

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 043**

21 Número de solicitud: 202030357

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.05.2020

71 Solicitantes:

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE (31.0%)
Avenida Fernando Abril Martorell, 106 - Torre A,
Planta 7ª
46026 Valencia ES;
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (9.0%);
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (30.0%) y
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED, M.P. (30.0%)

72 Inventor/es:

SANTIAGO FELIPE, Sara;
PLA BLASCO, Luis;
TORMO MAS, María Ángeles;
AZNAR GIMENO, Elena;
RUIZ GAITÁN, Alba Cecilia;
VALENTÍN GÓMEZ, Eulogio;
PEMÁN GARCÍA, Javier y
MARTÍNEZ MAÑEZ, Ramón

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Método para la detección rápida de Candida auris y el diagnóstico de la infección causada por este patógeno**

57 Resumen:

Método para la detección rápida de Candida auris y el diagnóstico de la infección causada por este patógeno.

La presente invención se relaciona con un biosensor que comprende un soporte poroso con un indicador en el interior de los poros, y un oligonucleótido que reconoce de forma específica Candida auris, en donde el oligonucleótido está anclado a la superficie del soporte poroso en una posición tal que controla, en ausencia/presencia de ADN de C.auris, la salida del indicador al exterior. Asimismo, la invención también se relaciona con el uso de dicho biosensor para la detección y/o la cuantificación de C. auris, y para el diagnóstico de enfermedades causadas por C. auris.

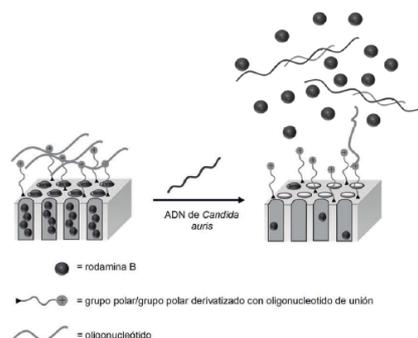


Fig. 1

ES 2 763 043 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección rápida de *Candida auris* y el diagnóstico de la infección causada por este patógeno

5

La presente invención se encuentra dentro del campo de la detección rápida de hongos patógenos, en concreto de *Candida auris*, y del diagnóstico de infecciones causadas por *C. auris* mediante el empleo de materiales capaces de reconocer específicamente el ADN de la especie patógena.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

C. auris es una especie emergente muy resistente a los fármacos antifúngicos disponibles en la actualidad que puede causar fungemia e infecciones profundas asociadas a una elevada mortalidad, sobre todo en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos médicos (UCI) o quirúrgicos (Reanimación). El primer aislamiento descrito de *C. auris* fue en una paciente en Japón con otitis externa en 2009. Desde entonces se han descrito infecciones diseminadas y candidemias causadas por esta especie en varios países, como India, Corea del Sur, Sudáfrica, Reino Unido, Estados Unidos, Colombia, Venezuela, Kuwait y, recientemente, España, originando un problema sanitario a escala mundial (Ruiz-Gaitán. Rev Iberoam Micol. 2017, 34, 23-27). Ninguno de los brotes de candidiasis invasora por *C. auris* descritos ha sido de la envergadura del detectado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe desde abril de 2016: 52 candidemias y 178 pacientes colonizados o con infecciones leves en los últimos trece meses. La magnitud de este brote ha generado una oportunidad única para profundizar en el conocimiento, ha favorecido el desarrollo de un nuevo sistema de detección de esta especie fúngica nueva y multirresistente, muy diferente a las especies de *Candida* conocidas.

25

30

La identificación de *C. auris* en muestras biológicas supone un importante reto diagnóstico por la dificultad existente para su correcta identificación con las técnicas bioquímicas habitualmente utilizadas en los laboratorios de microbiología. Muchas de estas técnicas, la identifican erróneamente como *Candida haemulonii*, *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Rhodotorula glutinis*. Para identificar correctamente un aislamiento de *C. auris* se precisan métodos moleculares fuera del alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos como la amplificación y secuenciación de ITS (de la

35

sigla en inglés *Internal Transcribed Spacer*), regiones D1/D2 de DNA ribosomal, AFLP (de la sigla en inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*), y de los genes *RPB1* y *RPB2* o, recientemente, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS (de la sigla en inglés *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*). Debido a estas importantes dificultades metodológicas para la correcta
 5 identificación de *C. auris*, que además requieren de mucho tiempo, personal y equipamiento especializado, es muy probable que las infecciones causadas por esta especie hayan sido infradiagnosticadas o mal identificadas en los últimos años; por lo tanto, es necesario el desarrollo de métodos diagnósticos rápidos y fiables.

10

Métodos desarrollados para mejorar la identificación de *C. auris* se describen, por ejemplo, en los documentos WO2019208691, US2019338241 y WO2018213641. El documento WO2019208691 divulga un grupo de cebadores para la detección y diagnóstico de *C. auris* en el entorno clínico basada en la amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa. El documento US2019338241
 15 divulga un método para la detección de *C. auris* basada en un medio de cultivo que suporta o inhibe el crecimiento de *C. auris* en relación con otras especies de hongos. Finalmente, el documento WO2018213641 divulga métodos también basados en la amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa para
 20 detectar varias especies de *Candida*, incluyendo *C. auris*. Pese a las ventajas aportadas por este tipo de métodos, aún presentan inconvenientes como la necesidad de personal y equipamiento especializado para realizar la extracción y amplificación de los ácidos nucleicos, o el amplio tiempo necesario para el cultivo de los hongos en el caso del método basado en un medio de cultivo selectivo, el cual, a pesar de la selectividad,
 25 podrá resultar en falsos negativos o en resultados difíciles de interpretar.

25

Así, a la vista del estado de la técnica, es necesario el desarrollo de métodos alternativos a los ya descritos para la detección y/o diagnóstico de *C. auris* que no presenten las desventajas e inconvenientes de los dispositivos/métodos anteriores, especialmente la
 30 necesidad de personal y equipamiento especializado, el largo tiempo necesario para cultivos y la falta de robustez en el resultado obtenido.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35 La presente invención describe un biosensor para la detección de ADN de *Candida auris*

y/o diagnóstico de la infección causada por *C. auris* que solventa los problemas de los métodos del estado de la técnica, es decir, permite la detección de *C. auris* de manera rápida, sencilla y con un alto nivel de sensibilidad y selectividad. El biosensor desarrollado por los autores de la presente invención está basado en un material poroso que comprende un indicador y oligonucleótidos de ADN monocatenario que reconocen de forma específica una región específica del ADN de *C. auris*, de forma que cuando el ADN de *C. auris* está presente en el medio, los oligonucleótidos reconocen dicha región, se unen a ella, y se produce la liberación del indicador el cual se puede detectar (ver Figura 1). Así, la detección del indicador es indicativo de presencia de *C. auris* en la muestra analizada.

