

(12)

## SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **30/09/2010** (51) Int. Cl: **C12N 15/113** (2010.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
(22) Fecha de presentación: **18/03/2009**  
(21) Número de solicitud: **2009002935**

---

(71) Solicitante:  
**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION  
CIENTIFICA Y TECNOLOGICA, A.C.  
Camino a la Presa San Jose 2055 78126 SAN LUIS  
POTOSI San Luis Potosí MX**

(72) Inventor(es):  
**IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO  
Montes y Valles # 195 SAN LUIS POTOSI San Luis  
Potosí 78210 MX  
MAYRA CUELLAR CRUZ  
ALEJANDRO DE LAS PEÑAS NAVA**

(74) Representante:  
**DANIEL BARRON PASTOR  
Camino a la Presa Sn Jose 2055 SAN LUIS POTOSI  
San Luis Potosí 78216 MX**

---

(54) Título: **METODO IN VITRO PARA LA DETECCION DE CANDIDA GLABRATA, KIT DE DIAGNOSTICO Y USOS DE LOS MISMO.**

(54) Title: **IN VITRO METHOD FOR DETECTING CANDIDA GLABRATA, DIAGNOSIS KIT AND USE THEREOF.**

(57) Resumen

La presente invención describe y reclama un método in vitro para la identificación de *Candida glabrata*, las secuencias asociadas a dicha identificación, así como kits de diagnóstico para identificar a *C. glabrata* y el uso de los mismos.

(57) Abstract

The present invention describes and claims an in vitro method for detecting *Candida glabrata*, the sequences associated to said identification, and a diagnosis kit for diagnosing *Candida glabrata* and use thereof.

## **METODO IN VITRO PARA LA DETECCION DE CANDIDA GLABRATA, KIT DE DIAGNOSTICO Y USOS DE LOS MISMOS.**

### **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención pertenece al campo de la  
5 biotecnología, en especial a métodos de diagnóstico molecular  
realizados in vitro.

### **ANTECEDENTES**

Históricamente se ha considerado a *Candida glabrata*  
como un hongo relativamente no patogénico en la flora normal de  
10 individuos sanos. Es decir, que rara vez causaba infecciones serias en  
humanos. Sin embargo, en virtud del incremento del uso de terapias  
inmunosupresoras junto con terapias con antimicóticos de amplio  
espectro, la frecuencia de infecciones causadas por *C. glabrata* en  
mucosas o en vías sistémicas se ha incrementado de manera  
15 significativa. De hecho, dependiendo del sitio de infección, *C. glabrata*  
es generalmente la segunda o tercera causa de infección más común  
después de *C.albicans*, representando un 17 a 23% de los casos de  
candidiasis en el torrente sanguíneo en pacientes de 16 a mayores de  
65 años (M. A. Pfaller, et. al, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,  
20 Mar. 2002, p. 852–856 Vol. 40, No. 3). Asimismo, las infecciones por *C.*

*glabrata* son comunes en hospederos anormales, por ejemplo, personas inmunocomprometidas, pacientes con diabetes mellitus, pacientes con cáncer o, por otro lado, en neonatos o personas de la tercera edad. Es también común en ambientes hospitalarios y en  
5 pacientes que han sido sometidos a cirugía, han sido manipulados por el personal del hospital (cateterismos) o han estado internados por periodos prolongados y la mortalidad en dichos pacientes es igual a la de infecciones causadas por *C.albicans*.

Además, en el campo de la medicina veterinaria se ha  
10 reportado infecciones por levaduras en vacas, en donde un porcentaje importante corresponde a *C. glabrata*. (Costa, G.M. et al., Cienc. Rural, 2008, Vol. 38, No. 7, pp.1938-1942). Por lo que se considera que un diagnóstico rápido y preciso en mamíferos es necesario para abatir la incidencia de *C. glabrata*.

15 Las infecciones de *C. glabrata* son difíciles de tratar y generalmente son resistentes a muchos agentes antifúngicos del tipo de los azoles, especialmente fluconazol, que es el antimicótico más recetado para casos de candidiasis. Por lo tanto, al ser resistentes a los antifúngicos comunes y por falta de un diagnóstico rápido y preciso,  
20 las infecciones de *C. glabrata* tienen una alta mortalidad en pacientes hospitalarios.

### Métodos de diagnóstico para *C. glabrata*

Existen tres grupos de métodos de diagnóstico para candidiasis reportados en la literatura: por selección en medio de cultivo, pruebas bioquímicas y pruebas moleculares.

5           Dentro de los métodos de selección por medio de cultivo están reportados, a manera de ejemplo, el Mycosis IC/F, el Plus Aerobic/F standard y Chrom-agar, entre otros. La característica principal de estos medios de cultivo es que permiten diferenciar distintas especies de *Candida* por tipo y color de colonia. Sin embargo, 10 los tiempos de incubación van de entre 24 a 43 horas, o hasta 7 días y además la especificidad y sensibilidad no alcanzan porcentajes óptimos (van desde un 37.5% hasta un máximo de 96%). (J. Clin. Microbiol. Feb. 2004, pp 773-777, Vol. 42 No. 2; J. Clin. Microbiol., Ene. 2004, pp 115-118, Vol. 42, No. 1; J. Clin. Microbiol. Oct. 2003, pp. 4714- 15 4717, Vol. 41, No. 10). Por lo tanto, aún cuando son métodos económicos para el diagnóstico, los resultados obtenidos son poco específicos y muy tardados, por lo que para el caso de *C. glabrata*, implican poner en riesgo la vida del paciente.

En cuanto a los métodos bioquímicos, destacan los 20 siguientes: los sistemas API 20 ó API 20C (Bio-Merieux Vitex Inc.) están basados en pruebas de asimilación de carbohidratos para la

identificación de las levaduras clínicamente relevantes, su tiempo de incubación es de aproximadamente 72 horas, pero siempre se recomienda hacer una correlación con morfología en cultivos o métodos similares, por lo que no es 100% específica la identificación de hongos. Existen pruebas mejoradas como la Vitex Yeast Biochemical Card, el cual es un sistema automatizado en donde se hacen 26 pruebas bioquímicas convencionales y 4 controles negativos, con una precisión mayor o igual al 85%, pero en caso de que la precisión sea menor hay que hacer pruebas morfológicas adicionales (J. Clin. Microbiol. May 1994, pp. 1184-1187, Vol. 32, No. 5; J. Clin. Microbiol., jun 1999, pp. 1967-1970, Vol. 37, No. 6; J. Clin. Microbiol., abril, 1998, pp. 883-886, Vol. 36 No. 4; J. Clin. Microbiol. Mayo 1998, pp. 1443-1445, Vol. 36, No. 5).

Otros métodos están basados en la asimilación de trehalosa de *C. glabrata*, y en la falta de asimilación de sacarosa. Sin embargo, en estos casos hay falsos positivos con *Candida tropicalis*, se necesita una gran cantidad de inóculo y los resultados suelen depender del medio de cultivo. En ciertos casos la densidad del inóculo dificulta la lectura de colores en las placas y el laboratorista debe ser muy experimentado para estandarizar la técnica (J. Clin. Microbiol., Mar 2001, pp. 1172-1174, Vol. 39 No. 3). Dentro de estos

métodos se encuentran las Rosco Diagnostic Plates, Glabrata RTT y Dipstick Test, etc.

De los reportes anteriores se deriva que aún cuando las pruebas bioquímicas son relativamente rápidas, siempre se recomienda hacer análisis complementarios que aumentan el tiempo de obtención de resultados, dependen de la destreza del laboratorista y/o del tipo de medio de cultivo, por lo que se requiere un sistema que identifique *C. glabrata* sin la necesidad de hacer pruebas suplementarias, mejorando la eficiencia y que provea información clínica relevante de manera rápida y a bajo costo.

Dentro de los métodos moleculares se describe en la literatura (J. Clin. Microbiol., Dic 2005, pp. 5912-5915, Vol. 43 No. 12) un método para identificar 7 especies de *Candida* por medio de HPLC desnaturizante, el cual permite un análisis de alta resolución de productos de PCR a partir de cultivos de sangre, en donde las amplificaciones son de las regiones variables ITS2 con un análisis subsecuente con el sistema de análisis microbiano WAVE. El HPLC desnaturizante separa los productos de PCR los cuales son teñidos con tinción intercalable y se visualizan con un detector de fluorescencia. Este método es de alto costo y requiere un día de trabajo.

Asimismo, se ha reportado el uso de hibridación por fluorescencia in situ (FISH) con sondas de PNA para *C.albicans* (J. Clin. Microbiol. Jun 2002, pp. 2182-2186, Vol. 40, No. 6; J. Clin. Microbiol., Nov. 2007, pp. 3802-3803, Vol. 45, No. 11; J. Clin. Microbiol., Jun 2005, pp. 5 2909-2912, Vol. 43 No. 6; J. Clin. Microbiol., Sep 2006, pp. 3381-3383, Vol. 44, No. 9), en donde se reportan datos variables en cuanto a la especificidad y sensibilidad del método, ya que en ciertos reportes hay inconsistencias con cepas clínicas que no dieron un resultado positivo, pero que al hacer las pruebas bioquímicas detectaron especies 10 diferentes de *Candida*, en algunos casos no detecta especies de *Candida* diferentes en mezclas, y la fiabilidad de la prueba depende del diseño de las sondas de oligonucleótidos. En uno de dichos reportes destaca la necesidad de sondas específicas para *C. glabrata*.

Otros ejemplos de métodos moleculares para la detección 15 de *Candida glabrata* están basados en la identificación de las regiones internas espaciadoras de la transcripción (internal transcribed spacer regions ITS) del ADN ribosomal como los que se reportan en las patentes US 5,631,132, US 5,688,644, US 5,426,027, US 6,858,387, US 7,427,472. Asimismo, se han reportado métodos que detectan una 20 región hipervariable dentro de la región ribosomal 28S como se reportan en las patentes US 5,707,802, US 5,763,169 y US 6,180,339. Sin

embargo, la confiabilidad de los métodos de diagnóstico a través de la detección de regiones del DNA ribosomal es menor en una mezcla de organismos filogenéticamente cercanos.

Por otra parte, se han reportado métodos de identificación de *Candida glabrata* a través de detectar regiones de ciertas proteínas. La patente US 6,497,880 reporta un método a través de detectar secuencias de genes que codifican para proteínas de reacción a calor (heat shock proteins, Hsps). Por otra parte, la patente US, 6,017,699 reporta un método de identificación de *Candidas* a través de detectar secuencias del gen de quitina sintasa 1, CHS1 (chitin synthase). Los métodos para identificar cándidas a través de secuencias específicas en genes conservados puede reducir su confiabilidad en una mezcla de organismos filogenéticamente cercanos.

#### 15 Adhesinas en *C. glabrata*

Las adhesinas son proteínas tipo lectina que se han descrito en diversas especies de patógenos, entre ellas, *C. albicans* y *C. glabrata*. Dichas especies se adhieren a las células epiteliales del hospedero por medio del reconocimiento de los carbohidratos de la pared celular del mismo.

En *C. glabrata* se identificó una proteína de pared celular llamada Epa1 que es la principal adhesina responsable de la adherencia que presentan las células de *C. glabrata* a las células epiteliales in vitro. Epa1 es una lectina que reconoce glicoconjugados de N-acetil-lactosamina presentes en la superficie de las células epiteliales de mamíferos (Cormack et al., 1999).

El gen EPA1 se identificó inicialmente al buscar mutantes de *C. glabrata* que fueran incapaces de adherirse a células epiteliales in vitro, y se demostró que una delección del gen EPA1 reducía la adherencia de *C. glabrata* a niveles no detectables. Asimismo, EPA6 y EPA7 son genes que codifican para otras adhesinas (confieren adherencia a *S. cerevisiae* cuando se expresan ectópicamente), y están localizados en regiones subtelo méricas. Esta localización tiene como consecuencia que EPA6 y EPA7 (y las demás adhesinas subtelo méricas) no se expresen in vitro. Durante infecciones de vías urinarias sin embargo, al menos Epa6 se induce (Domergue et al., 2005).

