

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 335 179**

②1 Número de solicitud: 200802665

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

④2 Fecha de presentación: **19.09.2008**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2010**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.03.2010

⑦1 Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III
c/ Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES**

⑦2 Inventor/es: **Buitrago, María José;
Cuenca-Estrella, Manuel;
Rodríguez-Tudela, Juan Luís y
Gómez López, Alicia**

⑦4 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤4 Título: **Método para la detección simultánea de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*.**

⑤7 Resumen:

Método para la detección simultánea de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*.

La presente invención se refiere a un método de detección simultánea de ADN de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* mediante la técnica de PCR multiplex cuantitativa en tiempo real, basada en sondas específicas marcadas con dos fluoróforos diferentes. Esta técnica es aplicable tanto en muestras biológicas como en cultivos microbiológicos y muestras ambientales. Además, otro aspecto de la invención es un kit que permite detectar los dos microorganismos de forma simultánea.

ES 2 335 179 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección simultánea de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*.

5 La presente invención se refiere a un método de detección simultánea de ADN de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* mediante la técnica de PCR multiplex cuantitativa en tiempo real, basada en sondas específicas marcadas con dos fluoróforos diferentes. Esta técnica es aplicable tanto en muestras biológicas como en cultivos microbiológicos y muestras ambientales. Además, otro aspecto de la invención es que se ha desarrollado un kit que permite detectar los dos microorganismos de forma simultánea.

10 **Estado de la técnica anterior**

15 Los microorganismos *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* son los causantes de las enfermedades conocidas como histoplasmosis y paracoccidioidomicosis. Estas enfermedades son micosis primarias de aparición frecuente en determinadas zonas geográficas especialmente en áreas tropicales y subtropicales de clima templado y húmedo. En estas zonas endémicas, la aparición del SIDA ha agravado el problema de las micosis primarias hasta convertirlo en una de las patologías más frecuentes. La prevalencia de estas enfermedades está aumentando en España debido a infecciones importadas en viajeros o emigrantes procedentes de zonas endémicas, especialmente de la población procedente de Latinoamérica. Según el Instituto Nacional de Estadística (www.ine.es), un 35% de la población emigrante que reside en España procede de zonas endémicas y, además, un millón de españoles viaja cada año a estos países.

20 En zonas endémicas, la histoplasmosis es una de las infecciones oportunistas más frecuentes en pacientes con SIDA. Por tanto, la histoplasmosis debe ser incluida en el diagnóstico diferencial de pacientes sudamericanos con SIDA, con signos de infección sistémica y afectación del sistema mononuclear-fagocítico. En el caso de la histoplasmosis del viajero o del turista, la enfermedad se manifiesta como una infección respiratoria que puede variar en cuanto a su sintomatología, desde un cuadro catarral a una infección grave que pone en peligro la vida del enfermo.

25 Respecto a la paracoccidioidomicosis, es la micosis sistémica más frecuente de América Tropical y, aunque en Europa es poco frecuente, se han descrito varios casos en los últimos años asociados a población procedente de regiones endémicas. Generalmente estos pacientes presentan la forma crónica de la enfermedad que puede ser unifocal afectando al pulmón o multifocal representada por una serie de lesiones cutáneas o mucosas y con afectación del pulmón. Es frecuente, además, que hayan transcurrido varios años desde que se adquiere la enfermedad hasta que se desarrollan los síntomas. La paracoccidioidomicosis también debe ser incluida en el diagnóstico diferencial en pacientes procedentes de Latinoamérica con una infección respiratoria, aparezcan o no lesiones cutáneas.

30 El diagnóstico de ambas micosis es complicado por lo que, hasta la fecha, el diagnóstico de certeza se ha basado en el cultivo del microorganismo y posterior identificación mediante técnicas microscópicas o de detección de exoantígenos. No obstante, el cultivo puede tardar 1 ó 2 semanas en ser positivo y la identificación puede resultar compleja en centros sin experiencia. La visión de estructuras fúngicas puede ayudar a iniciar el tratamiento, pero no confirma el diagnóstico. Las pruebas serológicas también pueden ayudar al diagnóstico, pero tienen una especificidad limitada en zonas endémicas y una sensibilidad baja en enfermos inmunodeprimidos. Por otra parte, en el caso de la histoplasmosis, existe una técnica de detección de antígeno en orina, que tiene una gran fiabilidad, incluso en enfermos inmunodeprimidos. Pero, hasta la fecha, esta técnica no se ha comercializado y sólo está disponible en centros de referencia de los EE.UU.

35 Ante esta situación, el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología ha desarrollado el procedimiento descrito en esta invención para detectar simultáneamente ambos patógenos fúngicos ya que la clínica es similar en ambos y la población susceptible de ser afectada por dichos patógenos es la misma.

40 El método descrito en la presente invención provee de una herramienta que soluciona algunos de los problemas presentados por otros métodos, ya que se reduce de manera significativa el tiempo empleado por los métodos diagnósticos convencionales (se reduce de 1-2 semanas a 1-2 días) y sirve para detectar simultáneamente ambos microorganismos *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Asimismo, la rapidez en la detección permitirá adelantar el inicio del tratamiento de la histoplasmosis y/o de la paracoccidioidomicosis, mejorando el pronóstico de los enfermos y permitirá realizar el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

55 **Explicación de la invención**

60 En la presente invención se describe un método de detección simultánea de ADN de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* mediante la técnica de PCR multiplex cuantitativa en tiempo real, basada en sondas específicas del tipo *molecular beacon* (faro molecular) marcadas con dos fluoróforos diferentes.

65 Los *molecular beacons* son sondas que tienen una forma de horquilla o de bucle, incorporando un fluoróforo emisor y un *quencher*, que inhibe la emisión de fluorescencia mientras que la sonda no hibride. Cuando la sonda se une al ADN, se forma una doble hélice rígida, por lo que la sonda pierde su forma de horquilla, separándose el emisor del *quencher*, lo que origina la fluorescencia detectable. Los *molecular beacons* constan de 10-30 pares de bases, permiten la detección de cambios de una sola base y son sondas especialmente indicadas para usar en ensayos de PCR multiplex ya que pueden marcarse con diferentes fluoróforos y poseen unas propiedades termodinámicas que favorecen una alta especificidad.