En base a este biosensor, los inventores también han desarrollado un método de detección de ADN de *C. auris* y un método de diagnóstico de enfermedades causadas por dicho hongo patógeno.

15

Biosensor de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un biosensor, de aquí en adelante “el biosensor de la invención”, que comprende

- 20
- un soporte poroso que comprende un indicador en el interior de los poros, y
 - uno o más tipos de oligonucleótidos que reconocen de forma específica el ADN de *Candida auris*,

en donde

- 25
- una pluralidad de poros comprenden el acceso al exterior del soporte poroso, y
 - los oligonucleótidos están anclados a la superficie del soporte poroso en una posición tal que
 - (i) en ausencia de ADN de *C. auris*, los oligonucleótidos bloquean el acceso de los poros al exterior impidiendo la salida del indicador, y
 - (ii) en presencia de ADN de *C. auris*, los oligonucleótidos reconocen y se unen al ADN de dicho hongo, desbloqueando el acceso de los poros al exterior y permitiendo la salida del indicador.
- 30

El biosensor de la invención presenta ventajas que son ideales para los métodos y usos descritos en la invención. Una de las principales ventajas es que los oligonucleótidos reconocen específicamente el ADN de *C. auris*, lo que junto con la gran capacidad de

35

amplificación de la señal debido a la presencia de rodamina B en los poros, permite un nivel de detección de hasta una concentración entre 0,3 y 0,5 pg/ μ L de ADN. Esta combinación de características permite al biosensor de la invención tener una gran sensibilidad y fiabilidad para detectar ADN de *C. auris*. Además, el biosensor de la invención, los métodos y usos de la invención no requieren personal ni equipamiento especializados, permitiendo, en el caso más simple, la detección por observación visual directa del medio. Además, los métodos de detección y de diagnóstico de la invención pueden ser realizados en 1 hora, reduciendo el tiempo necesario para determinar la presencia de ADN de *C. auris* en una muestra, comparando con las técnicas usadas habitualmente.

En la presente invención el término “biosensor” se refiere a un dispositivo que se utiliza para detectar ADN de *C. auris* y/o diagnosticar una infección causada por *C. auris* basándose en la interacción molecular específica entre el ADN de *C. auris* y los oligonucleótidos que revisten el sensor. La interacción da lugar a un complejo intermedio que conduce a la transducción de la señal. Un biosensor puede ser un dispositivo analítico que convierte una respuesta biológica en una señal eléctrica, una señal óptica u otro esquema de transducción.

El biosensor de la invención comprende: un soporte poroso y uno o más tipos de oligonucleótidos anclados a la superficie del soporte poroso.

En la presente invención el término “soporte poroso” se refiere a aquel sustrato que comprende poros y que tiene una superficie a la cual se pueden unir moléculas de forma indirecta a través de un elemento de unión. El soporte poroso empleado en la presente invención puede comprender cualquier material de sustrato que comprenda poros a lo largo de su superficie con un acceso al exterior del soporte poroso, y que proporcione soporte físico para la captura de elementos o sondas que están unidos a dicha superficie. Los poros son clasificados por la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) por el tamaño del poro, midiendo dicho tamaño por el diámetro interno del mismo asumiendo que éste es cilíndrico, o por la distancia entre las paredes internas y opuestas de un poro con una configuración diferente. Así, siguiendo el criterio de la IUPAC, si el diámetro de un poro (o la distancia entre las paredes internas u opuestas de un poro) es de aproximadamente 2 nm o menor de 2 nm, entonces el poro es denominado microporo, si es mayor de 2 nm pero menor de 50 nm se denomina

mesoporo (o nanoporo), y si es de aproximadamente 50 nm o mayor de 50 nm, entonces es un macroporo. Teniendo en cuenta esta clasificación, se considera que un material es microporoso cuando el tamaño promedio de los poros de dicho material es de aproximadamente 2 nm o menor de 2 nm, que es mesoporoso (o nanoporoso) cuando el tamaño promedio de los poros de dicho material es mayor de 2 nm pero menor de 50 nm, y que es macroporoso cuando el tamaño promedio de los poros de dicho material es de aproximadamente 50 nm o mayor de 50 nm. En la presente invención, el tamaño promedio de los poros del soporte poroso es entre 2 y 100 nm. Así, en otra realización preferida del biosensor de la invención, el soporte poroso es microporoso, mesoporoso o macroporoso. Preferiblemente, el soporte poroso comprende poros con un tamaño medio de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 nm más preferiblemente con tamaños comprendidos entre 2 y 50 nm, aún más preferiblemente con un tamaño de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nm. En los ejemplos de la presente invención el tamaño de poro medio empleado es de 5 nm. Métodos para determinar el tamaño del poro son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Ejemplos de estos métodos incluyen, sin limitar a, experimentos de adsorción-desorción, porosimetría de mercurio, SAS (*small-angle scattering*), NMR (*nuclear magnetic resonance*) y STM-AFM (*scanning tunneling and atomic force microscopies*) entre otros.

Además del tamaño de poro, otro parámetro que caracteriza al soporte poroso es la porosidad del mismo. La porosidad se define como la medida de espacios vacíos en un material, y es una fracción del volumen de huecos sobre el volumen total del material que va desde el 0 al 1 o, si se expresa en porcentaje, desde 0 a 100%. La porosidad de un sistema puede ser medida por diversos métodos. El más simple es el método directo, en el cual el volumen total del sistema es medido y posteriormente la muestra es compactada para remover todo el espacio poroso. Luego la diferencia de estos volúmenes nos da la porosidad total del sistema. Para medir la porosidad accesible el método más ampliamente utilizado es el llamado expansión de gas, pero existen otros como la microscopía óptica de polarización, o la microscopía electrónica de barrido. Respecto a los métodos indirectos de la medida de la porosidad, éstas técnicas consisten en la introducción de fluidos (líquidos como el agua o el mercurio, o gases como el nitrógeno o el helio) en los espacios vacíos del material, y determinar el volumen de fluido introducido, lo que indica el volumen de vacíos existente. En la presente invención, el soporte poroso puede comprender cualquier porosidad. No obstante, preferiblemente comprende una porosidad de entre 10^9 y 10^{12} cm⁻², más preferiblemente,

entre 10^{11} y 10^{12} cm^{-2} .