El genoma de *C. glabrata* contiene una familia de proteínas de pared celular de al menos 23 miembros. EPA1 está agrupado con otros dos genes relacionados, EPA2 y EPA3, en una región adyacente al telómero del lado derecho del cromosoma E. En

la región subtelomérica del lado derecho del cromosoma I, también encontramos los genes EPA4 y EPA5 (De Las Peñas et al., 2003). En total, de los 23 miembros de la familia Epa, al menos 17 se localizan en regiones adyacentes a los telómeros, y durante el crecimiento *in vitro* son transcripcionalmente inactivos (Castaño et al., 2005; De Las Peñas et al., 2003). Esta regulación negativa depende de la estructura represiva de la cromatina en regiones cercanas a los telómeros (silenciamiento subtelomérico).

Por análisis bioinformático, se ha deducido que EPA1, EPA6 y EPA7 son los más homólogos entre sí en el extremo amino terminal.

Con el objeto de superar los retos técnicos para la identificación específica y sensible de *C. glabrata*, la presente invención surge de una estrategia de análisis de las regiones intergénicas de las adhesinas de *C. glabrata*, en especial de las variantes de las regiones que contienen las secuencias de los elementos negativos (EN) para identificar *Candida glabrata* y de la evidencia de su utilidad en la identificación de este organismo. Cabe hacer mención que dicha estrategia no ha sido abordada en ningún reporte de arte previo, por lo que es novedosa, no obvia y sujeta a aplicación industrial.

## BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de localización de los oligonucleótidos generados a lo largo de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5. Los números corresponden a las SEQ. ID. Nos. 6 a 52 y su posición y orientación sobre las secuencias SEQ. ID. Nos. 1 a 5.

Figura 2. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C1+ a C4+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C1- a C4-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M1+ a M4+ contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. Los carriles M1- a M4- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. Las bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 2205pb (muestras con C1+ y M1+), 289pb (muestras con C2+ y M2+), 196pb (muestras con C3+ y M3+) y 410 pb (muestras con C4+ y M4+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 3. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID.

Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C5+ a C8+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C5- a C8-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M 5+ a M8 +  
5 contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Los carriles M 5- a M8- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Las bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 301pb (muestras con C5+ y M5+), 267pb (muestras con C6+ y M6+), 130pb  
10 (muestras con C7+ y M7+) y 428 pb (muestras con C8+ y M8+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 4. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID.  
15 Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C9+ a C12+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C9- a C12-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M9+ a M12 + contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Los carriles M9- a M12- contienen ADN de  
20 *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Las

bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 200pb (muestras con C9+ y M9+), 559pb (muestras con C10+ y M10+), 331pb (muestras con C11+ y M11+) y 306 pb (muestras con C12+ y M12+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 5. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C1+ a C4+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C1- a C4-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M1+ a M4+ contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. Los carriles M1- a M4- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. Las bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 2080pb (muestras con C1+ y M1+), 332pb (muestras con C2+ y M2+), 177pb (muestras con C3+ y M3+) y 673 pb (muestras con C4+ y M4+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 6. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID.

Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C5+ a C8+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C5- a C8-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M 5+ a M8 +  
5 contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Los carriles M 5- a M8- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Las bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 339pb (muestras con C5+ y M5+), 600pb (muestras con C6+ y M6+), 162pb  
10 (muestras con C7+ y M7+) y 1004 pb (muestras con C8+ y M8+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 7. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID.  
15 Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C9+ a C10+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C9- a C10-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M9+ a M10 +  
20 contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Los carriles M9- a M10- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Las

bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 740pb (muestras con C9+ y M9+) y 741pb (muestras con C10+ y M10+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5                    Figura 8. Gel de agarosa al 0.6%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C1+ a C3+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C1- a  
10 C3-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M1+ a M3+ contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Los carriles M1- a M3- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Las  
15 bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 8209pb (muestras con C1+ y M1+), 4531pb (muestras con C2+ y M2+) y 4596pb (muestras con C3+ y M3+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

                    Figura 9. Gel de agarosa al 1.5%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID.  
20 Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C4+ a

C6+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C4- a C6-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M 4+ a M6 + contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Los carriles M 4- a M6- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Las bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 593pb (muestras con C4+ y M4+), 274pb (muestras con C5+ y M5+) y 859 pb (muestras con C6+ y M6+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

10                    Figura 10. Gel de agarosa al 1.5%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C7+ a C10+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C7- a C10-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M 8+ a M10 + contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Los carriles M7- a M10- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Las bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 918pb (muestras con C7+ y M7+), 2271pb (muestras con C8+ y M8+), 689pb (muestras con C9+ y M9+) y 1306 pb (muestras con C10+ y M10+). El

marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 11. Gel de agarosa al 1.5%, en donde se muestran diversos pares de oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos: 1 a 5, útiles para la identificación de *C. glabrata*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles marcados C1+ a C3+, son aquellos con ADN de *C. glabrata*. Los carriles marcados C1- a C3-, son aquellos con ADN de *S. cerevisiae*. Los carriles M 1+ a M3+ contienen ADN de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Los carriles M 1- a M3- contienen ADN de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondii*. Las bandas de amplificación positivas para *C. glabrata* son de 2412pb y 1940pb (muestras con C1+ y M1+), 556pb (muestras con C2+ y M2+) y 427pb (muestras con C3+ y M3+). El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 12. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la optimización del gradiente de temperatura para la reacción de PCR con los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 7 y 8, las bandas identificadas son de 136 y 140 pb. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular y en los carriles 2 a 13 se muestran los productos de PCR a temperaturas de 54.0, 54.9, 56.3, 57.6, 59.0, 60.3, 61.4, 62.9, 64.4,

65.8, 67.1 y 67.6°C respectivamente, correspondientes a ADN de *C. glabrata*, lo que se comprobó con resecuenciación de los productos de PCR. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5                    Figura 13. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la optimización del gradiente de temperatura para la reacción de PCR con los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 6 y 8, las bandas identificadas son de 327, 348 y 364 pb. En los carriles 1 y 14 se muestra el  
10                    marcador de peso molecular y en los carriles 2 a 13 se muestran los productos de PCR a temperaturas de 54.0, 54.9, 56.3, 57.6, 59.0, 60.3, 61.4, 62.9, 64.4, 65.8, 67.1 y 67.6°C respectivamente. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

                          Figura 14. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la optimización del gradiente de temperatura para la reacción de PCR  
15                    con los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 9 y 10, las bandas identificadas son de 601 y 664 pb. En los carriles 1 y 14 se muestra el marcador de peso molecular y en los carriles 2 a 13 se muestran los productos de PCR a temperaturas de 54.0, 54.9, 56.3, 57.6, 59.0, 60.3, 61.4, 62.9, 64.4, 65.8, 67.1 y 67.6°C respectivamente. El marcador de  
20                    peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 15. Gel de agarosa al 2% en donde se optimiza la concentración de primers para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 7 y 8, a una temperatura de 59°C, en donde en los carriles 1 y 8 se presentan los marcadores de peso molecular y en los carriles 2 a 7 las concentraciones de primers son de 100, 200, 400, 500, 600 y 800 nM. Los productos de PCR obtenidos son de 136 y 140 pb, lo cual se comprobó por resecuenciación de los productos de PCR. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 16. Gel de agarosa al 2% en donde se optimiza la concentración de primers para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 6 y 8, a una temperatura de 67.1°C, en donde en el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular y en los carriles 2 a 7 las concentraciones de primers son de 100, 200, 400, 500, 600 y 800 nM. Los productos de PCR obtenidos son de 327, 348 y 364 pb. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 17. Gel de agarosa al 2% en donde se optimiza la concentración de primers para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 9 y 10, a una temperatura de 61.4°C, en donde en el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular y en los carriles 2 a 9 las concentraciones de primers son de 100, 200, 400, 500, 600, 800, 1000 y 1200 nM. Los productos de PCR obtenidos son de 601 y 664 pb. El

marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 18. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la optimización de la concentración de dNTPs para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 6 y 8, a una temperatura de 59°C y una concentración de primers de 500 nM. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, y en los carriles 2 a 8 se muestran las concentraciones de 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$  de dNTPs. Los productos de PCR obtenidos son de 136 y 140 pb. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 19. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la optimización de la concentración de dNTPs para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 7 y 8, a una temperatura de 67.1°C y una concentración de primers de 200 nM. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, y en los carriles 2 a 8 se muestran las concentraciones de 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$  de dNTPs. Los productos de PCR obtenidos son de 327, 348 y 364 pb. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 20. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la optimización de la concentración de dNTPs para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 9 y 10, a una temperatura de 61.4°C y una

concentración de primers de 400 nM. En el carril 1 se muestra el  
marcador de peso molecular, y en los carriles 2 a 8 se muestran las  
concentraciones de 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$  de dNTPs. Los  
productos de PCR obtenidos son de 601 y 664 pb. El marcador de peso  
5 molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 21. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la  
sensibilidad de la reacción de PCR al variar la cantidad de ADN  
genómico de la muestra para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 6  
y 8, a una temperatura de  $59^{\circ}\text{C}$ , una concentración de primers de  
10 500nM, una concentración de dNTPs de  $30\mu\text{M}$ . En los carriles 1 y 15 se  
muestran los marcadores de peso molecular, y en los carriles 2 a 14 se  
muestran las concentraciones de 345, 200, 20, 12.5, 2.5, 0.5, 0.1, 0.02,  
0.004, 0.0008, 0.00016, 0.000032 y 0 ng de ADN genómico. Los productos  
de PCR obtenidos son de 136 y 140 pb. El marcador de peso molecular  
15 utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 22. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la  
sensibilidad de la reacción de PCR al variar la cantidad de ADN  
genómico de la muestra para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 7  
y 8, a una temperatura de  $67.1^{\circ}\text{C}$ , una concentración de primers de  
20 200nM, una concentración de dNTPs de  $30\mu\text{M}$ . En el carril 1 se muestra  
el marcador de peso molecular, y en los carriles 2 a 14 se muestran las

concentraciones de 345, 200, 20, 12.5, 2.5, 0.5, 0.1, 0.02, 0.004, 0.0008, 0.00016, 0.000032 y 0 ng de ADN genómico. Los productos de PCR obtenidos son de 327, 348 y 364 pb. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5                    Figura 23. Gel de agarosa al 2% en donde se muestra la sensibilidad de la reacción de PCR al variar la cantidad de ADN genómico de la muestra para los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 9 y 10, a una temperatura de 61.4°C, una concentración de primers de 400nM, una concentración de dNTPs de 30µM. En los carriles 1 y 15 se  
10 muestran los marcadores de peso molecular, y en los carriles 2 a 14 se muestran las concentraciones de 345, 200, 20, 12.5, 2.5, 0.5, 0.1, 0.02, 0.004, 0.0008, 0.00016, 0.000032 y 0 ng de ADN genómico. Los productos de PCR obtenidos son de 601 y 664 pb. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

15                    Figura 24. Gel de poliacrilamida nativo al 6%. Gel A: En el carril PM se muestra el marcador de peso molecular ADN pBR322/Msp I (Biogenica), en los carriles 2 a 5 se muestran los productos de reacción de PCR obtenidos a 59° C, 500 nM de primers y 30µM de dNTP's con los oligonucleótidos de las SEQ. ID. Nos. 7 y 8, en donde las bandas  
20 obtenidas son de 136 y 140 pares de bases. Gel B: acercamiento del gel A: carril PM: bandas de 147 y 123 pares de bases del marcador de

peso molecular pBR322/Msp I (Biogenica); los carriles 2 a 5 corresponden a las bandas de 136 y 140 pares de bases de los productos de PCR obtenidos utilizando los oligonucleótidos de las SEQ. ID. Nos. 7 y 8.