ES 2 335 179 A1

El método descrito en la presente invención presenta una serie de ventajas respecto de las técnicas convencionales:

1. Fiabilidad y sencillez para identificar *Histoplasma* y *Paracoccidioides* en cultivo.
2. En muestras biológicas, la técnica muestra una sensibilidad superior a la de las pruebas serológicas.
3. En lo que se refiere a muestras relacionadas con el aparato respiratorio, tiene una sensibilidad comparable a la de la identificación por cultivo.
4. Las técnicas de PCR tienen una especificidad del 100%, ya que no amplifican ADN de otras especies fúngicas.
5. Su utilización en muestras biológicas permite reducir el tiempo de diagnóstico de los 10-14 días en la identificación por cultivo, a 24-48 horas.
6. La técnica de PCR aplicada a muestras biológicas puede realizarse en instalaciones con niveles de bioseguridad convencionales (nivel 2).

En cuanto a las características innovadoras, pueden destacarse:

1. La posibilidad de detectar simultáneamente ambos patógenos.
2. Su elevada especificidad, que evita pasos secundarios como la secuenciación del producto o la visualización de bandas de ADN marcadas.
3. La reducción significativa del tiempo empleado en la detección de de ambos patógenos.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención es un método para la detección simultánea de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* que comprende:

- a. obtener una muestra y aislar su ADN,
- b. amplificar un fragmento de la región ITS del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* y/o *Paracoccidioides brasiliensis* contenido en el ADN aislado en el paso (a),
- c. determinar la desviación del paso (b) con respecto a los controles. Estos controles pueden ser controles positivos y/o controles negativos,
- d. analizar la desviación del paso (c) y atribuir la misma a la presencia de los citados microorganismos.

Por el término “detección simultánea” se entiende la capacidad de este método de detectar a la vez la presencia de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* en una muestra y con una única reacción de PCR en tiempo real.

El aislamiento de la muestra de ADN se realiza mediante métodos conocidos que permiten obtener el ADN total de la muestra. De este modo, si la muestra contiene *Histoplasma capsulatum* y/o *Paracoccidioides brasiliensis*, su ADN será extraído y los fragmentos de interés de la región ITS serán amplificados como consecuencia de la alta especificidad del método.

Las regiones conocidas como ITS (*Internal Transcribed Spacer*) son secuencias de ADN ribosómico no funcional situadas entre secuencias que codifican para las subunidades de ARN ribosómico 18S y 5.8S (ITS1) y entre las subunidades 5.8S y 28S (ITS2). Los ITS presentan un alto grado de variación entre especies cercanas filogenéticamente, lo que permite usarlos de manera específica para determinar la especie así como variaciones dentro de ésta.

El término “control negativo” hace referencia a la muestra procedente de personas no infectadas con *Histoplasma capsulatum* y/o con *Paracoccidioides brasiliensis*, así como a los controles internos sin ADN que se utilizan en las reacciones de PCR para descartar contaminaciones en la manipulación de las muestras. El término “control positivo” hace referencia a muestras que contienen ADN de los microorganismos citados con total seguridad.

Una realización preferida del método descrito anteriormente es aquella en la que, para llevar a cabo la amplificación, la concentración de ADN es de al menos 10 fg/ μ l ya que ésta es cantidad que representa el límite de detección de los fragmentos de ADN de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*.

En otra realización preferida del método, la muestra puede escogerse de entre una muestra biológica, un cultivo microbiológico o una muestra ambiental.

El término “muestra biológica” hace referencia a una muestra aislada de materiales de origen biológico que pueden ser tanto de origen humano como animal o vegetal. La principal aplicación de este método va dirigida a muestras de origen humano pero el método de la presente invención puede aplicarse para detectar estos microorganismos causantes de histoplasmosis y paracoccidioidomicosis en otros seres vivos que puedan comportarse como vehículos de transmisión de los microorganismos citados. La muestra biológica puede seleccionarse de la lista que comprende muestra respiratoria, aspirados de médula ósea, líquido cefalorraquídeo, biopsia tisular, orina o fluido sanguíneo. Se entiende por fluido sanguíneo; sangre, suero o plasma.

ES 2 335 179 A1

La muestra denominada como “cultivo microbiológico” se refiere a cualquier tipo de cultivo de microorganismos realizado en medios de crecimiento tanto líquidos, sólidos como aquellos que permitan el crecimiento de los microorganismos.

5 El término “muestra ambiental” hace referencia a cualquier otro tipo de muestra procedente de cualquier medio susceptible de poder contener *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Es decir, este último tipo de muestras se refieren a muestras que pueden proceder de suelo, agua, aire o cualquier otra materia inorgánica.

10 En otra realización más preferida, la muestra biológica está relacionada con el aparato respiratorio. Una “muestra relacionada con el aparato respiratorio” se entiende una muestra de origen biológico procedente de cualquier tejido del aparato respiratorio o fluido secretado en los citados tejidos. Por tanto, son muestras relacionadas con el aparato respiratorio la secreción bronquial, el lavado broncoalveolar, el esputo o el exudado orofaríngeo, sin excluir cualquier otro tipo de muestra que se enmarque en la definición de este párrafo.

15 En otra realización preferida, la amplificación de la región ITS2 del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* se realiza por medio de los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y la amplificación de la región ITS1 del ADN ribosómico de *Paracoccidioides brasiliensis* se realiza por medio de los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

20 En otra realización preferida, la amplificación se realiza por medio de PCR multiplex en tiempo real caracterizada porque se emplean sondas específicas marcadas con dos fluoróforos diferentes.

25 Las sondas específicas consisten en una secuencia de ADN lineal y de cadena sencilla, complementario, parcialmente, de cualquier parte de la secuencia del fragmento amplificado correspondiente a los ITS de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*.

La técnica de amplificación de ADN conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

30 Desnaturalización del ADN de doble cadena que se consigue con temperaturas altas (94°C en la mayor parte de los casos), hibridación de los cebadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras (la temperatura es específica para cada par de cebadores) y extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa (el tiempo necesario para la extensión depende de la longitud del fragmento).