Otra característica del soporte poroso del biosensor de la invención es que comprende una pluralidad de poros con acceso al exterior del soporte poroso. En el estado de la
5 técnica este tipo de poros se denominan poros abiertos. Como se ha explicado al principio de la presente descripción, dicho acceso al exterior del soporte poroso es el que está bloqueado por el oligonucleótido en ausencia de ADN de *C. auris* y que impide la salida al exterior del indicador que está almacenado dentro de los poros.

10 El soporte poroso del biosensor de la invención puede ser de cualquier material que sea poroso según se ha definido en los párrafos anteriores. Ejemplos de materiales porosos que pueden usarse en el contexto de la presente invención como soporte poroso incluyen, sin limitar a, alúmina anódica nanoporosa, sílica nanoporosa, óxido de titanio y grafeno. No obstante, en una realización preferida del biosensor de la invención, el
15 soporte poroso es dióxido de silicio u óxido de aluminio.

El soporte poroso del biosensor de la invención comprende un indicador en el interior de los poros. En la presente invención el término "indicador" se refiere a cualquier compuesto susceptible de ser visualizado y/o cuantificado. Ejemplos de indicadores
20 incluyen, sin limitarse a, colorantes, fluoróforos, sustancias con actividad redox, con resonancia plasmónica o biológicamente activas como agentes citotóxicos, proteínas, pequeñas biomoléculas, enzimas o fragmentos de ácidos nucleicos. En una realización preferida del biosensor de la invención, el indicador es rodamina B.

25 Otro de los componentes del biosensor de la invención son los oligonucleótidos que reconocen de forma específica el ADN de *C. auris*. Así, en la presente invención el término "oligonucleótidos" se refiere a moléculas de ADN o ARN monocatenarias de secuencia corta, tanto naturales como artificiales, que puede plegarse en una variedad de estructuras y donde los nucleótidos pueden ser modificados, por ejemplo, mediante
30 metilación en 5'.

Una secuencia oligonucleotídica se puede unir específicamente a su diana con una afinidad en el rango de micro-picomolar. Los oligonucleótidos de la presente invención tienen dos funciones: por un lado, reconocer específicamente una región del ADN *C.*
35 *auris*, y por otro lado bloquear los poros del material poroso, impidiendo la salida del

indicador. Así, en una realización preferida del biosensor de la invención, las secuencias de nucleótidos empleadas son: SEQ ID NO: 2 (5'-TTTTGGGGGGTACGCAAGGCGAATCTACCCGGGGGGTTTT-3') o la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3 (5'-

5 TTTTGGGGGGTCGCCATTTTCTTTGTGGCGGGGGTTTT-3'). Dicha secuencia SEQ ID NO: 2 reconoce específicamente la región 892198 a 892217 del cromosoma 2 del ADN de *C. auris* que codifica para un gen putativo no caracterizado de *C. auris*. La secuencia SEQ ID NO: 3 reconoce específicamente la región 1056775 a

10 1056787 del cromosoma 3 del ADN de *C. auris* que codifica para un gen putativo no caracterizado de *C. auris*. Estas secuencias son específicas para *C. auris* y no existen en otros organismos patógenos garantizando la especificidad del biosensor para *C. auris*.

En el biosensor de la invención, la secuencia de oligonucleótidos está unida a la

15 superficie del soporte poroso en una localización tal que, en ausencia de ADN de *C. auris*, los poros del material poroso están bloqueados, impidiendo la salida del indicador. Dicha unión puede producirse directamente a la superficie del soporte o mediante un enlazador o *linker*, que facilita su unión mediante interacciones electrostáticas, supramoleculares o de forma covalente.

20

No obstante, en una realización preferida del biosensor de la invención, los oligonucleótidos están anclados a la superficie del soporte poroso a través de un grupo orgánico polar.

25 En otra realización preferida, los oligonucleótidos están unidos a la superficie del soporte poroso a través de un grupo orgánico polar derivatizado con un oligonucleótido de unión, en donde la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido de unión es parcialmente complementaria al oligonucleótido que reconoce el ADN de *C. auris*.

30 En la presente invención el término “grupo orgánico polar” se refiere a compuestos que contienen carbono y que tienen regiones distintas de carga positiva y negativa como resultado de la unión con átomos como el nitrógeno, el oxígeno o el azufre. En la presente invención los términos “grupo orgánico neutro” y “grupo orgánico catiónico” se refieren a compuestos en los cuales la suma de las cargas de las distintas regiones es

35 neutra o positiva, respectivamente.

Así, en una realización preferida del biosensor de la invención, la secuencia de ADN complementario se une a la superficie exterior del soporte mediante un grupo orgánico catiónico. En una realización más particular, el grupo orgánico catiónico se selecciona de entre aminas (NH_3^+), grupos guanidinio ($\text{H-N}=(\text{NHR})\text{NH}_2$), fosfonio (PH_4^+) o de amonio cuaternario (NR_4^+). R se selecciona de entre alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado y cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$.

En otra realización preferida del biosensor de la invención, el grupo orgánico neutro se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), alcohol ($-\text{OH}$), aldehído ($-\text{CHO}$), alqueno $\text{C}_2\text{-C}_{30}$, alquino $\text{C}_2\text{-C}_{30}$, amina ($-\text{NH}_2$ ó $-\text{NR}'\text{R}''$), amida ($-\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$), azida ($-\text{N}_3$), cetona ($-\text{C}=\text{O}$), éster ($-\text{COOR}'$), éter ($\text{R}'\text{-O-R}''$), halógeno, imina ($\text{RR}'\text{C}=\text{NR}''$), isocianato ($-\text{NCO}$), isotiocianato ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$), nitrilo ($-\text{C}\equiv\text{N}$), nitro ($-\text{NO}_2$) y tiol ($-\text{SH}$), representando cada R' y R'' , de manera independiente, un hidrógeno, un alquilo $\text{C}_2\text{-C}_{30}$, un alqueno $\text{C}_2\text{-C}_{30}$, o un alquino $\text{C}_2\text{-C}_{30}$, todos estos grupos pueden ser lineales o ramificados o estar sustituidos o no sustituidos. En una realización más preferida, el grupo orgánico neutro es el isocianato ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$).

En una realización más particular de la invención, el grupo orgánico polar está derivatizado con un oligonucleótido de unión que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-5'-AAA AAA CCC CCC-3'}$). Como se puede apreciar, el oligonucleótido de unión tiene una secuencia de nucleótidos tal que hibrida parcialmente con el oligonucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o la secuencia SEQ ID NO: 3.

En la presente invención, el término "derivatizado" se refiere a la conversión de un compuesto original en una sustancia químicamente similar mediante cambios químicos.