5                    Figura 25. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestra la sensibilidad y especificidad de la reacción de PCR al utilizar muestras clínicas. Se utilizaron los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 6 y 8. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2, una muestra de ADN genómico de una cepa silvestre de *C. glabrata*, en el  
10 carril 3, una muestra de ADN genómico de *C.albicans*, en los carriles 4 a 15 muestras clínicas de orina. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

                    Figura 26. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestra la sensibilidad y especificidad de la reacción de PCR en muestras clínicas  
15 de sangre. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2, el ADN genómico de una cepa silvestre de *C. glabrata*, en el carril 3, ADN genómico de una cepa silvestre de *C.albicans*, en el carril 4, una muestra de sangre negativa para *C. glabrata*, en los carriles 5 y 6, dos muestras de ADN genómico positivas para *C.*  
20 *glabrata*. Los productos de PCR son de 327, 348 y 364 pb. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 27. Geles de agarosa al 2%, en donde se demuestra que el elemento negativo únicamente se encuentra en *C. glabrata* y no en otras especies filogenéticamente relacionadas. Se utilizaron varias sondas, los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 9 y 10 para identificar el elemento negativo de *C. glabrata* en los carriles 2 a 17 y oligonucleótidos específicos de rRNA 26 S en los carriles 3 a 7, oligonucleótidos específicos de rRNA 18 S en los carriles 8 a 17. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 28. Geles de agarosa al 2% en donde se demuestra la especificidad de los oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 en mezclas de *C. glabrata* con especies filogenéticamente cercanas. En el gel A, carril 2 se utilizan los oligonucleótidos con las SEQ ID Nos. 7 y 8, en los carriles 3 a 13 se utilizan oligonucleótidos de rRNA; en el gel B, en los carriles 2 a 13 se utilizan los oligonucleótidos de las SEQ. ID. Nos. 7 y 8, y en los carriles 3 a 13 se utilizan además oligonucleótidos de rRNA. En los carriles 1 a 13 de cada gel se corrieron en orden las siguientes muestras: carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, elemento negativo de *C. glabrata*; carril 3, *C. glabrata*; carril 4, *C. parapsilosis*; carril 5, *C. tropicalis*; carril 6, *C. parapsilosis*; carril 7, *C. albicans*; carriles 8 a 13,

mezcla de *C. albicans* (100 ng) con *C. glabrata* en concentraciones de 345, 20, 10, 5, 2.5 y 0 ng de *C. glabrata*. Se observan bandas de amplificación para los rRNA en los carriles 3 a 13 y únicamente en los carriles 2, 3 y 8 a 13 de 136 y 140 pb correspondientes a *C. glabrata*. El  
5 marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 29. Geles de agarosa al 2% en donde se identifica *C. glabrata* proveniente de diversos aislados clínicos. En los carriles M, se muestran los marcadores de peso molecular. En el carril C, se muestra  
10 el control positivo de *C. glabrata*. En los carriles 1 a 46 se muestran diversos aislados clínicos. Los carriles 14, 17 y 33 no muestran banda de amplificación, mismo que será explicado en la sección de ejemplos. El marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

15 Figura 30. Geles de agarosa al 2% en donde se identifica *C. glabrata* proveniente de diversos aislados clínicos. En los carriles M, se muestran los marcadores de peso molecular. En el carril C, se muestra el control positivo de *C. glabrata*. En los carriles 1 a 46 se muestran diversos aislados clínicos. Los carriles 14, 17 y 33 no muestran banda de  
20 amplificación, mismo que será explicado en la sección de ejemplos. El

marcador de peso molecular utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 31. Uso de una molécula de ADN como sonda de hibridación para la identificación específica de *C. glabrata*. En esta figura se muestra un análisis por Dot-blot, en donde en la fila 1 se muestra un producto de PCR como control interno, variando las cantidades de ADN de 50, 40, 30, 20 y 10 ng en los carriles A a E respectivamente. En la fila 2 se muestra el ADN de una muestra clínica de *C. glabrata* en cantidades de 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 µg en los carriles A a E, respectivamente. En la fila 3 se muestra el ADN de una muestra clínica de *C. glabrata* en cantidades de 5, 2.5, 1, 0.5 y 0.25 µg en los carriles A a E, respectivamente. En la fila 4 se muestra el ADN de una cepa silvestre de *C. glabrata* en cantidades de 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 µg en los carriles A a E, respectivamente. En la fila 5 se muestra el ADN de una cepa silvestre de *C. albicans* en cantidades de 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 µg en los carriles A a E, respectivamente. En la fila 6 se muestra el ADN de una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* en cantidades de 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 µg en los carriles A a E, respectivamente. La sonda de *C. glabrata* utilizada es de 140 pb y se encuentra en la región intergénica de las SEQ. ID. Nos. 1 a 3.

## BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

En la presente invención se describe y reclama una molécula de ADN, caracterizada porque es una región intergenica de adhesinas de *C. glabrata* y se selecciona a partir del grupo que  
5 consiste de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5.

En una modalidad adicional, dicha molécula de ADN de está comprendida por las siguientes regiones intergénicas: EPA1 a EPA 2 para la SEQ ID No. 1 (2225 pb), EPA-H a Telomero para la SEQ. ID No.  
10 2(2438 pb), EPAK a EPA22 para la SEQ. ID. No. 3(8309 pb), EPA6 a Telómero para la SEQ. ID. No. 4 (2432 pb) y EPA7 a Telómero para la SEQ. ID. No. 5 (2498 pb).

Asimismo, se describe y reclama un oligonucleótido para la identificación específica de *C. glabrata*, caracterizado porque  
15 consiste de una secuencia continua de 15 a 35 nucleótidos de las secuencias de ADN que se seleccionan a partir del grupo que consiste de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5. En donde dicho oligonucleótido está caracterizado además porque consiste de las secuencias como se muestran en las SEQ ID Nos. 6 a 52.  
20 Dicho oligonucleótido está caracterizado además porque tiene una homología de entre 90 y 100% con respecto a las SEQ ID Nos. 1 a 5.

En un aspecto adicional de la presente invención, se describe y reclama un método in vitro para la identificación específica de *C. glabrata*, caracterizado porque comprende los pasos de: a) amplificar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica  
5 mediante PCR con los oligonucleótidos descritos anteriormente y b) identificar los fragmentos de ADN amplificados. En dicho método la muestra biológica es derivada de un sujeto a estudio. En donde dicho sujeto a estudio es un animal mamífero, que en una modalidad preferida es, pero no se limita a un humano. En una modalidad  
10 preferida adicional, dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de cualquier tipo de muestra que contenga ADN, fluidos, tejido, desecho o célula, orina chorro medio, cultivo de orina por sonda, cultivo por nefrostomía (riñón derecho e izquierdo), agua de hemodiálisis, líquido pleural, cultivo piógenos, mielocultivo, médula  
15 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,  
20 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.

5                   En una modalidad adicional de dicho método, la amplificación de fragmentos de ADN se lleva a cabo con al menos un oligonucleótido como se definió anteriormente. Asimismo, en modalidades preferidas del método aquí descrito y reclamado, la temperatura de amplificación de la reacción de PCR es de entre 54°  
10 C y 67.6°C; la concentración de ADN genómico es igual o mayor a 0.0008ng, preferentemente la concentración de ADN genómico es de entre 0.0008ng a 345ng; además, la concentración de oligonucleótidos es de entre 100nM y 1200nM y la concentración de dNTPs es de entre 5 a 50 µM.

15                   Dentro de una modalidad adicional de la presente invención se describe y reclama un kit para la identificación específica de *Candida glabrata*, caracterizado porque comprende los oligonucleótidos como se definieron anteriormente. En una modalidad preferida, dicho kit comprende al menos una muestra de ADN  
20 genómico de *C. glabrata* (control positivo) y al menos una muestra de

ADN genómico de al menos una especie filogenéticamente relacionada con *C. glabrata* (control negativo).

En una modalidad preferida, se describe y reclama el uso de una molécula de ADN que es una región intergénica de adhesinas de *C. glabrata* y se selecciona a partir del grupo que consiste de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5, como la descrita anteriormente, para generar oligonucleótidos útiles para la identificación específica de *C. glabrata*.

Adicionalmente, se reclama y describe el uso de al menos dos oligonucleótidos caracterizados porque consisten de una secuencia continua de 15 a 35 nucleótidos de las secuencias de ADN que se seleccionan a partir del grupo que consiste de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5. En donde dichos oligonucleótidos están caracterizados además porque consisten de las secuencias como se muestran en las SEQ ID Nos. 6 a 52. Dichos oligonucleótidos están caracterizados además porque tienen una homología de entre 90 y 100% con respecto a las SEQ ID Nos. 1 a 5, para identificar *C. glabrata*.

Una modalidad preferida de la presente invención comprende una molécula de ADN útil para la identificación específica de *C. glabrata*, caracterizada porque consiste de una secuencia

continua de 36 o más nucleótidos comprendidos dentro de las secuencias de ADN que se seleccionan a partir del grupo que consiste de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5, en donde dicha molécula tiene una homología de entre 90 y 100% con respecto a las SEQ ID Nos. 1 a 5, así como su uso.

Dentro del alcance de la presente invención se describe y reclama un método in vitro para la identificación específica de *C. glabrata*, caracterizado porque comprende los pasos de: a) hibridizar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica con las moléculas de ADN como se definieron en el párrafo anterior; b) identificar los fragmentos de ADN hibridizados, en donde los pasos a) y b) se llevan a cabo por medio de una técnica seleccionada del grupo que comprende: Dot-Blot, Southern Blot, Northern Blot, hibridización in situ o microarreglos, en donde la muestra biológica es derivada de un sujeto a estudio, en donde el sujeto a estudio es un animal mamífero, en donde dicho animal mamífero es un humano. Dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de cualquier tipo de muestra que contenga ADN, fluidos, tejido, desecho o célula, 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. Asimismo, el paso a) se lleva a cabo con al menos una molécula de ADN como se definió anteriormente.

Por último, dentro del alcance de la presente solicitud se encuentra un kit para la identificación específica de *Candida glabrata*, caracterizado porque comprende al menos una molécula de ADN como se definió anteriormente, en donde dicho kit comprende al menos una muestra de ADN genómico de *C. glabrata* (control positivo) y al menos una muestra de ADN genómico de al menos una especie filogenéticamente relacionada con *C. glabrata* (control negativo).

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

### Obtención de las secuencias y sondas de diagnóstico.

Las secuencias descritas y reclamadas en la presente invención se encuentran incluidas dentro de la secuencia de ADN genómico de *C. glabrata* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL/>), y en las secuencias de GeneBank Nos.: AY344225, AY344226, AY646926, AY646925. Sin embargo, y sin menoscabo para la patentabilidad de la presente invención, su caracterización como secuencias regulatorias en cis de las adhesinas asociadas a las mismas y su uso como secuencias útiles para la identificación de *C. glabrata* no ha sido descrita en ningún reporte científico o de bases de datos de patente.