35 La cantidad de copias obtenidas tras la amplificación de los fragmentos es proporcional a la cantidad inicial de los mismos, es decir, a la cantidad de microorganismos presentes en las muestras (más concretamente, a la cantidad de ADN extraído y la calidad del mismo).

40 La PCR se denomina multiplex cuando se utilizan más de un par de cebadores para amplificar de forma simultánea varios fragmentos de ADN en una sola reacción de amplificación. Para poder llevar a cabo estas amplificaciones, tanto el diseño de los cebadores como de las sondas debe ser lo suficientemente específico para evitar reacciones cruzadas que den lugar a amplificaciones inespecíficas que pudieran invalidar el método. En esta invención se utiliza una combinación de cebadores y sondas que se muestran muy eficaces en la amplificación de los fragmentos.

45 Un cebador o “primer” es un oligonucleótido corto que se puede sintetizar *in vitro* para ser utilizado en diversas técnicas moleculares. Se diseñan como secuencias complementarias de una región de ADN diana que se desea detectar. Para obtener un fragmento, son necesarios dos cebadores, uno de ellos se unirá a la hebra molde (cebador directo) y el otro a la hebra complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener, mediante sucesivas amplificaciones con una enzima ADN polimerasa termorresistente, un fragmento que pueda ser detectado y/o cuantificado.

50 Para el diseño de cebadores es necesario hacer una serie de predicciones, como la temperatura de fusión (T_m) o la posibilidad de formación de horquillas que puedan reducir, por competencia, la efectividad de la hibridación con la secuencia de ADN diana. Las variables a tener en cuenta en el diseño de los cebadores son fundamentalmente: Tamaño del oligonucleótido, temperatura de fusión (T_m), especificidad con el ADN de las regiones ITS de los ADN ribosómicos de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* que se pretenden amplificar, secuencias complementarias, contenido en G/C y fragmentos de pirimidinas (T, C) o purinas (A, G), secuencia 3' terminal y secuencia 5' terminal y regiones centrales.

60 Además, para la síntesis del ADN es necesaria la presencia de nucleótidos trifosfato dNTPs, es decir, dATP, dTTP, dCTP y dGTP, ADN polimerasa termoresistente, cloruro de magnesio en una concentración determinada así como tampones que mantengan las condiciones físico-químicas adecuadas para el funcionamiento de todos los componentes y se consiga con ello la amplificación.

65 La técnica de la PCR cuantitativa o también conocida como PCR en tiempo real permite cuantificar en tiempo real la amplificación de los fragmentos de interés. El método descrito en esta invención utiliza dos sondas marcadas con un fluoróforo distinto que se une de manera específica a los fragmentos de ADN amplificados, de modo que, cada una de las sondas hibridan con el fragmento de ADN correspondiente, presente en las secuencias amplificadas de los ITS. Cada una de las sondas está marcada con un fluoróforo distinto, de este modo se detecta y cuantifica de forma

simultánea, por emisión de fluorescencia, la amplificación de cada uno de los fragmentos. Para detectar la fluorescencia procedente de cada una de las amplificaciones, sometidas todas ellas a las mismas condiciones de amplificación, el termociclador tiene acoplado un detector que mide la fluorescencia en tiempo real a lo largo del tiempo de duración de los ciclos de amplificación. Para poder conocer la concentración de ADN que se obtiene como producto, es necesario usar patrones de concentración conocida que permitan realizar un seguimiento del funcionamiento de la técnica.

Así pues, una realización más preferida del método es aquella en la que las sondas empleadas son:

- a. SEQ ID NO: 3 (los siete primeros nucleótidos son complementarios a los siete últimos) para el fragmento amplificado de *Histoplasma capsulatum* y se marca en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un *quencher* y
- b. SEQ ID NO: 6 (los seis primeros nucleótidos son complementarios a los seis últimos) para el fragmento amplificado de *Paracoccidioides brasiliensis* y se marca en el extremo 5' con un fluoróforo distinto del usado en el apartado (a) y en el extremo 3' con un *quencher*.

Las sondas empleadas en esta realización son del tipo *molecular beacon*. Estas sondas forman una horquilla debido a la presencia de 6-7 nucleótidos complementarios entre sí en ambos extremos de la secuencia, cuya estructura secundaria mantiene el fluoróforo y el *quencher* próximos, de forma que cualquier fotón emitido por el reporter es absorbido por el *quencher*. El resto de la secuencia, formada por 19 nucleótidos, situada entre los extremos complementarios, es complementaria a su vez a una parte de la secuencia de los fragmentos amplificados. Cuando la sonda hibrida con el ADN amplificado, se abre y esto aleja al fluoróforo del *quencher*, permitiendo que se emita fluorescencia que puede ser detectada y cuantificada.

El término "*quencher*" hace referencia a un desactivador o apagador de la fluorescencia, es decir, una molécula capaz de absorber los fotones emitidos por el fluoróforo y disipar la energía en forma de calor, por lo que no se produce emisión de fluorescencia.

En una realización aún más preferida, el fluoróforo del apartado (a) es FAM (5 o 6-carboxifluoresceína), el fluoróforo del apartado (b) es HEX (5'-hexachloro-fluoresceína fosforamidita) y el *quencher* es BHQ1.

Otro aspecto de la presente invención es el método descrito en los párrafos precedentes como herramienta para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de histoplasmosis y/o paracoccidioidomicosis donde se realizan tomas de muestras seriales de pacientes que han recibido un tratamiento. El análisis del ascenso o del descenso de la cuantificación del ADN fúngico permitirá evaluar si la respuesta al tratamiento es negativa o positiva, respectivamente.

El procedimiento de monitorización comprende una serie de pasos que comienzan por la toma de muestras seriales. Se entiende por toma de muestras seriales a la extracción de cualquier tipo de muestras biológicas, incluidas las mencionadas en esta invención. La toma de muestras se realiza a diferentes tiempos desde que se administra el tratamiento, de forma que la cuantificación de la amplificación de los fragmentos de los ITS de los respectivos microorganismos en cada una de las muestras procedentes del mismo paciente, indicarán la eficacia del mismo. Así pues, una disminución de la desviación de los valores de amplificación respecto de un control, representado éste último, por ejemplo, por valores de amplificación en un mismo individuo, previos al tratamiento, supondría que el tratamiento está surtiendo efecto en el sentido de disminuir el nivel de microorganismos causantes de las enfermedades histoplasmosis y paracoccidioidomicosis. Este ejemplo no se limitaría únicamente al uso de este tipo de control.