Tal como se ha indicado en párrafos anteriores, en el biosensor de la invención el oligonucleótido está anclado a la superficie del soporte poroso en una posición tal que

- (i) en ausencia de *C. auris*, los oligonucleótidos bloquean el acceso de los poros al exterior impidiendo la salida del indicador, y
- (ii) en presencia de *C. auris*, los oligonucleótidos reconocen y se une al ADN de dicho hongo, desbloqueando el acceso de los poros al exterior y permitiendo la salida del indicador.

35

Por lo tanto, el anclaje del oligonucleótido cubre toda la superficie exterior del material poroso, incluyendo el borde de los poros para que pueda funcionar como “puerta molecular” y, dependiendo de la presencia o ausencia del ADN de *C. auris* en el medio, el oligonucleótido se une o hibrida al ADN del *C. auris* que o bien permita la salida del
5 indicador (el acceso del poro con el exterior no está bloqueado) o bien impida la salida del mismo (el acceso del poro con el exterior está bloqueado).

Usos del biosensor de la invención

10 A lo largo de los párrafos anteriores, se ha puesto de manifiesto el funcionamiento del biosensor de la invención y su utilidad en la detección de ADN de *C. auris*.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del biosensor de la invención para la detección del ADN de *C. auris* en una muestra, de ahora adelante
15 el “uso del biosensor de la invención”.

C. auris puede estar presente en una amplia variedad de ambientes, desde suelos, agua y aire, utensilios y superficies, hasta en humanos y animales. Así, la detección y/o cuantificación de *C. auris* mediante el biosensor de la invención puede llevarse a cabo
20 en cualquier muestra que sea susceptible de estar contaminada por *C. auris*.

En la presente invención se entiende por “muestra” a una parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella para someterla a estudio, análisis o experimentación. En la presente invención, dicho
25 estudio, análisis o experimentación hace referencia a la presencia/ausencia de ADN de *C. auris*. Ejemplos de muestras adecuadas para el método de detección de la invención incluyen, sin limitarse a, muestras clínicas y muestras ambientales. Dentro del término “muestra” también se incluyen muestras que han sido manipuladas de alguna manera después de su obtención, por ejemplo, mediante el tratamiento con reactivos, la
30 solubilización o el enriquecimiento de ciertos componentes. En una realización preferida, las muestras aisladas son procesadas para obtener una solución líquida en la que los componentes que componen la muestra incluyan ADN de *C. auris*. En una realización preferida del uso de la invención, la muestra es una muestra ambiental o una muestra clínica.

35

En la presente invención se entiende por “muestra ambiental” aquella muestra que procede del entorno o del medio ambiente y que es susceptible de ser o estar contaminado por *C. auris*, tal como aguas residuales industriales o caseras, soluciones de laboratorio como soluciones tampón, líquidos de cultivo, soluciones de reacción, lavados y similares.

En la presente invención se entiende por “muestra clínica” a aquella muestra aislada de un sujeto. El término “muestra clínica” abarca tanto muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de ellos y su progenie, como células en cultivo celular, los sobrenadantes celulares, los lisados celulares, el suero, el plasma, los fluidos biológicos y las muestras de tejidos. Ejemplos de muestras clínicas adecuadas para el uso de la invención incluyen, sin limitarse a, tejidos celulares, material fecal y líquidos corporales, tales como, orina, saliva, suero y líquido pleural, líquido peritoneal, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo. En una realización preferida en el uso de la invención, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido sinovial y líquido cerebroespinal.

En la presente invención, la muestra clínica es aislada de un sujeto. El término “sujeto”, tal como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates, y humanos. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier sexo, edad o raza.

En la presente invención se entiende por “detectar” o “detección” al reportar o identificar ADN de *C. auris* en una muestra.

El biosensor de la invención también es de utilidad en el diagnóstico de la infección causada por *C. auris*. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del biosensor de la invención para diagnosticar *in vitro*, de ahora adelante “el uso diagnóstico del biosensor de la invención”, una infección causada por *C. auris* en un sujeto.

El término “sujeto” ha sido definido en párrafos anteriores y es aplicable al presente aspecto inventivo. Así, en una realización preferida del uso diagnóstico del biosensor de

la invención, el sujeto es ser humano.

En la presente invención se entiende por “diagnosticar” al procedimiento por el cual se identifica una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier
5 condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos semejantes. En la presente invención la enfermedad a identificar es una candidiasis, esto es, una infección causada por *C. auris*, y el parámetro clínico es la presencia del ADN de *C. auris* en una muestra aislada del sujeto.

10

C. auris es un hongo ascomiceto patógeno multirresistente que crece como levadura, forma colonias viscosas lisas, brillantes y blanquecinas en los medios de crecimiento. Microscópicamente las células tienen forma elipsoide. Su crecimiento se desarrolla bien a 42°C, pero tiene crecimiento variable a temperaturas más altas. La fuerte asociación
15 de este organismo con los entornos de cuidados intensivos, especialmente los pacientes con catéteres venosos centrales y catéteres urinarios a largo plazo, sugiere un potencial del hongo para la formación de biopelículas. Su resistencia múltiple a antifúngicos y la capacidad para colonizar entornos de cuidados intensivos, facilita que este hongo cause un gran número de infecciones nosoconiales, donde muchas evolucionan a infecciones sistémicas mortales. Ejemplos de infecciones causadas por *C. auris* son infecciones del oído y de heridas, infecciones superficiales (como las infecciones de piel y de mucosas), infecciones profundas (peritonitis, meningitis, endocarditis, osteomielitis, etc.) e infecciones sistémicas como la candidemia (presencia de candida en sangre). No obstante en una realización preferida del uso diagnóstico del biosensor de la invención,
20 la infección causada por *C. auris* se selecciona del grupo que consiste en: candidemia, candidiasis orofaríngea, candidiasis vulvovaginal, candidiasis oral, candidiasis cutánea, candidiasis profunda (tal como peritonitis, meningitis, endocarditis, osteomielitis, artritis, etc.), esofagitis candidiásica, onicomicosis y sepsis.

25

30 Métodos de la invención

De forma análoga a los usos del biosensor de la invención descritos en párrafos anteriores, en la presente invención también se contemplan los métodos dirigidos tanto a detectar *C. auris* en una muestra, como los dirigidos a diagnosticar infecciones
35 producidas por *C. auris* en un sujeto.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se relaciona con un método *in vitro* para detectar *C. auris*, de ahora adelante el “método de detección de la invención” en una muestra que comprende:

- a) poner en contacto el biosensor de la invención con una muestra, y
 - 5 b) detectar o medir el indicador en el medio,
- en donde la presencia del indicador en el medio es indicativa de la presencia del ADN de *C. auris* en la muestra.