Ahora bien, las secuencias regulatorias de los genes de adhesinas objeto de la presente solicitud están relacionadas con la regulación de la expresión de, por ejemplo, la adhesina EPA1. Se ha observado que la regulación de dicha adhesina *in vitro* es compleja: el gen está reprimido en cultivos de células en fase estacionaria, y se induce fuertemente al diluirlas en medio fresco. A lo largo de la fase exponencial la expresión se reprime por la acción de un elemento negativo (EN). El EN es un elemento en cis, y se mapeó inicialmente de manera funcional al extremo 3' del TAA de EPA1. Por análisis bioinformático se ha encontrado que el elemento mapeado

funcionalmente, se encuentra solamente en *C. glabrata* y por bloques, mismos que pueden variar dependiendo del serotipo analizado. El genoma de *C. glabrata* tiene 5 copias del EN (incluyendo el original al 3' de EPA1), asociadas con alguno de los genes de la familia EPA. La

5 detección de los EN por medio de oligonucleótidos generables a lo largo de la secuencia de dichas regiones es esencial para la identificación de *C. glabrata*. En virtud de lo anterior, las secuencias identificadas como SEQ ID Nos. 1 a 5 comprenden las regiones intergénicas con los bloques de Elementos Negativos, y por lo tanto,

10 cualquier oligonucleótido generable a partir de dichas secuencias es útil para la identificación de *C. glabrata*. En este tenor, la SEQ ID No. 1 (2225 pb), corresponde a la región intergénica entre los genes EPA1 y EPA2; la SEQ ID No. 2 (2438 pb), corresponde a la región intergénica entre el gen EPA-H y el Telómero; la SEQ ID No. 3 (8309 pb),

15 corresponde a la región intergénica entre los genes EPA-K y EPA-22; la SEQ ID No. 4 (2432 pb), corresponde a la región intergénica entre el gen EPA6 y el Telómero; y la SEQ ID No. 5 (2498 pb), corresponde a la región intergénica entre el gen EPA7 y el Telómero. A manera de ejemplo, y sin ser limitantes para el alcance de la presente invención,

20 se presentan las SEQ. ID. Nos. 6 a 52, derivadas de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5, las cuales permiten la identificación 100% específica y sensible de aislados clínicos de *C. glabrata* de diferentes orígenes. La alineación

relativa de las SEQ. ID. Nos. 6 a 52, sobre las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 se encuentra representada en la Figura 1.

Dentro del alcance de la presente invención quedarán asimismo comprendidas las secuencias complementarias en al menos 90% con las SEQ. ID. Nos. 1 a 5.

A fin de comprobar que cualquier porción de las secuencias descritas en las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 son útiles para la identificación de *C. glabrata*, se generaron oligonucleótidos como los descritos en las SEQ. ID. Nos. 6 a 52, mismos que abarcan todas las regiones intergénicas de las adhesinas EPA1, EPA22, EPAH, EPA6 y EPA7. La posición de dichos oligonucleótidos está representada en la Figura 1, en donde se puede apreciar que dichos oligonucleotidos fueron generados desde los extremos hasta las regiones centrales. Asimismo, se comprobó su utilidad para la identificación de *C. glabrata* sola o en mezcla con otras especies filogenéticamente relacionadas. En las figuras 2 a 11 se muestran las diferentes combinatorias obtenibles a partir de los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 6 a 52 y los tamaños de producto de PCR esperados. Los resultados demuestran que la totalidad de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 sirve como base para la generación de oligonucleótidos específicos para *C. glabrata*, se mantiene la sensibilidad y la especificidad de la prueba, y que es posible detectar

el hongo en mezcla con otras levaduras. Por lo tanto, cualquier oligonucleótido generable a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 entra dentro del alcance de la presente solicitud.

#### Obtención de muestras biológicas.

5 Las muestras biológicas provienen de un sujeto de estudio, el cual es un animal, mamífero, y en una modalidad preferida, dicho mamífero es un humano. Dichas muestras biológicas pueden provenir de cualquier fluido, tejido, desecho o célula que contenga ADN en buenas condiciones para llevar a cabo el PCR. Tales muestras se  
10 pueden seleccionar, pero no están limitadas a: 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,  
15 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,  
20 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.

Método de diagnóstico in vitro de *Candida glabrata* por

5 PCR.

De manera general, el método de la presente invención consta de los siguientes pasos:

- Aislar el ADN proveniente de una muestra biológica,
- Realizar una reacción de PCR utilizando los  
10 oligonucleótidos generables a partir de las SEQ ID Nos. 1 a 5, incluyendo, pero no limitados a los oligonucleótidos de las SEQ. ID. Nos. 6 a 52.
- Corroborar la presencia de *Candida glabrata* por medio de algún método convencional.

15 Dichos métodos convencionales son como se describen, pero no limitados a: Ausubel FM et al. (1999) Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons; Fasman GD (1989) Practical handbook of biochemistry and molecular biology. Florida CRC Press,  
20 1989, Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a

laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Innis MA et al. (1990); PCR protocols : a guide to methods and applications. Academic Press; Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (1999) PCR applications : protocols for functional genomics. Academic Press;

5 McClelland M, Honeycutt R, Mathieu-Daude F, Vogt T, Welsh J (1997) Fingerprinting by arbitrarily primed PCR. Methods Mol Biol. 85:13-24; McClelland M, Welsh J (1994) DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. PCR Methods Appl. 4:559-65; McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR (1995) PCR 2 : a practical approach. IRL Press; McPherson MJ, Quirke P,

10 Taylor GR (1994) PCR : a practical approach. Oxford University Press; Evans IH (1996) Yeast protocols: methods in cell and molecular biology. New Jersey Humana Press.

La identificación de *C. glabrata* se lleva a cabo con un 100% de especificidad y un 100% de sensibilidad, debido a que las

15 secuencias SEQ ID Nos. 1 a 5 son exclusivas de dicho hongo y no se encuentran presentes en ningún otro organismo y este es el primer reporte de su utilidad para la identificación de *C. glabrata*.

Para comprobar la eficiencia y especificidad del método de identificación de la presente invención, a continuación se muestran

20 los siguientes experimentos:

Con el objeto de demostrar la estandarización de las condiciones experimentales para la identificación específica de *C. glabrata*, se eligieron los oligonucleótidos descritos en las SEQ ID Nos. 6 a 10, para ser probados en las siguientes condiciones:

5                   a) Optimización de gradiente de temperatura: los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 6 a 10 fueron probados en un rango de temperaturas de entre 54°C y 67.6°C. Como puede apreciarse en las Figuras 12 a 14, dichos oligonucleótidos produjeron los fragmentos de PCR esperados de 136, 140, 327,  
10                   348, 364, 601 y 664 pb. Esto significa que la temperatura de reacción puede variar de entre 54°C y 67.6°C sin que cambie el producto reacción, su especificidad y sensibilidad.

                      b) Optimización de cantidad de primers: en las figuras 15 a 17, se muestran los oligonucleótidos de las SEQ ID  
15                   Nos. 6 a 10, que fueron probados en concentraciones de entre 100 a 1200 nM, y a temperaturas de entre 59°C a 67.1°C, produciendo los fragmentos del tamaño esperado en todos los casos.

                      c) Gradiente de concentración dNTPs: en las  
20                   figuras 18 a 20 se muestra la optimización de la concentración de dNTPs a diferentes temperaturas de entre 59 y 67.1°C y a una

concentración de primers de entre 200nM a 500nM. La concentración de dNTPs es de entre 5 y 50  $\mu$ M y en todos los casos se obtienen los productos de PCR del tamaño esperado.

d) Concentración de ADN genómico: en las figuras 21 a 23 se muestra las concentraciones mínimas necesarias para la amplificación del ADN genómico proveniente de muestras clínicas. Se utilizaron los diferentes pares de oligonucleótidos descritos en las SEQ ID Nos. 6 a 10, en temperaturas de entre 59°C a 67.1°C, a una concentración de primers de entre 200nM a 500nM y una concentración de dNTPs de 30 $\mu$ M. Las concentraciones de ADN genómico que producen productos de PCR van de entre 0.0008ng a 345 ng.

e) Resolución de los productos de PCR de 136 y 140 pb correspondientes a los oligos SEQ ID Nos: 7 y 8. Dado que en los geles de agarosa al 2% utilizados cotidianamente para la identificación de productos de PCR no es posible distinguir diferencias de unas pares de bases entre bandas de tamaños muy similares, en el caso de los productos de PCR obtenidos para la pareja de oligonucleótidos SEQ ID Nos. 7 y 8 se verificó la presencia de los dos productos tanto por resecuenciación como por gel de acrilamida nativo. Así, para comprobar que

efectivamente se obtienen únicamente dos bandas de 136 y 140 correspondientes a los productos de PCR de los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos.: 7 y 8, se hizo un gel de poliacrilamida nativo al 6% y teñido con bromuro de etidio. Como se aprecia en la figura 24, a diferentes concentraciones de ADN (partiendo de una concentración de ADN de 345 ng en 30 microlitros de reacción final y cargando en los carriles M1 6 microlitros, M2 3 microlitros, M3 5 microlitros y M4 4 microlitros de dicho volumen de 30 microlitros), se ve la presencia de las dos bandas de 136 y 140 pares de bases esperadas.

De la estandarización de condiciones experimentales para el diagnóstico de *C. glabrata* se desprende que se pueden utilizar una amplia variedad de parejas de oligonucleótidos diseñados a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5, y que adecuando las condiciones de concentración de ADN genómico, oligonucleótidos, dNTP's y temperatura de reacción de PCR, por ejemplo, se obtiene una excelente resolución de los productos de PCR de los tamaños esperados para cada secuencia, y, como se comprueba en las figuras 2 a 11 y mas adelante en las figuras 13 a 18 dicha identificación es específica y sensible para diversos aislados de *C. glabrata* provenientes



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

5 pasan a la prueba de tubo germinal, con una incubación de 2 horas a 35°C, en donde se reportan como positivo para *C.albicans* y *C. dubliniensis*. 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

10 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. glabrata* es de 6 días, con una sensibilidad de alrededor del 85%.

Método de identificación de *C. glabrata* de la presente

15 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

20 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 5, como por ejemplo, pero no limitado a los descritos en las SEQ ID Nos. 6 a 52, 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. glabrata*. El tiempo total de la prueba es de 6 horas.

Método tradicional de identificación de *Candida glabrata* en muestras sanguíneas: Las muestras de sangre se incuban durante 72 horas en el equipo automatizado BACTEC9240. Cuando hay crecimiento de los microorganismos, estos metabolizan los nutrientes contenidos en el medio de cultivo liberando CO<sub>2</sub>. La liberación de CO<sub>2</sub> 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 5 35°C y se reporta como positivo para *C.albicans* y *C. dubiniensis*. 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 10 horas y son leídas para identificar *C. glabrata*. El tiempo total mínimo para la identificación es de 9 días.

Método para detectar *C. glabrata* 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 CO<sub>2</sub>. La liberación de CO<sub>2</sub> 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 hierva la pastilla. El ADN genómico obtenido es el templado del PCR donde se

utilizan cualesquiera de los oligonucleótidos generables a partir de las SEQ ID Nos. 1 a 5, como por ejemplo, pero no limitado a los descritos en las SEQ ID Nos. 6 a 52, 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. glabrata*. El tiempo total de la prueba es de 3 días.

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

De tal manera, el paso crítico es obtener ADN genómico suficiente de cualquiera de los tipos de muestras descritos anteriormente (ver sección de obtención de muestras clínicas), y a partir de las mismas, se utiliza el ADN genómico obtenido como el templado del PCR donde se utilizan cualesquiera de los oligonucleótidos generables a partir de las SEQ ID Nos. 1 a 5, como por ejemplo, pero no limitado a los descritos en las SEQ ID Nos. 6 a 52, en condiciones óptimas de reacción. 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 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. glabrata*. Cabe señalar que dichos oligonucleótidos pueden estar conformados por nucleótidos sin marcar o marcados, como por ejemplo, pero no limitado a, marca radioactiva, marca quimioluminiscente, luminiscente, fluorescente, biotinilada.