Otro aspecto de la presente invención es un kit que comprende pares de cebadores capaces de amplificar, de forma simultánea y en una sola reacción, mediante la técnica de la PCR, un fragmento de la región ITS del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* y/o *Paracoccidioides brasiliensis*.

El kit puede incluir reactivos para la amplificación de un fragmento de la región ITS del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Los reactivos incluidos en este kit pueden ser otros cebadores específicos de la región nucleotídica ITS, sondas específicas marcadas con dos fluoróforos diferentes así como con un *quencher*, tal como se ha descrito en esta memoria.

El kit también puede incluir controles positivos y negativos. Por controles positivos y negativos se entienden componentes del kit que permitan comprobar la eficacia de los reactivos suministrados en el mismo. La naturaleza de los controles depende de la propia naturaleza de los reactivos, así pues, un control positivo puede ser, por ejemplo, una construcción genética que incluya las secuencias de los fragmentos de los ITS objeto de estudio en la presente invención, que pueden ser amplificadas por los pares de cebadores descritos anteriormente y, el control negativo puede ser una construcción que carece de los fragmentos de ITS presentes en el control positivo. Otros controles positivos y negativos pueden ser incluidos este kit para evaluar el funcionamiento del mismo.

En una realización preferida, el kit comprende los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para amplificar un fragmento de la región ITS2 del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* y los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 para amplificar un fragmento de la región ITS1 del ADN ribosómico de *Paracoccidioides brasiliensis*, mediante PCR.

ES 2 335 179 A1

En otra realización preferida del kit, la amplificación se realiza por medio de PCR multiplex en tiempo real y se emplean sondas marcadas con dos fluoróforos diferentes.

En una realización más preferida del kit, las secuencias de las sondas son SEQ ID NO: 3 para el fragmento amplificado de *Histoplasma capsulatum* y SEQ ID NO: 6 para el fragmento amplificado de *Paracoccidioides brasiliensis*. Las sondas se marcan en el extremo 5' con un fluoróforo diferente en cada caso y en el extremo 3' con el quencher BHQ1.

En diversas realizaciones preferidas, el kit se emplea para:

- el diagnóstico de histoplasmosis y/o paracoccidioidomicosis en una muestra biológica, ambiental o en un cultivo microbiológico.
- la monitorización de la respuesta a un tratamiento de histoplasmosis y/o paracoccidioidomicosis.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig 1. Muestra la región del ITS2 del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum*.

En la figura se observa la posición interna del ITS2 de *Histoplasma capsulatum*. Los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 amplifican un fragmento situado en el ITS2, entre las secuencias que codifican para el ARN ribosómico 5.8S y 28S.

Fig 2. Muestra la región del ITS1 del ADN ribosómico de *Paracoccidioides brasiliensis*.

En la figura se observa la posición interna del ITS1 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 amplifican un fragmento situado en el ITS2, entre las secuencias que codifican para el ARN ribosómico 18S y 5.8S.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño de la técnica de PCR en tiempo real

Se diseñaron iniciadores y sondas del tipo *Molecular Beacon* específicos para *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* dirigidos al ADN ribosómico, en concreto a la región ITS2 (*Internal Transcriber Spacer 2*) en el caso de *H. capsulatum* y a la región ITS1 en el caso de *P. brasiliensis*.

Para el diseño de los iniciadores y de las sondas se analizaron las secuencias de las regiones ITS (*Internal Transcriber Spacers*) del ADN ribosómico de 20 cepas de *H. capsulatum* y de una cepa de *P. brasiliensis* disponible en el Servicio de Micología así como 14 cepas clínicas de *P. brasiliensis* procedentes del Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. El diseño de los iniciadores y de las sondas se realizó con la ayuda del programa de diseño de sondas *Beacon Design 5.0* (*Premier Biosoft*, Palo Alto, CA, EE.UU.). En el caso de *H. capsulatum*, el iniciador directo fue SEQ ID NO: 1 y el reverso fue SEQ ID NO: 2. La sonda *Molecular Beacon*, definida por la secuencia SEQ ID NO: 3, se marcó en el extremo 5' con el fluoróforo FAM y en el extremo 3' con el quencher o apagador BHQ1. En el caso de *P. brasiliensis*, el iniciador directo fue SEQ ID NO: 4 y el reverso fue SEQ ID NO: 5. La sonda, definida por la secuencia SEQ ID NO: 6, se marcó en el extremo 5' con el fluoróforo HEX y en el extremo 3' con el quencher BHQ1.

En la Tabla 1 aparecen los espectros de excitación y emisión de los dos fluorocromos empleados para el marcaje de las sondas.

TABLA 1

Fluorocromo	λ (nm)	
	Excitación	Emisión
FAM	483	533
HEX	523	568

Una vez diseñados los iniciadores y las sondas, se realizó una búsqueda de tipo BLAST en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) para estar seguros de que no presentaban homología con otros microorganismos. Adicionalmente, se comprobó la especificidad de las sondas y de los iniciadores diseñados mediante análisis filogenéticos de sus secuencias. Para estos análisis se utilizó la base de datos de secuencias del Servicio de Micología, que dispone de 3600 cepas pertenecientes a 300 especies fúngicas y el programa informático *Fingerprinting II informatix*, versión 3.0 (BIORAD, Madrid, España).

En una primera etapa de puesta a punto de la técnica se optimizó por separado la detección de ADN de *H. capsulatum* y *P. brasiliensis*. Se determinó la sensibilidad y reproducibilidad de cada ensayo de PCR por separado y también se realizó un estudio para conocer la especificidad de las secuencias elegidas para los iniciadores y las sondas. En este estudio de especificidad se utilizaron doce cepas pertenecientes a especies fúngicas que causan infecciones parecidas a la histoplasmosis y paracoccidioidomicosis y especies fúngicas que originan infecciones con frecuencia. Estas especies eran *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* (se incluyó en el caso de la PCR en tiempo real de detección de *H. capsulatum*), *Histoplasma capsulatum* (se incluyó en el caso de la PCR en tiempo real de la detección de *P. brasiliensis*) *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, *Scedosporium prolificans*, *Scedosporium apiospermum* y *Candida albicans*. Además se incluyeron en los experimentos ADN genómico humano y de ratón (Promega, Madrid, Spain).