Los términos “detectar”, “*C. auris*” y “muestra”, han sido definidos o explicados en párrafos anteriores, y dichas definiciones y las realizaciones particulares de los mismos son aplicables al presente aspecto inventivo. Así, en una realización particular del método de detección de la invención, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra ambiental o una muestra clínica, preferiblemente, la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, fluido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

La primera etapa del método de detección de la invención [etapa a)] comprende poner en contacto el biosensor de la invención con una muestra. Como se ha explicado en párrafos anteriores, dicha muestra ha podido ser tratada previamente antes de ser puesta en contacto con el biosensor. Técnicas de manipulación o preparación de muestras para ser sometidas al análisis de sus componentes, en particular, para el análisis de la detección de microorganismos, son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. En una realización preferida del método de detección y/o cuantificación de la invención, previamente a la etapa a), el método comprende mezclar la muestra con una disolución tampón.

El término “disolución tampón” en la presente invención se refiere a soluciones en concentraciones relativamente elevadas de un ácido y su base conjugada, es decir, sales hidrolíticamente activas. Tienen la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes. En el método de detección y/o cuantificación de la presente invención la disolución tampón permite mantener el pH del medio en un umbral estrecho de modo que se puedan evitar cambios en la solución que puedan afectar el resultado del método. En una realización preferida la “disolución tampón” es solución tampón de tris (hidroximetil)aminometano (TRIS). En una realización preferida, el pH del medio es de

6,5 a 8,5, preferiblemente pH de 7 a 8, aún más preferiblemente pH 7,5.

En una segunda etapa [etapa b)], el método de detección y/o cuantificación de la invención comprende detectar o medir el indicador en el medio. Los medios y técnicas
5 necesarias para detectar o cuantificar el indicador en el medio son determinados por el indicador utilizado, y tales medios y técnicas son conocidos en el estado de la técnica por un experto en la materia que sabrá cuales medios y técnicas utilizar. Ejemplos de métodos o técnicas incluyen, sin limitarse a, observación visual, espectroscopía de fluorescencia y espectrofotometría ultravioleta-visible. En una realización preferida del
10 método de detección de la invención, la detección y la cuantificación se realiza por medición de la intensidad de fluorescencia del medio, más preferiblemente, la medición de la intensidad de fluorescencia con una longitud de onda de 550 a 625 nm del medio.

Una vez detectado el indicador en el medio, el biosensor permite concluir que
15 - la presencia del indicador en el medio es indicativa de la presencia de ADN de *C. auris* en la muestra.

En la presente invención, el término “la presencia del indicador en el medio es indicativa de la presencia de ADN de *C. auris* en la muestra” se refiere a que el oligonucleótido del
20 biosensor de la invención se ha hibridado, unido, o ha reconocido al ADN de *C. auris*, desbloqueando los poros del soporte poroso y libertando el indicador al medio.

Debido a las características del biosensor de la invención, éste también puede emplearse en el diagnóstico de infecciones de *C. auris*. Por lo tanto, en otro aspecto, la
25 presente invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar una infección de *C. auris*, de ahora en adelante el “método de diagnóstico de la invención”, en un sujeto que comprende:

- a) poner en contacto un biosensor de la invención con una muestra biológica procedente de un sujeto, y
- 30 b) detectar el indicador en el medio,

en donde

- la presencia del indicador en el medio es indicativa de que el sujeto sufre una infección causada por *C. auris*.

35 Los términos “detectar”, “*C. auris*”, “muestra”, “enfermedades causadas por una

infección de *C. auris*”, han sido definidos y explicados en aspecto inventivos anteriores, y dichas definiciones y las realizaciones particulares de los mismos son aplicables al método de diagnóstico de la invención.

5 Así, en una realización preferida del método de diagnóstico de la invención, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra ambiental o una muestra clínica, más preferiblemente, la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, fluido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

10 En otra realización preferida del método de diagnóstico de la invención, la infección causada por de *C. auris* se selecciona del grupo que consiste en: candidemia, candidiasis orofaríngea, candidiasis vulvovaginal, candidiasis oral, candidiasis cutánea, candidiasis profunda (tal como peritonitis, meningitis, endocarditis, osteomielitis, artritis, etc.), esofagitis candidiásica, onicomycosis y sepsis.

15

En otra realización preferida del método de diagnóstico de la invención, el sujeto es un ser humano.

20 En otra realización preferida del método de diagnóstico de la invención, previamente a la etapa a), el método comprende mezclar la muestra con una disolución tampón. En otra realización más preferida, la “disolución tampón” es solución tampón de tris (hidroximetil)aminometano (TRIS). En otra realización preferida, el pH del medio es de 6,5 a 8,5, preferiblemente pH de 7 a 8, aún más preferiblemente pH 7,5.

25 Tal como se usa en la presente descripción, el término “la presencia del indicador en el medio es indicativa de que el sujeto sufre una enfermedad causada por *C. auris*” se refiere a que debido a la interacción del oligonucleótido del biosensor de la invención con las células de *C. auris*, el indicador es liberado por los poros hacia el medio exterior, revelando la presencia en dicho medio de células de *C. auris*, y por asociación la
30 enfermedad causada por el patógeno *C. auris*.

Kit de la invención y sus usos

35 La puesta en práctica de los usos y los métodos de la invención comprende el empleo del biosensor de la invención, el cuál puede estar formando parte de un kit.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit, de ahora adelante el “kit de la invención”, que comprende el biosensor de la invención. Además del biosensor, el kit puede comprender otros componentes útiles en la puesta en práctica de la presente invención, tales como, buffers, vehículos de entrega, soportes del material, componentes de controles positivos y/o negativos, etc. Opcionalmente, tales 5 controles comprenden el biosensor de la invención con modificaciones para su uso como controles, por ejemplo, oligonucleótidos que no reconocen ADN de *C. auris*, contenedores con soluciones. Además de los componentes mencionados, los kits podrán incluir también instrucciones para practicar el objeto de la invención. Estas 10 instrucciones pueden ser presentes en los kits mencionados en una variedad de formas, uno o más de los cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., una hoja u hojas de papel en las que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un inserto de paquete, etc. Otro medio sería un 15 medio legible por ordenador, por ejemplo, un CD, un USB, etc., en el que se haya registrado la información. Otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que puede utilizarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio remoto. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para la detección de *C. auris*, de ahora en adelante el “kit de detección de la invención”, en una muestra.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para 25 diagnosticar *in vitro* una infección causada por *C. auris* en un sujeto.