A fin de comprobar la utilidad del método de diagnóstico de la presente invención, se realizaron pruebas con muestras clínicas de diferentes orígenes, utilizando combinatorias distintas de los oligos generados a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5. Dichos experimentos se describen a continuación:

a) Identificación de *C. glabrata* en muestras clínicas de diferentes orígenes: en las figuras 25 y 26 se ejemplifica la detección de *C. glabrata*, en este caso en muestras de orina y sangre. En el 100% de las muestras se detectó a *C. glabrata*, no produciéndose producto de PCR en el control negativo y en muestras con *C. albicans*. Esto indica que el método de la presente invención es 100% específico y 100% sensible para *C. glabrata* y no hay reacción cruzada con otras especies. La presencia o ausencia de ciertas bandas sugiere una posible variación en los serotipos

de las muestras clínicas, aunque se requiere investigación adicional a este respecto. Un reporte reciente que apoya esta hipótesis se encuentra en Polakova, S. et al. PNAS, Vol. 106, No. 8, pags. 2688-2693, 24 feb 2009; en donde se sugiere que existen

5 rearreglos cromosomales en *C. glabrata* como un mecanismo de virulencia en aislados clínicos. Por lo tanto, no es inconsistente con el objeto y materia de la presente invención la presencia o ausencia de bandas en muestras clínicas, siempre y cuando las presentes coincidan en secuencia y tamaño con las previstas en

10 la presente solicitud. Asimismo, y para comprobar lo anterior, por medio de resecuenciación de las bandas obtenidas, se afirma que corresponden tanto al tamaño como a las secuencias esperadas para los productos de PCR de *C. glabrata*.

b) Detección de especies filogenéticamente

15 relacionadas a *C. glabrata*: con el objeto de comprobar que las regiones del elemento negativo (EN) y por ende las sondas descritas y reclamadas en la presente solicitud son exclusivas de *C. glabrata*, se probaron tres pares de oligonucleótidos con las siguientes especies: *Candida glabrata*, *Candida albicans*,

20 *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida kruzei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces*

*castelii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces kudriavzevii*,  
*Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces paradoxus*,  
*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces waltii*, *Ashbya gossypii*,  
*Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*. Como se puede  
5 apreciar en la figura 27, los oligonucleótidos de las SEQ. ID. Nos. 9  
y 10 de la presente invención únicamente amplificaron la región  
del EN de los controles correspondientes a *C. glabrata*, por lo  
que se comprueba que las regiones EN y sondas asociadas son  
únicas de dicha especie y son útiles para la detección de *C.*  
10 *glabrata*, con una sensibilidad y especificidad del 100%. Las  
bandas de los carriles 3 a 17 corresponden al control interno con  
sondas de rRNA26S (carriles 3 a 7) y rRNA 18S (carriles 8 a 17) de  
las especies filogenéticamente relacionadas enlistadas  
anteriormente.

15 c) Detección de *C. glabrata* en mezcla con otras  
especies filogenéticamente cercanas: en la figura 28 se muestra  
la detección de *C. glabrata* en distintas muestras biológicas y  
combinada con diferentes especies filogenéticamente  
cercanas. Como se puede apreciar a partir de esta figura, no  
20 hay productos de PCR en el carril con muestras de *Candida*  
*albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, mismas que se

encuentran en una cantidad constante de 100ng de ADN por especie probada; en cambio, en las muestras con mezcla de *C. albicans* y *C. glabrata*, en donde *C. glabrata* está presente en cantidades que van desde 345 ng hasta 2.5 ng, se detecta dicho microorganismo con los productos de PCR del tamaño esperado, no así en el último carril, en donde la mezcla de microorganismos no incluye ADN de *C. glabrata*. Esto también es una prueba fehaciente de la especificidad y sensibilidad de la prueba al 100%.

Una modalidad adicional de la presente invención comprende un kit de diagnóstico para *C. glabrata*, el cual estará conformado por al menos un oligonucleótido generable a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5, de entre 15 a 35 pares de bases, ya sea liofilizado o resuspendido en un vehículo aceptable, una muestra de ADN genómico de *C. glabrata* como control positivo y una muestra de ADN genómico de alguna especie filogenéticamente cercana a *C. glabrata* como control negativo. Variantes en dichos elementos serán fácilmente deducibles por un técnico en la materia y quedan comprendidas dentro del alcance de la presente solicitud.

Método de detección de *C. glabrata* por Hibridización de ácidos nucleicos.

Fragmentos de las SEQ. ID Nos. 1 a 5 son útiles para la detección de *C. glabrata* por métodos de hibridación de ácidos nucleicos convencionales. Para tal efecto, los pasos a seguir son:

- a) Obtener ácidos nucleicos de una muestra biológica,
- 5 b) Hibridar dicho ácido nucleico proveniente de una muestra biológica con una sonda que provenga de cualquier fragmento continuo de más de 36 pares de bases contenido en las SEQ ID Nos. 1 a 5.
- c) Detectar la hibridación por algún método  
10 convencional.

La sonda derivada de las SEQ ID Nos. 1 a 5 puede ser obtenida a partir de corte con enzimas de restricción o puede ser un producto de PCR. Asimismo, dicha sonda puede estar marcada radioactivamente, por fluorescencia, biotinilación, luminiscencia,  
15 quimioluminiscencia o similares.

Los métodos para detectar la hibridación de la sonda con la muestra biológica son aquellos conocidos como métodos de hibridación de ácidos nucleicos, y pueden seleccionarse, por ejemplo pero no limitado a: Dot-Blot, Southern Blot, Northern Blot, microarreglos,  
20 hibridización in situ o similares. Como referencia, mas no para limitar el

alcance de la invención, se cita: MOLECULAR BIOMETHODS HANDBOOK 2008 JOHN M. WALKER RALPH RAPLEY; Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 2nd ed. L. Cseke, et al., ed., CRC Press, 2004, 600 pp; Ausubel FM et al. (1999) Short  
5 protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons; Fasmann GD (1989) Practical handbook of biochemistry and molecular biology. Florida CRC Press, 1989, Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory  
10 Press.

Una modalidad adicional de la presente invención comprende un kit de diagnóstico para *C. glabrata*, el cual estará conformado por al menos una molécula de ADN de al menos 36 pares de bases contenida dentro de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5, ya sea liofilizada o  
15 resuspendida en un vehículo aceptable, una muestra de ADN genómico de *C. glabrata* como control positivo y una muestra de ADN genómico de alguna especie filogenéticamente cercana a *C. glabrata* como control negativo. Variantes en dichos elementos serán fácilmente deducibles por un técnico en la materia y quedan  
20 comprendidas dentro del alcance de la presente solicitud.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1. Análisis de muestras clínicas de orina.

Se tomaron 234 muestras clínicas de orina y se clasificaron por el método tradicional descrito anteriormente, en donde 200 muestras se clasificaron como No Desarrolló hongos, 9 como *C.albicans* y 25 como *Candida sp.* De estas 25 muestras, 6 (24%) fueron clasificadas como *C. glabrata*. Con el método de detección de la presente invención se identificaron 12 (48%) muestras positivas para *C. glabrata*.

Ejemplo 2. Comparativo entre varias especies de levaduras y *C. glabrata* con el método de detección de la presente invención.

En la figura 28 se demuestra la especificidad de los oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 en mezclas de *C. glabrata* con especies filogenéticamente cercanas, como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis*. En cada uno de los geles mostrados se utilizaron los oligonucleótidos de las secuencias SEQ. ID. Nos. 7 y 8. Como se puede apreciar, únicamente en aquellos carriles en donde está presente el ADN de *C. glabrata*, aún en mezcla con otros microorganismos, se logra la amplificación de los fragmentos de los tamaños esperados. Por lo tanto, los oligonucleótidos de la presente invención son capaces de detectar específicamente la

presencia de *C. glabrata* en muestras complejas, aún en cantidades mínimas de ADN de *C. glabrata* de entre 2.5 y 345 ng.

Ejemplo 3. Sensibilidad de la prueba de diagnóstico de la presente invención en aislados clínicos.

5 Con el objeto de probar la sensibilidad de los oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 para la identificación de *C. glabrata* en muestras clínicas, se probaron los oligonucleótidos con SEQ. ID. Nos. 6 a 10. En las figuras 29 y 30 se observan los resultados de las distintas amplificaciones, con los

10 tamaños de producto de PCR esperados. Cabe hacer mención que en las figuras 29 y 30, en los carriles 14, 17 y 33 no se obtuvo producto de amplificación. En estos casos, se corroboró la identificación de *C. glabrata* con pruebas bioquímicas y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 1.

15 Tabla 1. Análisis con prueba API-20 de los aislados clínicos 14, 17 y 33 de las Figuras 29 y 30.

Aislado clínico	Especie identificada	Código API-20	Descripción
14	<i>Candida paratropicalis</i>	2552170	Muy buena identificación
17	<i>Candida paratropicalis</i>	2552170	Muy buena identificación
33	<i>Candida albicans</i>	2546170	Aceptable identificación de <i>C. albicans</i>

Asimismo, los productos de PCR amplificados provenientes de aislados clínicos fueron re-secuenciados para verificar que dichas bandas corresponden a la secuencia esperada de *C. glabrata* y no de alguna otra especie, incluyendo humanos. De dicha secuenciación, se comprobó que efectivamente las bandas de amplificación en todos los casos correspondían a la secuencia específica de *C. glabrata* esperada.

Por lo tanto, por medio de esta serie de experimentos se comprueba fehacientemente la sensibilidad y especificidad de los oligonucleótidos generables a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5.

Ejemplo 4. Detección de *C. glabrata* utilizando diferentes combinatorias de los oligonucleótidos generables a partir de las SEQ ID Nos. 1-5.

A fin de comprobar que cualquier porción de las secuencias descritas en las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 son útiles para la identificación de *C. glabrata*, se generaron oligonucleótidos adicionales (SEQ. ID. Nos. 11 a 52), mismos que abarcan todas las regiones intergénicas de las adhesinas EPA1, EPA22, EPAH, EPA6 y EPA7. Asimismo, se comprobó su utilidad tanto para *C. glabrata* sola o en mezcla con otras especies filogenéticamente relacionadas. En las figuras 2 a 11 se muestran las diferentes combinatorias obtenibles a

partir de los oligonucleótidos de las SEQ ID Nos. 11 a 52 y los tamaños de producto de PCR esperados. Los resultados demuestran que la totalidad de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 sirve como base para la generación de oligonucleótidos específicos para *C. glabrata*, se mantiene la sensibilidad y la especificidad de la prueba, y que es posible detectar el hongo en mezcla con otras levaduras. Por lo tanto, cualquier oligonucleótido generable a partir de las SEQ. ID. Nos. 1 a 5 entra dentro del alcance de la presente solicitud.

Ejemplo 5. Detección de *C. glabrata* por medio de hibridación de ácidos nucleicos.

Para comprobar la eficiencia y sensibilidad del método de detección por hibridación de ácidos nucleicos, se realizó un Dot-Blot utilizando como sonda una secuencia de ácidos nucleicos de 140 pb marcada con luminiscencia común para las SEQ. ID No. 1, 2 y 3 para ser hibridada contra diversos templados de ADN. Como se puede observar en la figura 31, dicha sonda hibridó únicamente contra el control interno, el ADN de *C. glabrata* proveniente de dos muestras biológicas de aislados clínicos y el ADN de una cepa silvestre de *C. glabrata*. No se obtuvo hibridación contra el ADN de *C. albicans* ni *S. cerevisiae*. Por lo tanto, se comprueba la sensibilidad y especificidad de las sondas derivadas de las SEQ ID Nos. 1 a 5 para la identificación

específica de *C. glabrata* al 100% en métodos de hibridación de ácidos nucleicos.

Puesto que se pueden hacer varios cambios a la materia ejemplificada anteriormente sin apartarse del alcance de la invención, 5 se pretende que todos los asuntos contenidos en la descripción anteriormente dada y mostrada en las figuras acompañantes deben interpretarse como ilustrativos y no en un sentido limitante.

## **NOVEDAD DE LA INVENCION**

### **REIVINDICACIONES**

1.- Una molécula de ADN, caracterizada porque es una región intergenica de los genes de adhesinas de *C. glabrata* y se  
5 selecciona a partir del grupo que consiste de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5.

2.- La molécula de ADN de conformidad con la reivindicación 1, en donde dichas regiones intergénicas son: EPA1 a EPA 2 para la SEQ ID No. 1, EPA-H a Telomero para la SEQ. ID No. 2,  
10 EPAK a EPA22 para la SEQ. ID. No. 3, EPA6 a Telómero para la SEQ. ID. No. 4 y EPA7 a Telómero para la SEQ. ID. No. 5.