En una segunda etapa se optimizó la PCR multiplex en tiempo real de modo que no se produjera una disminución de sensibilidad respecto a las PCRs en tiempo real estandarizadas individualmente. Puesto que los fluorocromos estaban separados sólo 30 nm se realizó una compensación de color para evitar solapamiento en la detección de fluorescencia. Para realizar la compensación de color se hizo una lectura de fluorescencia en ambos canales empleando las sondas en una concentración 0,4 μM . Una vez estandarizadas las condiciones se aplicó dicha compensación de color a cada uno de los experimentos.

En la Fig 1 y Fig 2 se representan esquemáticamente las zonas de amplificación elegidas en cada caso.

Ejemplo 2

Validación *in vitro* del método de detección

Se emplearon las 20 cepas de *H. capsulatum*, las 15 cepas de *P. brasiliensis* y las 11 de otras especies descritas en el apartado anterior. La extracción de ácidos nucleicos se realizó siguiendo procedimientos habituales. En el caso de los patógenos primarios, la extracción se realizó en un laboratorio de bioseguridad para patógenos del grupo 3, cumpliendo las normas establecidas (Real Decreto 664/1997).

Las reacciones de PCR en tiempo real contenían un volumen final de 20 μL , con 4,5 mM de Cl_2Mg , 0,5 μM de cada iniciador y 0,2 μM de la sonda SEQ ID NO: 3 y 0,6 μM de sonda SEQ ID NO: 6, además, se añadieron 2 μL de ADN a la mezcla de PCR. Respecto a las condiciones de la reacción de PCR, se realizó una preincubación a 95°C seguida de 50 ciclos de desnaturalización (25 s a 95°C), anillamiento (30 s a 53°C), y extensión (5 s a 72°C). Por último, el protocolo incluyó un ciclo para conocer la temperatura de fusión de la doble cadena de ADN del producto amplificado (curva de *melting*). Este ciclo se realizó en el intervalo de temperaturas de 30 a 80°C. Este ciclo se realiza siempre en las PCR en tiempo real (o cuantitativas), pues ayuda a identificar el producto amplificado, ya que la temperatura de fusión es específica para cada secuencia.

Las reacciones de PCR se realizaron en el equipo LC480 (*Roche Applied Science*, Madrid, España) y en cada experimento se incluyeron controles negativos.

El estudio de reproducibilidad de la técnica, así como la cuantificación del ADN amplificado se realizaron mediante la construcción de rectas de regresión con los resultados de cinco repeticiones de diferentes diluciones de ADN (desde 10 ng a 1 fg DNA/ μL) de *H. capsulatum* CNM-CM-2721 (Colección de hongos filamentosos del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología), así como cinco repeticiones de diferentes diluciones de ADN de *P. brasiliensis* 20960 (Colección de hongos filamentosos del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología) (desde 10 ng a 1 fg DNA/ μL). Las rectas de regresión se realizaron entre los logaritmos de las concentraciones de ADN y el ciclo de la reacción de PCR en el que se empezaba a detectar la fluorescencia (*crossing point*, *Ct*). La fluorescencia se midió en los canales correspondientes en cada caso. La reproducibilidad se obtuvo mediante el cálculo de los coeficientes de variación de los *Ct* para cada una de las concentraciones de ADN utilizadas. Las rectas de regresión construidas entre las concentraciones conocidas de ADN y los *Ct* tenían un coeficiente de determinación (r^2) de 0,99 ($P < 0.01$). La reproducibilidad del ensayo fue muy elevada siendo la media de los coeficientes de variación en torno al 3% para *H. capsulatum* y en el caso de *P. brasiliensis*, se situó en torno al 4%.

La sensibilidad fue también elevada, situándose el límite de detección entre 10 fg y 1 fg por μL de muestra analizada, aunque en el caso de la detección de *P. brasiliensis* en las concentraciones más bajas (1 fg por μL) se pierde la reproducibilidad siendo el límite reproducible de 10 fg por μL .

La especificidad fue del 100%, ya que no se detectó en ninguna de las reacciones realizadas, ADN de las otras 11 especies incluidas en los estudios, ni ADN murino o humano.

Ejemplo 3

Validación del método para la identificación y confirmación de colonias en cultivo

5 Se emplearon las 46 cepas enumeradas en las secciones precedentes. Se utilizaron las mismas técnicas de extracción y de amplificación. La sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 100%. Todos estos experimentos se realizaron en las instalaciones con medidas de bioseguridad de nivel 3.

Ejemplo 4

10

Validación de la técnica en muestras biológicas

Una vez que se estandarizó *in vitro* la técnica de PCR multiplex y que se comprobó su utilidad como método de identificación de colonias en cultivo, se procedió a realizar una adaptación de la misma, para utilizarla en muestras biológicas.

La extracción de ADN de las muestras biológicas se realizó mediante procedimientos habituales y también empleando el kit QiampDNA Mini Kit (Qiagen, Izasa, Madrid, España). Se emplearon 2 μ l del ADN extraído de cada muestra para cada reacción de PCR en tiempo real. La única excepción fueron las muestras de suero en los que se verificó que el empleo de 4 μ l mejoraba la sensibilidad del ensayo.

En el caso de muestras parafinadas se realizó un paso previo para desparafinar consistente en lavar con 1,2 ml de Xileno seguido de dos lavados con 1,2 ml de etanol (96-100%). Para validar la técnica de PCR en tiempo real en muestras biológicas, se emplearon 44 muestras procedentes de 20 pacientes, 18 de ellos con histoplasmosis probada y dos pacientes con paracoccidiodomicosis probada. La infección se había confirmado mediante técnicas de diagnóstico convencionales como el cultivo, el examen histológico o la serología positiva, más cuadro clínico y antecedentes epidemiológicos compatibles. Debe destacarse que la técnica de PCR se aplicó a las muestras biológicas disponibles, que fueron enviadas desde 20 centros sanitarios diferentes, según sintomatología, disponibilidad y posibilidades de cada caso.