Los términos “detección”, “diagnóstico”, “muestra”, “sujeto” y “infección causada por *C. auris*” han sido definidos en otros aspectos de la presente invención y son aplicables al kit de la invención y sus usos. Asimismo, las realizaciones preferidas de dichos términos 30 también son aplicables al kit de la invención y sus usos. Por lo tanto, en una realización preferida, la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, fluido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal. En otra realización preferida, la infección causada por *C. auris* se selecciona del grupo que consiste en: candidemia, candidiasis orofaríngea, candidiasis vulvovaginal, candidiasis oral, candidiasis cutánea, 35 candidiasis profunda (tal como peritonitis, meningitis, endocarditis, osteomielitis, artritis,

etc.), esofagitis candidiásica, onicomicosis y sepsis.

En otra realización preferida del uso del kit de la invención para diagnosticar *in vitro* una infección causada por *C. auris* en un sujeto, el sujeto es ser humano.

5

Método de preparación el biosensor de la invención

Otro aspecto de la presente invención es un método de preparación del biosensor de la invención que comprende:

- 10
- a) Introducción del indicador en el soporte poroso,
 - b) Funcionalización del material de la etapa a) mediante la unión de un grupo orgánico neutro o catiónico a la superficie, y
 - c) Adición del aptámero que reconoce *C. auris*.

15 En una realización preferida del método de preparación del biosensor de la invención, entre el paso b) y c), se derivatiza el grupo orgánico neutro o catiónico unido a la superficie del material de la etapa a).

20 Realizaciones particulares del método de preparación del biosensor de la invención son todas aquellas realizaciones particulares del biosensor de la invención, tales como las descritas previamente en la presente descripción:

- el oligonucleótido está anclado a la superficie del soporte poroso a través de un grupo orgánico polar, y/o
 - el oligonucleótido está anclado a la superficie del soporte poroso a través de un grupo orgánico polar derivatizado con un oligonucleótido de unión, en donde la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido de unión es parcialmente complementaria al oligonucleótido, y/o
 - el grupo orgánico polar es un grupo orgánico neutro o catiónico, y/o
 - el grupo orgánico neutro se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico (-COOH), alcohol (-OH), aldehído (-CHO), alqueno, alquino, amina (-NH₂ ó -NR'R''), amida (-C(O)NR'R''), azida (-N₃), cetona (-C=O), éster (-COOR'), éter (R'-O-R''), halógeno, imina (RR'C=NR''), isocianato (-NCO), isotiocianato (-N=C=S), nitrilo (-C≡N), nitro (-NO₂) y tiol (-SH), siendo R una etiqueta genérica para una cadena lateral, sustituyente o grupo químico unido a uno de los grupos funcionales principales descritos, y/o
- 35

- el grupo orgánico catiónico se selecciona del grupo que consiste en aminas, grupos guanidinio (CH_6N_3^+), fosfonio (PH_4^+) o de amonio cuaternario (NR_4^+), en donde R se selecciona entre alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ lineal o ramificado y cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$, y/o
- el grupo orgánico polar está derivatizado con un oligonucleótido de unión que comprende la secuencia $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-SEQ ID NO: 1}$, y/o
- el oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3 y/o
- el indicador es rodamina B, y/o
- el soporte poroso es microporoso, mesoporoso o macroporoso, y/o
- el tamaño medio de los poros del soporte poroso es de entre aproximadamente 2 y 100 nm, más preferiblemente de entre aproximadamente 2 y 50 nm, y/o
- el soporte poroso es dióxido de silicio u óxido de aluminio.

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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Diagrama del biosensor de la invención y la sucesión de eventos en presencia de ADN de *C. auris*.

25

Fig. 2. Imagen de FESEM del material NAA y del sólido S2-S3 (el biosensor de la invención).

Fig. 3. Estudio de liberación de rodamina B desde el biosensor de la invención con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 2 (A) y desde el biosensor de la invención con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 3 (B), ambos en presencia de 100 ng de ADN genómico de *C. auris* (a) y en ausencia (b).

Fig. 4. Estudio de liberación de rodamina B desde el biosensor de la invención con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 2 (A) y desde el biosensor de la invención con

35

el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 3 (B) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de *C. auris*. Los ensayos se realizaron a 60 minutos en PBS a pH 7,5.

5 **Fig. 5.** Estudio de liberación de rodamina B desde el biosensor de la invención con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 2 en presencia de diferentes concentraciones de unidades formadoras de colonias (CFU) de *C. auris*. Los ensayos se realizaron a 60 minutos en PBS a pH 7,5.

10 **Fig. 6.** Estudio de liberación de rodamina B desde el biosensor de la invención con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 2 y desde el biosensor de la invención con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 3 en presencia de otras especies de hongos del género *Candida*. Los ensayos se realizaron a 60 minutos en PBS a pH 7,5.

15 **EJEMPLOS**

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del biosensor de la invención.

20 **Materiales e Instrumentación**

Para la preparación de los materiales porosos se empleó un agitador magnético termostático y material de vidrio y plástico habitual. Todos los reactivos utilizados para la preparación de los materiales se emplearon tal cual se recibieron de las casas
25 comerciales sin ninguna purificación extra. Los materiales obtenidos se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX) y espectroscopia de fluorescencia. Las imágenes de FESEM y el análisis EDX se obtuvieron con un microscopio ULTRA 55 (Zeiss). Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un
30 fluorímetro de microplacas Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA).

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis del sólido S1

35 8 placas independientes de alúmina mesoporosa (2 mm de diámetro y 0,1 mm de altura)

se sumergieron en una disolución que contenía 8 mL de acetonitrilo y rodamina B a 1 mM, dejando la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación se añadieron 40 μ L por placa de (3-aminopropil)trietoxisilano (1,32 mmol) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5,5 h. El sólido obtenido se caracterizó mediante las técnicas de FESEM y EDX y se identificó como S1.

Ejemplo 2: Síntesis del biosensor de la invención

2 placas independientes de sólido S1 se sumergieron en 485 μ L de una disolución de tampón tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) a pH 7,5 conteniendo 15 μ L del oligonucleótido SEQ ID NO: 2 (5'- TTT TGG GGG GTA CGC AAG GCG AAT CTA CCC GGG GGG TTT T-3') o 15 μ L del oligonucleótido SEQ ID NO: 3 (5'- TTT TGG GGG GTC GCC ATT TTC TTT GTG GCG GGG GGT TTT-3') a 100 μ M y se dejó agitar a durante 1 h a 37 °C. A continuación se lavó en sólido con la disolución tamponada de TRIS gota a gota y el sólido S2 obtenido se caracterizó mediante las técnicas de FESEM y EDX.

