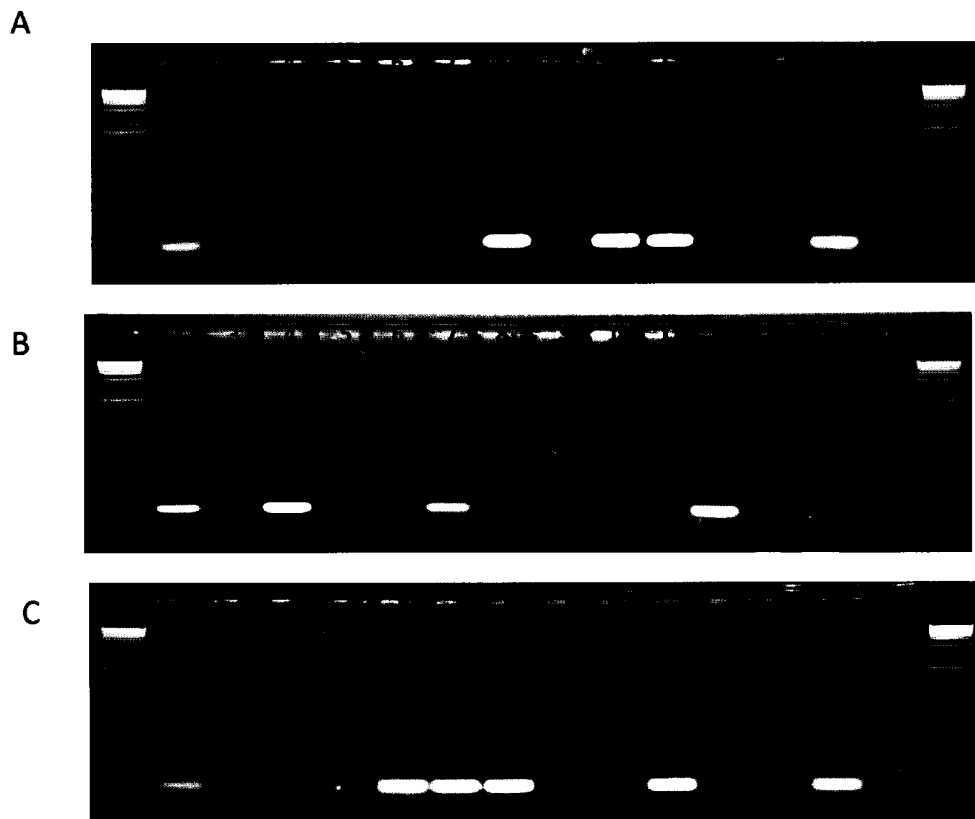


FIGURA 8

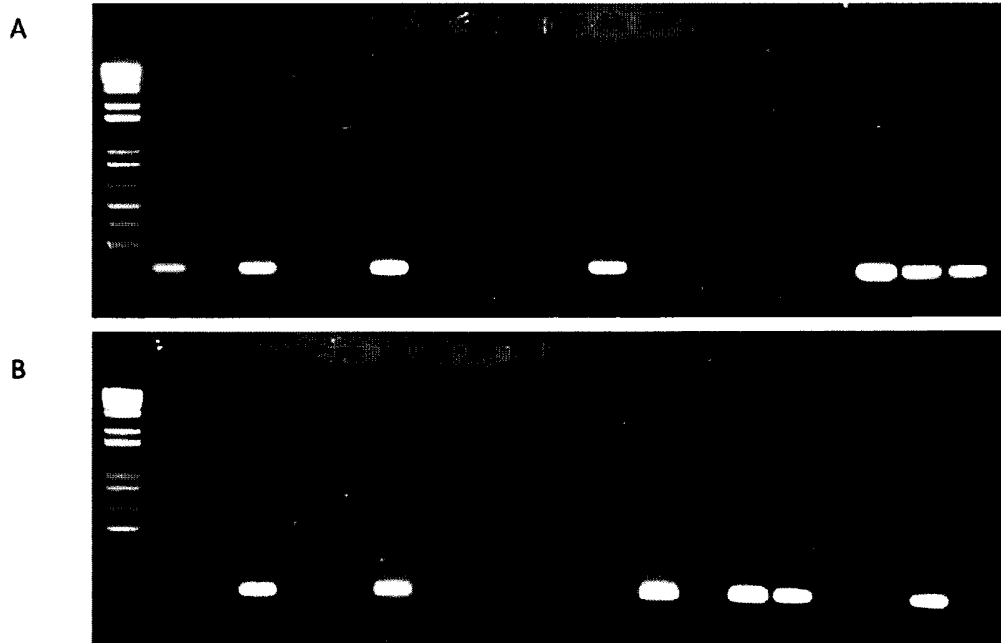


FIGURA 9

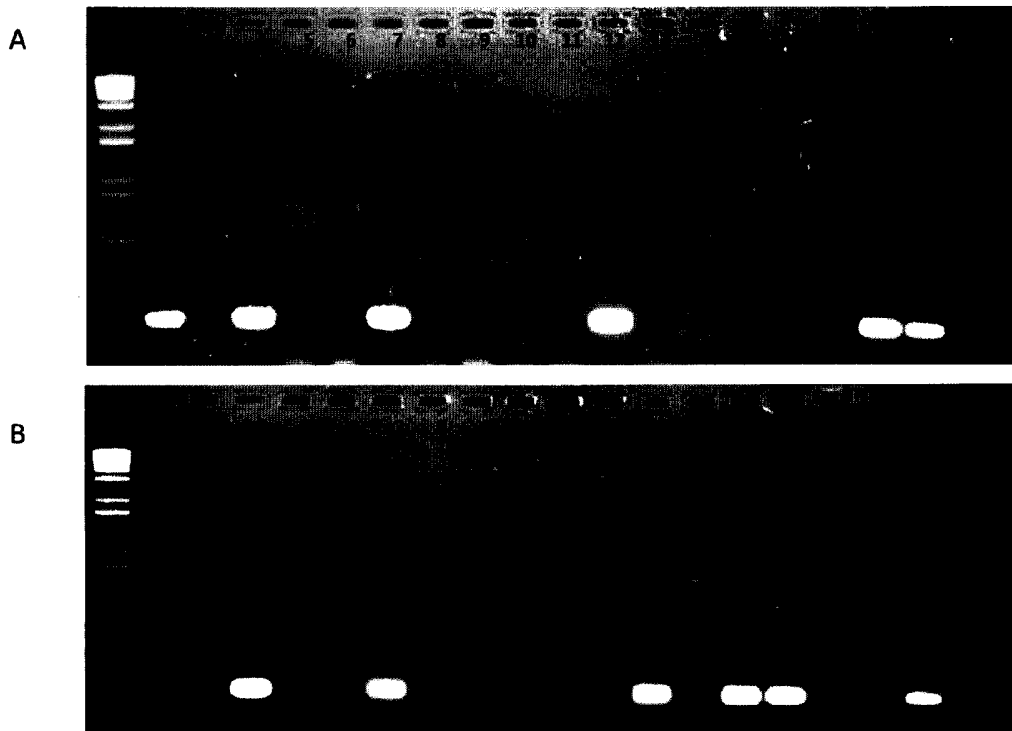


FIGURA 10

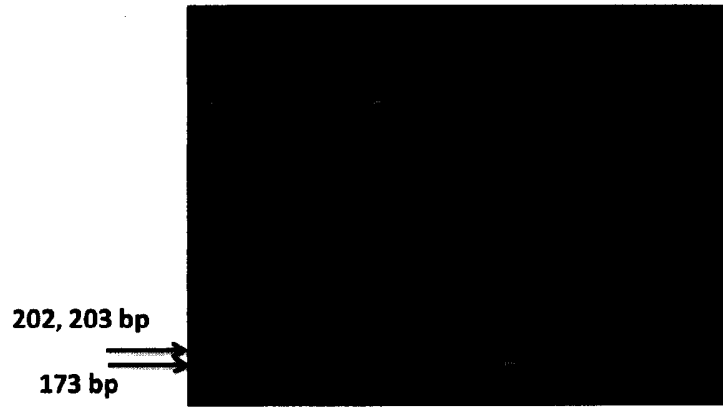


FIGURA 11

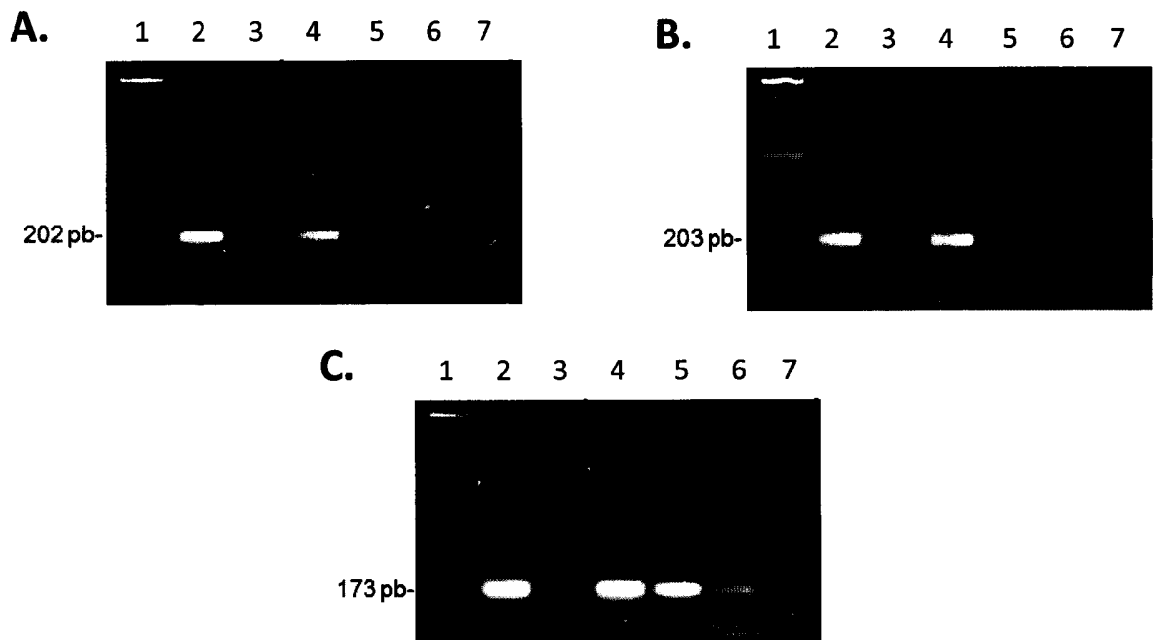


FIGURA 12

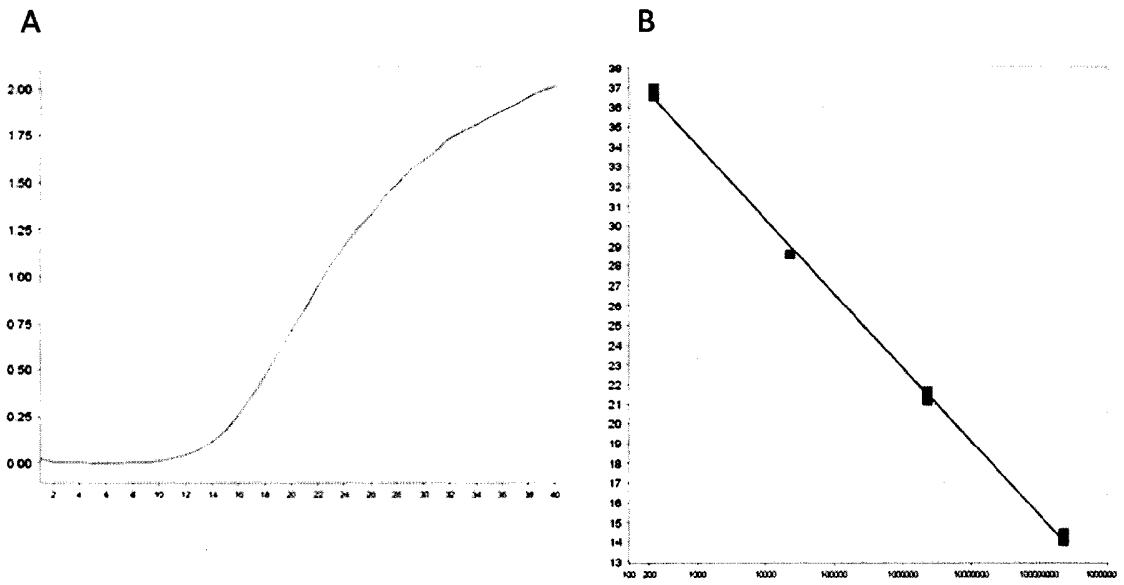


FIGURA 13

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 ALBICANS, METODO DE DETECCION Y KIT DE LOS MISMOS.**

<130> 1009.20

<150> 61/894,974

10 <151> 2013-10-24

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 18

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 1

aaagagcctg cgactatg

18

20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Candida albicans

25 <400> 2

ggctgattct tcggtttg 18

<210> 3

<211> 20

5 <212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 3

ctactccac agctgcttcc 20

10 <210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 4

15 gttgaagttg cagatggagc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Candida albicans

<400> 5

cctcctgtag tatttctccc 20

<210> 6

25 <211> 20

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 6

ggaggggaaga gatggaatc 20

5

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Candida albicans

10 <400> 7

catcaatacc acccaagaagc 20

<210> 8

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 8

cacctactgg aatcatcctc 20

20 <210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 9

25 ggtagctgga tctacagttc 20

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Candida albicans

5 <400> 10

gaacaacgta tctccacg 18

<210> 11

<211> 18

10 <212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 11

cagtgaacgg aagctaag 18

15 <210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 12

20 ctcttgatta acttgccag g 21