La técnica de PCR fue positiva en 14 de los 18 enfermos con histoplasmosis y en los dos enfermos con paracoccidiodomicosis lo que representa en total el 80% de todos los pacientes. Por muestras, se analizaron 21 sueros (de algunos enfermos se recibieron muestras seriadas de suero), 11 muestras relacionadas con el aparato respiratorio, 3 aspirados de médula ósea, 3 muestras de plasma, 2 muestras de sangre, dos biopsias y una muestra de orina. La técnica de PCR mostró un 91% de sensibilidad en muestras relacionadas con el aparato respiratorio, ya que detectó ADN de esta especie en 10 de las 11 muestras analizadas (lavados broncoalveolares, secreciones bronquiales, esputo y exudado orofaríngeo). En otros tipos de muestras biológicas, la técnica fue positiva en dos de las tres muestras de médula ósea (66%) y en dos de las tres muestras de plasma (66%) y en el 100% de las biopsias. Fue negativa para la muestra de orina y para las tres muestras de sangre, probablemente debido a la inhibición de la PCR por los componentes de dichas muestras. Respecto a los sueros, fue positiva en 9 de los 21 sueros (42,8%). Nunca se obtuvieron resultados positivos en los sueros de pacientes con paracoccidiodomicosis pero es un resultado esperable ya que la cantidad de ADN en dichas muestras es muy pequeña. En total, la técnica fue positiva en 25 de las muestras analizadas (57%).

En la tabla se resumen los resultados de las muestras analizadas, junto con las determinaciones serológicas y los resultados del cultivo, en las muestras que se recibieron.

45

TABLA 2

Resultados de la técnicas de PCR en tiempo real en 20 enfermos con histoplasmosis y dos enfermos con paracoccidiodomicosis

50

Paciente	Muestras	Resultado de PCR	Resultado del cultivo	Resultado de la inmunodifusión
1	Suero	Negativo	NR	Positivo
2	Suero	Negativo	NR	Positivo
3	Suero	Positivo	NR	Negativo
	Sangre	Negativo	Positivo	NR
4	Suero	Positivo	NR	Positivo
5	Suero 1	Negativo	NR	Negativo
	Suero 2	Negativo	NR	Negativo

65

ES 2 335 179 A1

	6	Suero 1	Positivo	NR	Negativo
5		Suero 2	Negativo	NR	Negativo
		Suero 3	Negativo	NR	Negativo
		Suero 4	Negativo	NR	Negativo
10	7	Suero 1	Positivo	NR	Positivo
		Suero 2	Positivo	NR	Positivo
15	8	Suero 1	Negativo	NR	Negativo
		Suero 2	Positivo	NR	Negativo
20	9	Secreción bronquial	Positivo	Positivo	NR
		Lavado bronco alveolar	Positivo	Positivo	NR
25		Médula ósea	Negativo	Positivo	NR
30	10	Médula ósea	Positivo	Positivo	NR
35	11	Espuito	Negativo	Positivo	NR
		Lavado bronco alveolar	Positivo	Positivo	NR
40		Orina	Negativo	Negativo	NR
45	12	Suero	Positivo	NR	Positivo
		Secreción bronquial	Positivo	Positivo	NR
50		Lavado bronco alveolar	Positivo	Positivo	NR
55		Médula ósea	Positivo	Positivo	NR
	13	Plasma	Negativo	NR	NR
60	14	Suero 1	Negativo	NR	Negativo
		Plasma 1	Positivo	NR	NR
		Suero 2	Positivo	NR	Negativo
65		Plasma 2	Negativo	NR	NR

ES 2 335 179 A1

15	Ex.	Positivo	Positivo	NR
	orofaríngeo			
5	16			
	Lavado			
	bronco	Positivo	Positivo	NR
	alveolar			
10	17			
	Suero	Positivo	NR	Positivo
	Ganglio	Positivo	NR	NR
15	18			
	Suero	Negativo	NR	Negativo
	Sangre	Negativo	NR	NR
	Biopsia	Positivo	NR	NR
20				
	Espuito	Positivo	NR	NR
	21*			
	Suero	Negativo	NR	Positivo
	Espuito	Positivo	NR	NR
25				
	Biopsia	Positivo	NR	NR
	22*			
	Suero	Negativo	NR	Positivo
30				
	Espuito	Positivo	NR	NR

NR: No realizado

35 La media de las concentraciones de DNA en muestras biológicas fue de 51,36 fg/ μ l en las muestras séricas y de 25,2 x 10³ fg/ μ l en el resto de muestras analizadas, lo que puede explicar la mejor sensibilidad de la técnica en muestras no serológicas.

40 Asimismo se realizó un estudio de especificidad. Se analizaron 40 muestras de sueros de pacientes neutropénicos (con disminución de la concentración de neutrófilos en sangre), 10 de ellos con PCR positiva para *Aspergillus fumigatus* y otros 30 con PCR negativa. Para todos ellos la técnica de PCR en tiempo real múltiple específica para *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* fue negativa. Se analizaron también cinco sueros de pacientes sanos procedentes de zonas endémicas obteniéndose también resultados negativos.

45 Estos resultados indican que la técnica de PCR demostró una sensibilidad notable en todas las muestras analizadas, particularmente en las muestras relacionadas con el aparato respiratorio. Nunca se detectó reacción cruzada entre ambos patógenos, siendo la técnica negativa a histoplasma en los casos de paracoccidiodomicosis y a la inversa. Además, el resultado de la PCR se obtuvo 24-48 horas después de recibir la muestra en el Servicio de Micología, lo que muestra que es una técnica de diagnóstico rápido.