3.- Un oligonucleótido para la identificación específica de *C. glabrata*, caracterizado porque consiste de una secuencia continua de 15 a 35 nucleótidos de las secuencias de ADN que se seleccionan a  
15 partir del grupo que consiste de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5.

4.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 3, en donde dicho oligonucleótido se puede seleccionar de al menos una de las secuencias SEQ ID Nos. 6 a 52.

5.- El oligonucleótido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque la secuencia de dicho oligonucleótido es al menos 90% complementaria a cualquiera de las SEQ ID Nos. 1 a 5.

5                   6.- Un método in vitro para la identificación específica de *C. glabrata*, caracterizado porque comprende los pasos de: a) amplificar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica mediante PCR con los oligonucleótidos como se definieron en las reivindicaciones 3 a 5; b) identificar los fragmentos de ADN  
10   amplificados.

7.- El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la muestra biológica es derivada de un sujeto en estudio.

8.- El método de conformidad con la reivindicación 7, en donde el sujeto en estudio es un animal mamífero.

15                   9.- El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde el sujeto en estudio es un humano.

10.- El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de cualquier tipo de muestra que contenga ADN, fluidos, tejido, desecho  
20   o célula, 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 5 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, 10 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.

15                   11.- El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la amplificación de fragmentos de ADN se lleva a cabo con al menos un oligonucleótido como se definió en las reivindicaciones 3 a 5.

                    12.- Un kit para la identificación específica de *Candida glabrata*, caracterizado porque comprende al menos uno de los 20 oligonucleótidos como se definieron en las reivindicaciones 3 a 5.

13.- El kit de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque comprende al menos una muestra de ADN genómico de *C. glabrata* (control positivo) y al menos una muestra de ADN genómico de al menos una especie filogenéticamente relacionada con *C. glabrata* (control negativo).

14.- El uso de una molécula de ADN como la que se reclama en la reivindicación 1, para generar oligonucleótidos útiles para la identificación específica de *C. glabrata*.

15.- El uso de al menos dos oligonucleótidos como los descritos en las reivindicaciones 3 a 5, para identificar *C. glabrata*.

16.- Una molécula de ADN útil para la identificación específica de *C. glabrata*, caracterizada porque consiste de una secuencia continua de 36 o mas nucleótidos comprendidos dentro de las secuencias de ADN que se seleccionan a partir del grupo que consiste de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5.

17.- La molécula de ADN de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada además porque dicha secuencia es al menos 90% complementaria con respecto a cualquiera de las SEQ ID Nos. 1 a 5.

18.- Un método in vitro para la identificación específica de *C. glabrata*, caracterizado porque comprende los pasos de: a) hibridar fragmentos de ADN a partir de una muestra biológica con las moléculas de ADN como se definieron en las reivindicaciones 16 a 17;

5 b) identificar los fragmentos de ADN hibridados.

19.- El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde los pasos a) y b) se llevan a cabo por medio de una técnica seleccionada del grupo que comprende: Dot-Blot, Southern Blot, Northern Blot, hibridización in situ o microarreglos.

10 20.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde la muestra biológica es derivada de un sujeto a estudio.

21.- El método de conformidad con la reivindicación 20, en donde el sujeto a estudio es un animal mamífero.

15 22.- El método de conformidad con la reivindicación 21, en donde el sujeto a estudio es un humano.

23.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de cualquier tipo de muestra que contenga ADN, fluidos, tejido, desecho o célula, orina chorro medio, cultivo de orina por sonda, cultivo por

20 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, 5 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); 10 post-mortem (hígado, pulmón, bazo); herida; hisopado (perianal, vaginal, úlcera (pie, mano)); absceso (muslo, riñón, perianal); ó peripancreático.

24.- El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde el paso a) se lleva a cabo con al menos una molécula de ADN 15 como se definió en las reivindicaciones 21 a 22.

25.- Un kit para la identificación específica de *Candida glabrata*, caracterizado porque comprende al menos una molécula de ADN como se definió en las reivindicaciones 16 a 17.

26.- El kit de conformidad con la reivindicación 25, 20 caracterizado además porque comprende al menos una muestra de ADN genómico de *C. glabrata* (control positivo) y al menos una

muestra de ADN genómico de al menos una especie filogenéticamente relacionada con *C. glabrata* (control negativo).

- 27.- El uso de una molécula de ADN como la que se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, para identificar
- 5 *C. glabrata*.

### **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención describe y reclama un método *in vitro* para la identificación de *Candida glabrata*, las secuencias asociadas a dicha identificación, así como kits de diagnóstico para

5 identificar a *C. glabrata* y el uso de los mismos.