Ejemplo 3: Caracterización de los materiales obtenidos

Los soportes de alúmina porosa consistieron en una película anódica de óxido de aluminio sobre una capa de aluminio de 0,1 mm de espesor con una densidad de poros de $9 \cdot 10^{11}$ cm⁻² y poros de 5 nm de diámetro y longitud de 10 μ m. En la Figura 2a se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), donde puede visualizarse la superficie porosa de las placas de alúmina. Asimismo, las imágenes de FESEM del material S2-S3 muestran la existencia de una capa de materia orgánica sobre la superficie del material, mientras que la existencia de poros en ciertas áreas confirma la conservación de la estructura porosa a lo largo de la síntesis del biosensor de la invención (Figura 2b).

El contenido de materia orgánica correspondiente a los distintos sólidos fue determinado por análisis EDX. Mediante esta técnica, se confirmó la presencia de átomos de carbono, nitrógeno y fósforo correspondiente a las moléculas de rodamina B, (3-aminopropil) trietoxisilano y oligonucleótidos de cada uno de los materiales. Los valores obtenidos de C, N y P en referencia al contenido de átomos de aluminio (C/Al, N/Al y P/Al) se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Contenido materia orgánica de los distintos sólidos

	C/AI	N/AI	P/AI
S1	1,06	0,33	-
S2	0,66	0,38	0,04
S3	0,55	0,36	0,03

Ejemplo 4: Comportamiento del biosensor de la invención en presencia de ADN genómico de *C. auris*.

5 2 placas independientes del biosensor de la invención para cada oligonucleótido SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 se sumergieron en 900 μL de disolución tampón a pH 7,5 (TRIS) cada una. A una de ellas se le añadieron 100 μL de la disolución tamponada y a la otra se le añadieron 100 μL de una disolución de ADN genómico de *C. auris* (1 ng μL^{-1}). En ausencia del analito diana no se observó liberación del colorante en función del tiempo (Figura 3 ·A y ·B, curvas a). En cambio, en presencia de *C. auris* se observó una liberación del colorante, tal y como muestran las curvas b de la Figura 3A y 3B.

Ejemplo 5: Comportamiento del biosensor de la invención en presencia de diferentes concentraciones de ADN genómico de *C. auris*.

15 7 soportes independientes del biosensor de la invención para cada oligonucleótido SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 se sumergieron individualmente en 900 μL de disolución tampón a pH 7,5 (TRIS) y a una de ellas se le añadieron 100 μL de diluciones seriadas de una disolución de ADN genómico de *C. auris* hasta alcanzar las concentraciones finales comprendidas en el rango de 10^{-2} y 10^{-6} ng DNA μL^{-1} . Tal y como se observa en la Figura 4A (para la SEQ ID NO: 2) y Figura 4B (para la SEQ ID NO: 3), la cantidad de indicador liberado a los 60 minutos de ensayo es proporcional a la concentración de hongo presente en el medio, estableciéndose un límite de detección de 0,5 pg/ μL .

En otro ensayo, 6 soportes del biosensor de la invención con el oligonucleótido SEQ ID NO: 2 se sumergieron en 6 disoluciones de sangre humana artificialmente inoculadas con diferentes concentraciones del hongo *C. auris* (10^4 - 0 CFU mL^{-1}) previamente cultivado en medio agar YPD (Difco®) a 37 °C durante 24 horas. Las disoluciones de sangre fueron posteriormente centrifugadas a 3000 x g durante 10 min. Finalmente, cada uno de los soportes se sumergieron en una mezcla de 500 μL de cada suero en 500 μL de tampón TRIS (pH 7,5). Tal y como se observa en la Figura 5, la cantidad de

indicador liberado a los 60 minutos de ensayo es proporcional a la concentración de hongo presente en el medio, estableciéndose un límite de detección de 6 CFU/mL.

Ejemplo 6: Comportamiento del biosensor de la invención en presencia de otras especies de *Candida*.

La Figura 6 muestra la rodamina B liberada del biosensor de la invención con la SEQ ID NO: 2 (material S2) y el biosensor de la invención con la SEQ ID NO: 3 (material S3) en presencia de diferentes especies del género *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilopsis*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudohaemulonii*, *Candida haemulonii*, *Candida intermedia* y *Candida lusitanae*). Como se puede observar solo se produce liberación de rodamina B en presencia *C. auris*, demostrándose la alta selectividad que se alcanza el biosensor de la invención.

Ejemplo 7: Comportamiento del biosensor de la invención con el oligonucleótido SEQ ID NO: 2 en presencia de muestras clínicas de pacientes infectados por *C. auris*.

Se realizó la validación del sistema en muestras clínicas reales. Concretamente, se analizó la presencia de *C. auris* en 22 muestras de hemocultivo de pacientes con sospecha de infección por *C. auris*. Todas las muestras fueron analizadas en paralelo por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Tal y como muestra la Tabla 2, el sistema consiguió identificar el 90 % de las muestras infectadas.

Además, también se realizó la validación del sistema en muestras clínicas reales de diferente origen geográfico, para así demostrar la capacidad del sistema de indentificar los diferentes *clusters* globalmente identificados. Todas las muestras fueron analizadas en paralelo por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe. En la Tabla 3 se muestra los resultados. El biosensor de la invención con el oligonucleótido SEQ ID NO: 2 fue capaz de acertar el 93 % de las muestras analizadas.

Tabla 1: Validación del método de diagnóstico del biosensor de la invención con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 2 (**S2**) en muestras reales de hemocultivos de pacientes con sospecha de infección por *C. auris*.

# Muestra	Método de referencia (hemocultivo) ^a	S2 ^b
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-

# Muestra	Método de referencia (hemocultivo) ^a	S2 ^b
6	+	+
7	+	+
8	+	-
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	-
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	-
22	+	+

^a) Se considera positivo (+) cuando de las muestras de sangre se aísla alguna colonia de *C. auris*.

^b) Se considera positivo (+) cuando la intensidad de fluorescencia a 575 nm ($\lambda_{exc} = 555$ nm) es igual o mayor que 3 veces la desviación estándar de 3 controles negativos.

5

Tabla 3: Validación del método de diagnóstico de la invención con el biosensor de la invención con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 2 (S2) en muestras reales de sueros de pacientes con sospecha de infección por diferentes aislados de C. auris procedentes de diversos orígenes geográficos.