50 Paralelamente, se determinó la presencia de anticuerpos para *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* en las muestras de suero y se realizó el cultivo de las muestras de sangre, muestras relacionadas con el aparato respiratorio, de médula ósea y de orina. Como puede verse en la tabla anterior, se cultivaron muestras, resultando positivas un total de 12 (52%). El cultivo fue positivo entre 10 y 14 días después de la siembra. También se determinaron los anticuerpos anti *Histoplasma* y *Paracoccidioides* mediante una técnica de inmunodifusión (ID *Fungal Antibody System*, *Immuno-Mycologics*, Leti Laboratorios, Madrid, España), siendo la técnica positiva en nueve sueros de los 21 recibidos (42%). La inmunodifusión fue invariablemente negativa en la mayoría de las muestras procedentes de enfermos VIH+ o con otras inmunodepresiones.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la detección simultánea de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* que comprende:
- a. obtener una muestra y aislar su ADN,
 - 10 b. amplificar un fragmento de la región ITS del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* y/o *Paracoccidioides brasiliensis* contenido en el ADN aislado en el paso (a),
 - c. determinar la desviación del paso (b) con respecto a los controles y
 - d. analizar la desviación del paso (c) y atribuir la misma a la presencia de los citados microorganismos.
- 15 2. Método según la reivindicación 1 donde la concentración del ADN aislado para llevar a cabo la amplificación es de al menos 10 fg/ μ l.
3. Método según la reivindicación 1 donde la muestra es:
- 20 a. una muestra biológica,
 - b. un cultivo microbiológico o
 - c. una muestra ambiental.
- 25 4. Método según la reivindicación 3 donde la muestra biológica está relacionada con el aparato respiratorio.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la amplificación de la región ITS2 del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* se realiza por medio de los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y la amplificación de la región ITS1 del ADN ribosómico de *Paracoccidioides brasiliensis* se realiza por medio de los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la amplificación se realiza por medio de PCR multiplex en tiempo real **caracterizada** porque se emplean sondas específicas marcadas con dos fluoróforos diferentes.
- 35 7. Método según la reivindicación 6 donde las sondas son:
- a. SEQ ID NO: 3 para el fragmento amplificado de *Histoplasma capsulatum* y se marca en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un *quencher* y
 - 40 b. SEQ ID NO: 6 para el fragmento amplificado de *Paracoccidioides brasiliensis* y se marca en el extremo 5' con un fluoróforo distinto del usado en el apartado (a) y en el extremo 3' con un *quencher*.
8. Método según la reivindicación 7 donde el fluoróforo del apartado (a) es FAM, el fluoróforo del apartado (b) es HEX y el *quencher* es BHQ1.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de histoplasmosis y/o paracoccidioidomicosis.
- 50 10. Kit para la detección simultánea de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* que comprende pares de cebadores que pueden amplificar, mediante la técnica de la PCR, un fragmento de la región ITS del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* y/o *Paracoccidioides brasiliensis*.
11. Kit según la reivindicación 10 que comprende los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para amplificar un fragmento de la región ITS2 del ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum* y los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 para amplificar un fragmento de la región ITS1 del ADN ribosómico de *Paracoccidioides brasiliensis*.
- 55 12. Kit según la cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 donde la amplificación se realiza por medio de PCR multiplex en tiempo real y se emplean sondas específicas marcadas con dos fluoróforos diferentes.
- 60 13. Kit según la reivindicación 12 donde las sondas son:
- a. SEQ ID NO: 3 para el fragmento amplificado de *Histoplasma capsulatum* y se marca en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un *quencher* y
 - 65 b. SEQ ID NO: 6 para el fragmento amplificado de *Paracoccidioides brasiliensis* y se marca en el extremo 5' con un fluoróforo distinto del usado en el apartado (a) y en el extremo 3' con un *quencher*.

ES 2 335 179 A1

14. Kit según la reivindicación 13 donde el fluoróforo del apartado (a) es FAM, el fluoróforo del apartado (b) es HEX y el quencher es BHQ1.

5 15. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, para el diagnóstico de histoplasmosis y/o paracoccidiodomicosis en una muestra biológica, ambiental o en un cultivo microbiológico.

16. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de histoplasmosis y/o paracoccidiodomicosis.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

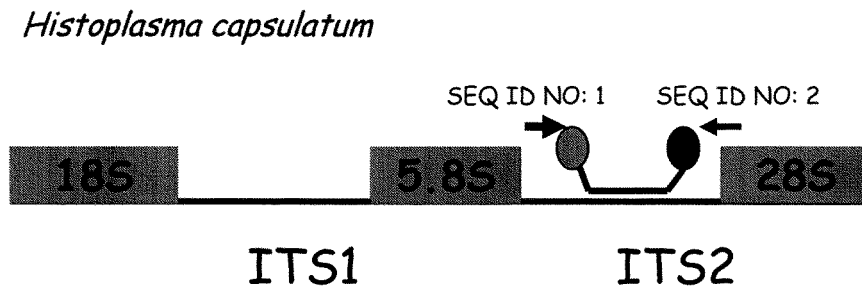


FIG. 1

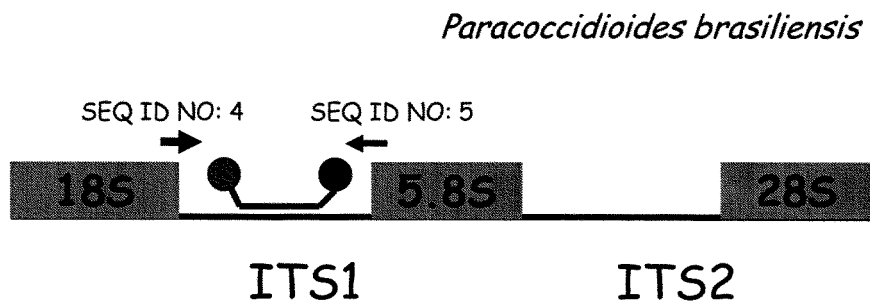


FIG. 2

ES 2 335 179 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Instituto de Salud Carlos III
- 5 <120> Método para la detección simultánea de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*
- <130> 1613.4
- 10 <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> *Histoplasma capsulatum*
- 20 <400> 1
- 25 **gcctgtccga gcgtcattgc**
20
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> *Histoplasma capsulatum*
- 30 <400> 2
- 35 **gaactcgaca ccgccactgc**
20
- 40 <210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 45 <220> stem-loop
<223> Los siete primeros nucleótidos son complementarios a los siete últimos
- 50 <400> 3
- 55 **cgcgatccgc cggtcgaggg gggacgagat cgcg**
34
- <210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> *Paracoccidioides brasiliensis*
- 60 <400> 4
- 65 **acccttgtct attctacc**
18