FIGURA 1

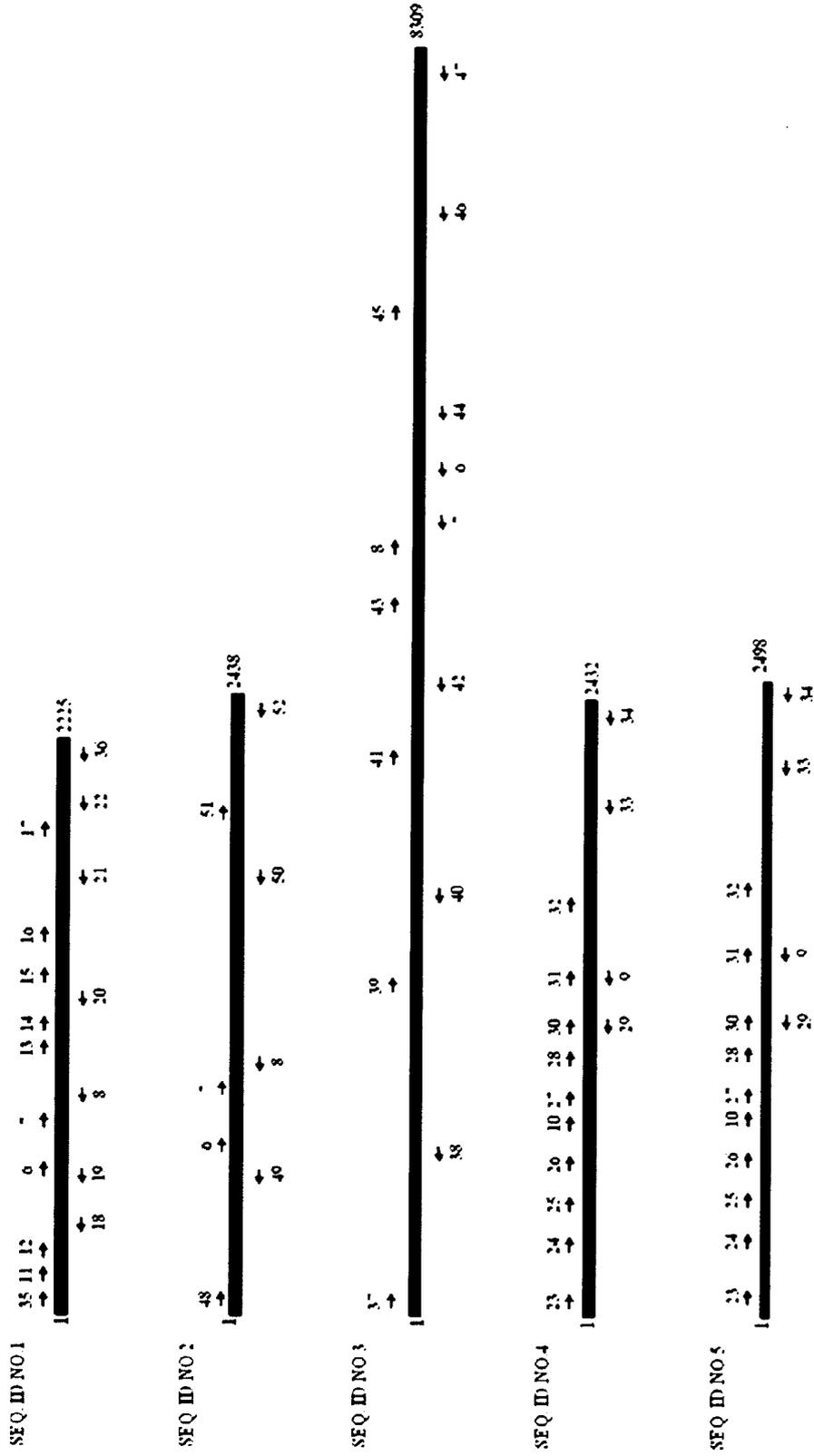




FIGURA 4



FIGURA 5

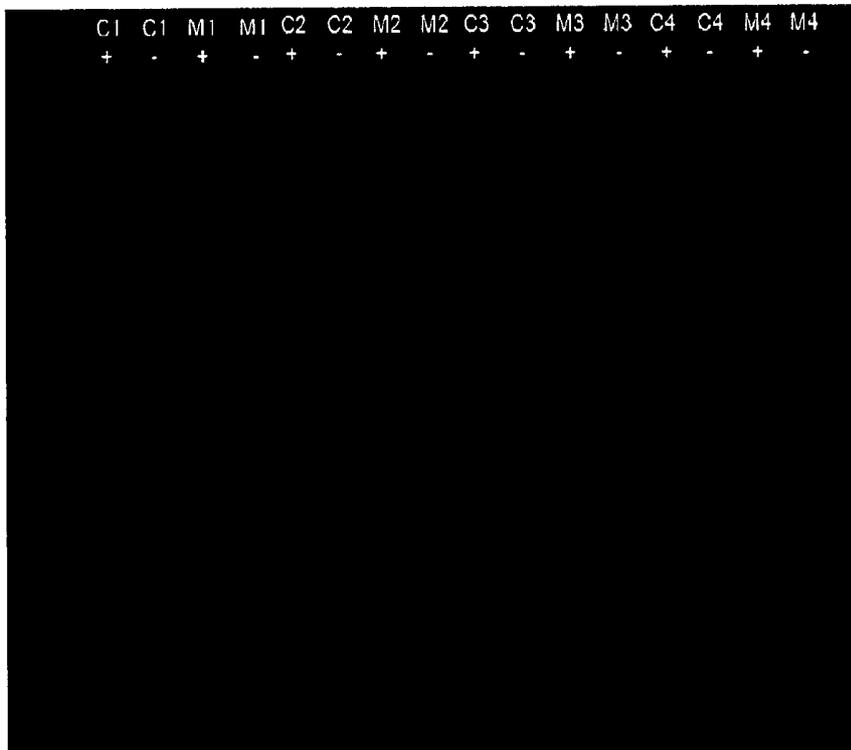


FIGURA 6

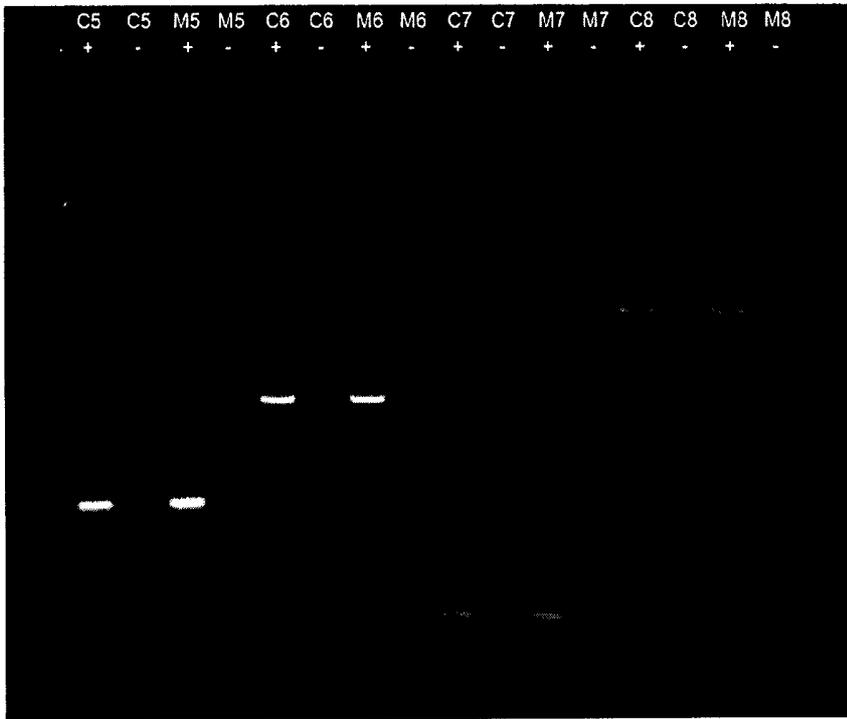


FIGURA 7

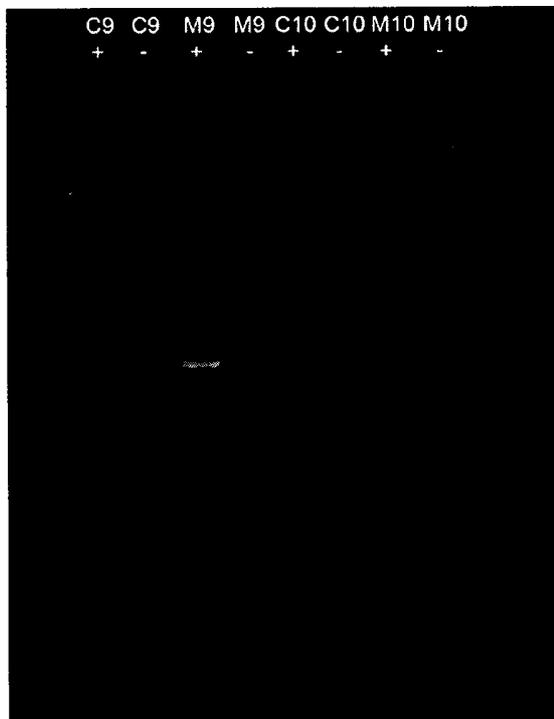




FIGURA 10

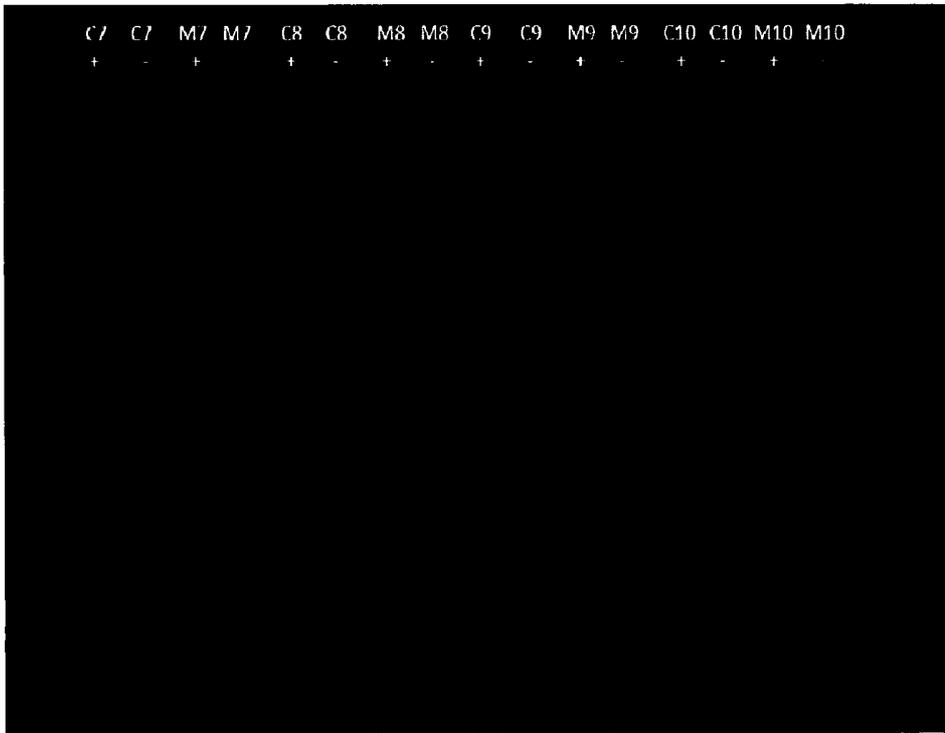


FIGURA 11

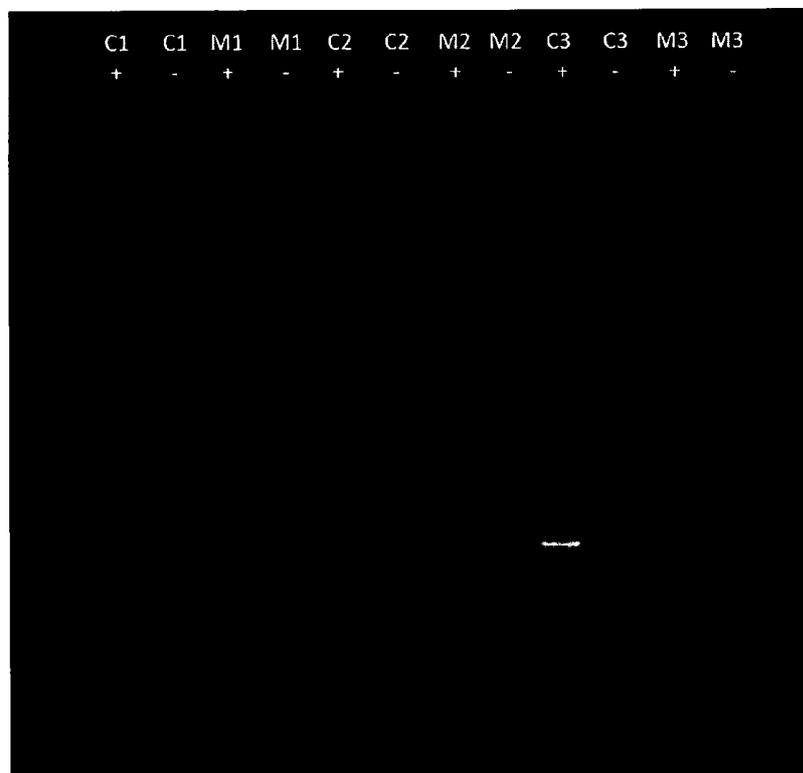


FIGURA 12

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



FIGURA 13

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

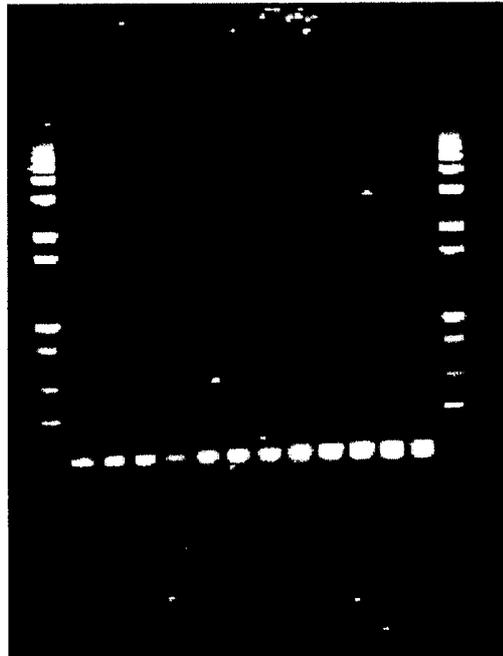


FIGURA 14

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

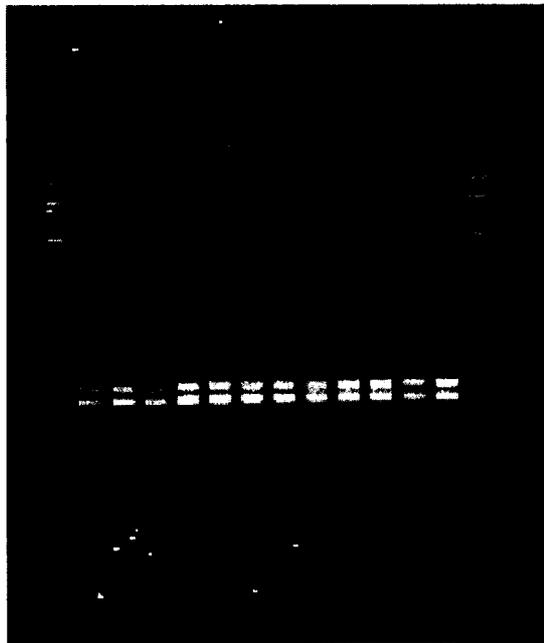


FIGURA 15

1 2 3 4 5 6 7 8

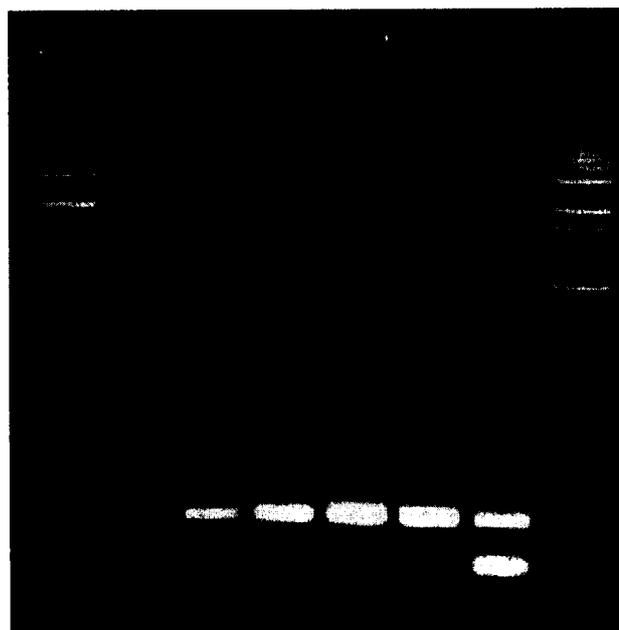


FIGURA 16

1 2 3 4 5 6 7

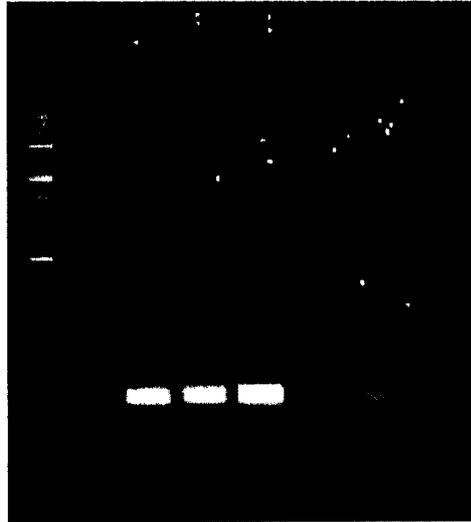
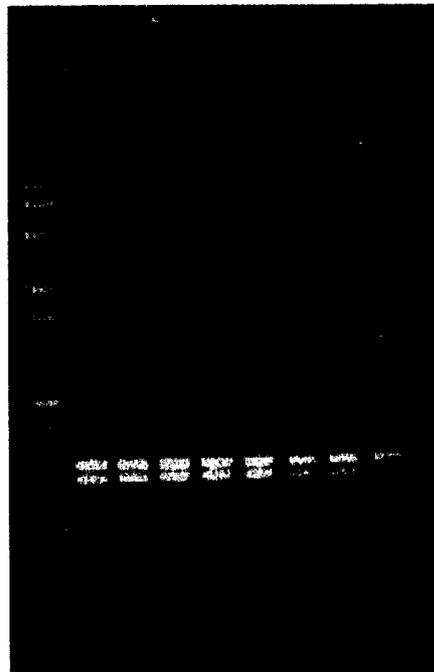


FIGURA 17

1 2 3 4 5 6 7 8 9



**FIGURA 18**

1 2 3 4 5 6 7 8



**FIGURA 19**

1 2 3 4 5 6 7 8 9



FIGURA 20

1 2 3 4 5 6 7 8

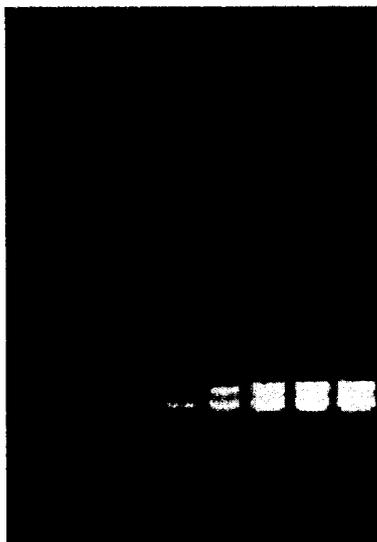


FIGURA 21

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

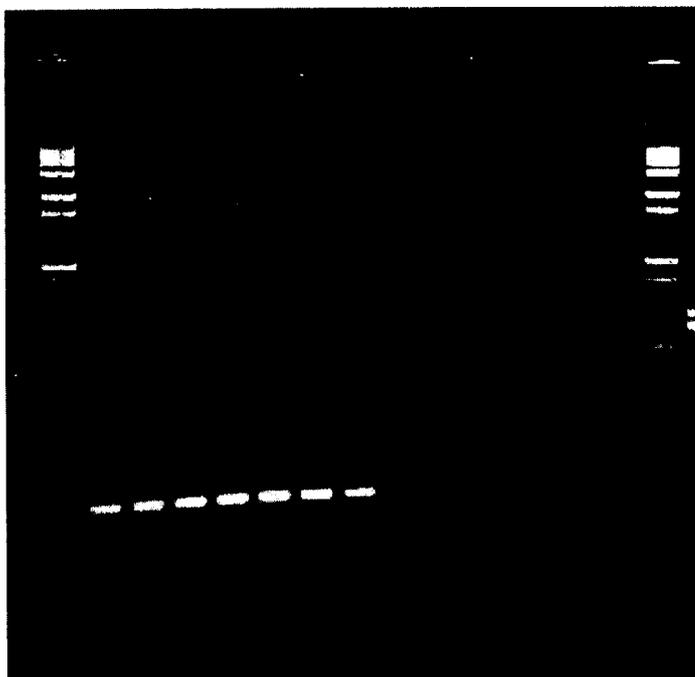


FIGURA 22

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

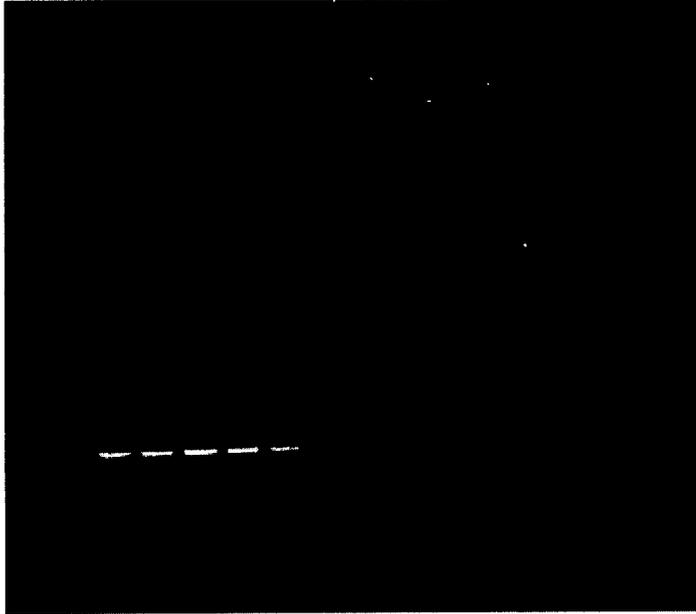


FIGURA 23

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

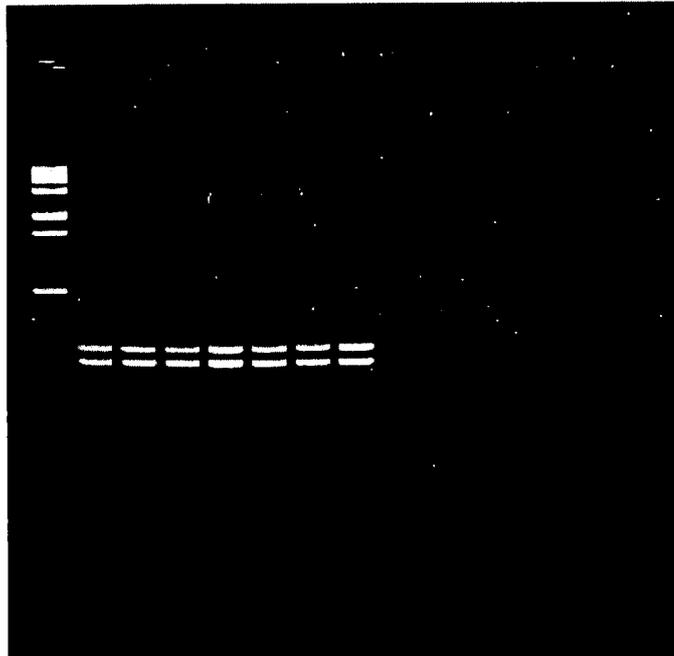


FIGURA 24

A.

PM M1 M2 M3 M4



B.

PM M1 M2 M3 M4

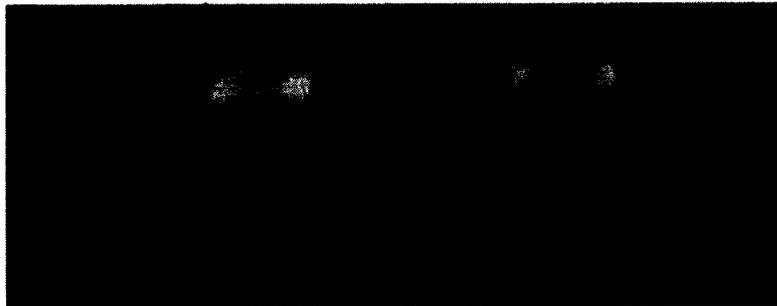


FIGURA 25

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

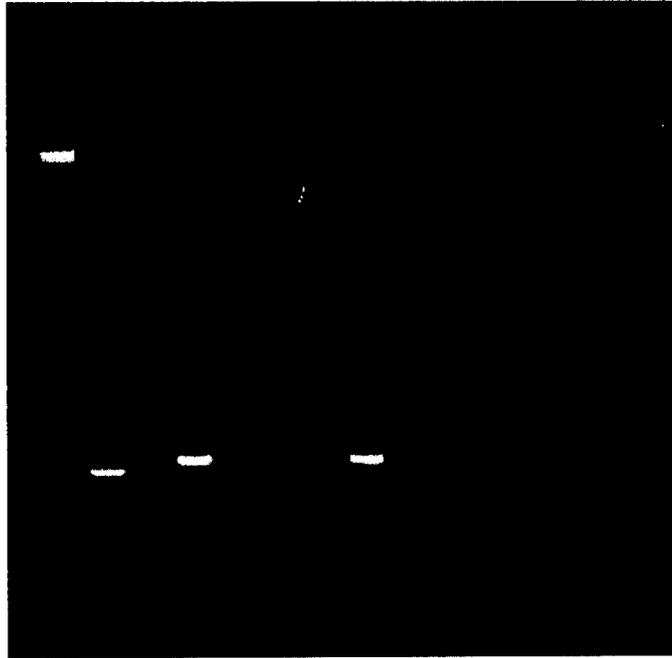


FIGURA 26

1 2 3 4 5 6

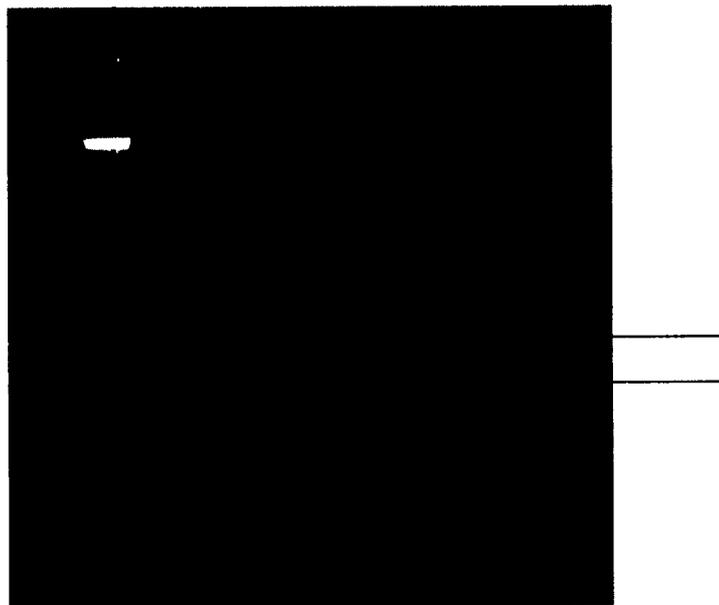


FIGURA 27

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

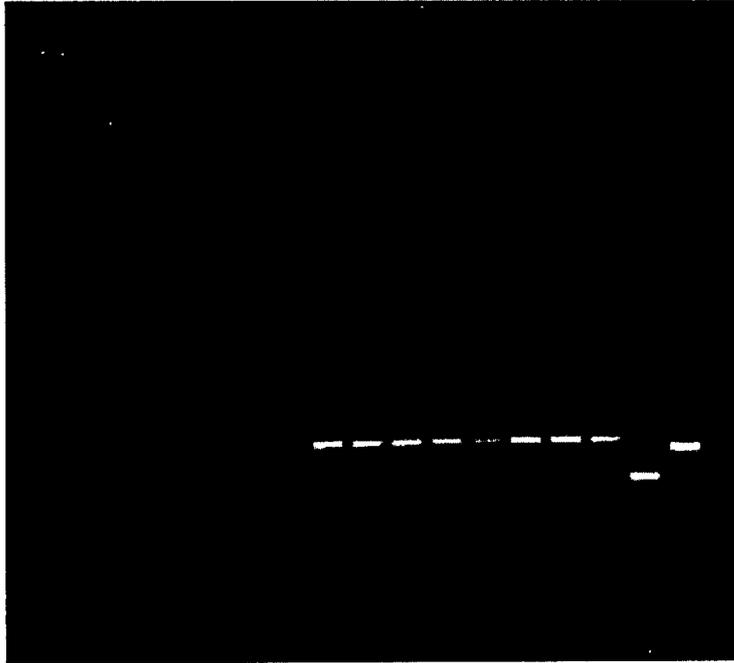
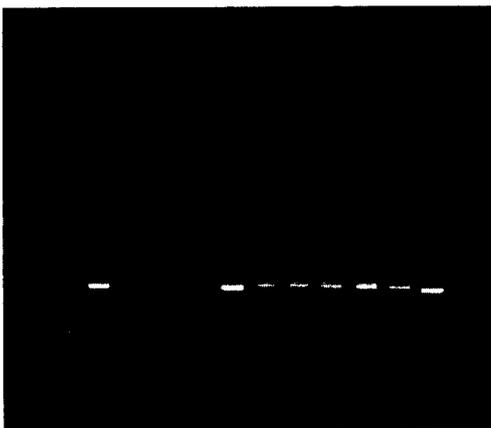


FIGURA 28

A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



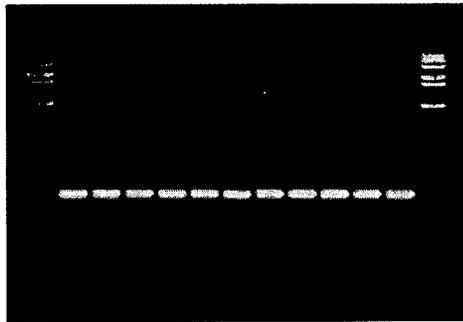
B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



FIGURA 29

M C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 M M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35



M 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 M

FIGURA 30

M C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 M M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 M



FIGURA 31