ES 2 335 179 A1

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

5 <213> *Paracoccidioides brasiliensis*

<400> 5

10 **ttactgatta tgataggct c**
 21

<210> 6

15 <211> 31

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20 <220> stem-loop

<223> Los seis primeros nucleótidos son complementarios a los seis últimos

<400> 6

25 **cgcgatcgcc ggggacaccg ttgaaatcgc g**
 31

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 335 179

② Nº de solicitud: 200802665

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.09.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 03027329 A1 (THE GOVERNMENT OF USA) 03.04.2003, reivindicaciones 1-40; páginas 3-4; ejemplo 3.	1-4,10
Y		5
Y	BINGDONG JIANG, et al. Typing of Histoplasma capsulatum Isolated Based on Nucleotide Sequence Variation in the Internal Spacer Regions of rRNA Genes. Journal of Clinical Microbiology. Enero 2000, vol 38, no 1, paginas 241-245, ver todo el documento, especialmente paginas 241-242.	1-16
Y	MOTOYAMA A.B., et al. Molecular identification of Paracoccidioides brasiliensis by PCR Amplification of Ribosomal DNA. Journal of Clinical Microbiology. Agosto 2000, vol 38, no 8, páginas 3106-3109, ver todo el documento, especialmente pagina 3107.	1-16
Y	MARTAGON-VILLAMIL et al. Identification of Histoplasma capsulatum from Culture Extracts by Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology, marzo 2003, vol. 41, no. 3, pág. 1295-1298. Todo el documento.	1-7
Y	US 6872523 A (PETER C. IWEN) 29.03.2005, página 23, columnas 3-4.	1-7
Y	WO 2008063370 A1 (THE UNIVERSITY OF MANCHESTER) 28.05.2008, páginas 15-33.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.01.2010

Examinador

A. Santos Díaz

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.01.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5-16	SÍ
	Reivindicaciones	1-4	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO03027329	03-04-2003
D02	Bingdong Jiang, et al. Typing of Histoplasma capsulatum Isolated Based on Nucleotide Sequence Variation in the Internal Spacer Regions of rRNA Genes. Journal of Clinical Microbiology. Enero 2000, vol 38, no 1, paginas 241-245 ver todo el documento especialmente paginas 241- 242	01-2000
D03	Motoyama A.B., et al Molecular identification of Paracoccidioides brasiliensis by PCR Amplification of Ribosomal DNA. Journal of Clinical Microbiology. Agosto 2000, vol 38, no 8, páginas 3106-3109 ver todo el documento especialmente pagina 3107	08-2000
D04	WO 2008063370 A1	28-05-2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD

1.1 La invención definida en las reivindicaciones 1-4 se considera que no es nueva puesto que esta anticipada en el documento D1.

La invención de la reivindicación 1 refiere a un método de detección simultánea de presencia o ausencia de un hongo seleccionado entre *Histoplasma capsulatum* y/o *Paracoccidioides brasiliensis* mediante la utilización de cebadores y sondas diseñados a partir de la región ITS de ADN ribosómico de ambos hongos.

Sin embargo este concepto no es nuevo a la vista del documento D1, que describe un método para detectar un hongo dimórfico que comprende: detectar la presencia o ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos de la región espaciadora ITS2 de un hongo dimórfico en una muestra, amplificando un fragmento de la región ITS2 e hibridando con una sonda. La presencia de la secuencia de ITS2 indica la presencia en la muestra de uno de los hongos. Entre estos hongos se encuentran *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. (rev.1- 6, pag. 3 líneas 1-9).

1.2 Las reivindicaciones 5-16 cumplen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP)

ACTIVIDAD INVENTIVA

2.1 En vista del argumento desarrollado en el punto anterior las reivindicaciones 1- 4 no presentan actividad inventiva.

2.2 El problema a resolver por la presente invención puede considerarse como la obtención de nuevas secuencias de la región ITS para el diseño de los cebadores y las sondas para la detección de ambos hongos. La solución propuesta en la solicitud son las secuencias 1-3 para *Histoplasma capsulatum* y 4-6 *Paracoccidioides brasiliensis*.

D2 y D3 se consideran los documentos mas relevantes para las reivindicaciones 5, 10-11 .

La SEQ-ID NO:1 de la invención forma parte de gen 5.8s situado antes de ITS2 y según D2 esta zona es idéntica en los 24 aislados de *Histoplasma capsulatum* por lo que su selección como diana para cebadores de la amplificación y sondas de detección de la región ITS 2 sería obvia para un experto en la materia. También las SEQ-ID NO 2 y 3 están incluidas en la región descrita en D2. (FIG 2).

De la misma manera las secuencias SEQ-ID NO:4-6 de la invención forman parte de la secuencia descrita en la FIG 2A de D3 de la que se han elegido los cebadores para la amplificación de ITS1 de *Paracoccidioides brasiliensis* descritos en el documento D3 por lo que la selección tanto de los cebadores como de la sonda en esta diana sería obvia para un experto en la materia.

Hoja adicional

La selección de estas secuencias podría ser considerada inventiva si presentara algún efecto sorprendente o inesperado, sin embargo las secuencias de los cebadores y sondas de la invención se encuentran situadas en zonas que ya ha sido descritas en D2 y D3 como dianas para la amplificación y detección de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidiosis brasiliensis*.

Por lo tanto las reivindicaciones 5, 10-11 no presentan actividad inventiva según establece el artículo 8.1 LP

2.3 El documento D4 describe un método para la detección de la presencia o ausencia de hongos en una muestra bien individualmente o simultáneamente en una reacción multiplex (párrafo 9) para identificar hongos entre los que se encuentran *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidiosis brasiliensis* (pag. 20 línea 13 y pag. 21 líneas 4-5). Las sondas pueden ser molecular beacon y entre los fluoróforos elegidos esta PAM y HEX y quencher adecuados.

Teniendo en consideración el documento D5 las reivindicaciones 6-9, 12-16 no parecen contener características adicionales que en combinación con cualquiera de las reivindicaciones de las que dependen impliquen una actividad inventiva. En consecuencia al no ser el método de la reivindicación 5, ni el kit de las reivindicaciones 10-11 inventivos las reivindicaciones 6-8 y 12-16 no pueden considerarse que presenten actividad inventiva según establece el artículo 8.1 LP