10

# Aislado	País	Método de referencia (secuenciación) ^a	S2 ^b
1	Corea	+	+
2	Japón	+	+
3	India	+	+
4	Venezuela	+	+
5	Kuwait	+	+
6	Omán	+	+
7	Colombia	+	-
8	España	+	-
9	España	+	+
10	España	+	+
11	España	+	+
12	España	+	+
13	España	+	+
14	España	+	+

^a) Muestras confirmadas por secuenciación.

^{b)} Se considera positivo (+) cuando la intensidad de fluorescencia a 575 nm ($\lambda_{exc} = 555$ nm) es igual o mayor que 3 veces la desviación estándar de 3 controles negativos.

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor que comprende
- un soporte poroso que comprende un indicador en el interior de los poros, y
 - 5 - uno o más tipos de oligonucleótidos que reconocen de forma específica el ADN de *Candida auris*,
- en donde
- una pluralidad de poros comprenden el acceso al exterior del soporte poroso, y
 - los oligonucleótidos están anclados a la superficie del soporte poroso en una
 - 10 posición tal que
- (iii) en ausencia de ADN de *C. auris*, los oligonucleótidos bloquean el acceso de los poros al exterior impidiendo la salida del indicador, y
 - (iv) en presencia de ADN de *C. auris*, los oligonucleótidos reconocen y se unen al ADN de dicho hongo, desbloqueando el acceso de los poros al exterior y
 - 15 permitiendo la salida del indicador.
2. Biosensor según la reivindicación 1, en donde los oligonucleótidos están anclados a la superficie del soporte poroso a través de un grupo orgánico polar.
- 20 3. Biosensor según la reivindicación 2, en donde el grupo orgánico polar está derivatizado con un oligonucleótido de unión, en donde la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido de unión es parcialmente complementaria al oligonucleótido que reconoce el ADN de *C. auris*.
- 25 4. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el grupo orgánico polar es un grupo orgánico neutro o catiónico.
5. Biosensor según la reivindicación 4, en donde el grupo orgánico neutro se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico (-COOH), alcohol (-OH), aldehído (-CHO), alqueno C₂-C₃₀, alquino C₂-C₃₀, amina (-NH₂ ó -NR'R''), amida (-C(O)NR'R''), azida (-N₃), cetona (-C=O), éster (-COOR'), éter (R'-O-R''), halógeno, imina (RR'C=NR''), isocianato (-NCO), isotiocianato (-N=C=S), nitrilo (-C≡N), nitro (-NO₂) y tiol (-SH), preferiblemente isotiocianato (-N=C=S), representando cada R' y R'', de manera independiente, un hidrógeno, un alquilo C₂-C₃₀, un alqueno C₂-C₃₀, o un alquino C₂-
- 30 C₃₀, todos estos grupos pueden ser lineales o ramificados o estar sustituidos o no
- 35

sustituidos.

6. Biosensor según la reivindicación 4, en donde el grupo orgánico catiónico se selecciona del grupo que consiste en aminas ($-\text{NH}_3^+$), grupos guanidinio ($[\text{CH}_6\text{N}_3]^+$),
5 fosfonio ($-\text{PH}_4^+$) o de amonio cuaternario ($-\text{NR}_4^+$), en donde cada R se selecciona independientemente entre un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{30}$, lineal o ramificado, y un cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$.

7. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el grupo orgánico polar está derivatizado con un oligonucleótido de unión que comprende la
10 secuencia $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-SEQ ID NO: 1}$.

8. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde los oligonucleótidos comprenden las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o la
15 secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3.

9. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el indicador es rodamina B.

10. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el soporte poroso es microporoso, mesoporoso o macroporoso.
20

11. Biosensor según la reivindicación 10, en donde el tamaño medio de los poros del soporte poroso es de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 nm.

25 12. Biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el soporte poroso es dióxido de silicio u óxido de aluminio.

13. Uso de un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la detección del ADN de *C. auris* en una muestra.
30

14. Uso según la reivindicación 13, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra ambiental o una muestra clínica, preferiblemente, la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.
35

15. Uso de un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para diagnosticar *in vitro* la infección causada por *C. auris* en un sujeto.

5 16. Uso según la reivindicación 15, en donde la infección causada por *C. auris* se selecciona del grupo que consiste en: candidemia, candidiasis orofaríngea, candidiasis vulvovaginal, candidiasis oral, candidiasis cutánea, candidiasis profunda, esofagitis candidiásica, onicomycosis y sepsis.

10 17. Uso según la reivindicación 15 o 16, en donde el sujeto es ser humano.

18. Método *in vitro* para detectar el ADN de *C. auris* en una muestra que comprende:
a) poner en contacto un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 con una muestra, y
b) detectar el indicador en el medio,
15 en donde la presencia del indicador en el medio es indicativa de la presencia del ADN de *C. auris* en la muestra.

19. Método *in vitro* para diagnosticar la infección causada por *C. auris* en un sujeto que comprende:
20 a) poner en contacto un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 con una muestra biológica aislada de un sujeto, y
b) detectar el indicador en el medio,
en donde la presencia del indicador en el medio es indicativa de que el sujeto sufre una infección causada por *C. auris*.

25 20. Método según la reivindicación 19, en donde la infección causada por *C. auris* se selecciona del grupo que consiste en: candidemia, candidiasis orofaríngea, candidiasis vulvovaginal, candidiasis oral, candidiasis cutánea, candidiasis profunda, esofagitis candidiásica, onicomycosis y sepsis.

30 21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en donde previamente a la etapa a), el método comprende mezclar la muestra con una disolución tampón.

35 22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra alimentaria o una muestra clínica,

preferiblemente, la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en sangre suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

5 23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en donde el sujeto es ser humano.

24. Un kit que comprende un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

10 25. Uso de un kit según la reivindicación 24, para la detección del ADN de *C. auris* en una muestra.

15 26. Uso según la reivindicación 25, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, esputo, líquido pleural, peritoneal, sinovial o cerebroespinal.

27. Uso de un kit según la reivindicación 24, para diagnosticar *in vitro* la infección de *C. auris* en un sujeto.

20 28. Uso según la reivindicación 27, en donde la infección causada por *C. auris* se selecciona del grupo que consiste en candidemia, candidiasis orofaríngea, candidiasis vulvovaginal, candidiasis oral, candidiasis cutánea, candidiasis profunda, esofagitis candidiásica, onicomycosis y sepsis.

25 29. Uso según la reivindicación 27 o 28, en donde el sujeto es ser humano.

30 30. Método para preparar un biosensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende

a) Introducción del indicador en el soporte poroso,

30 b) Funcionalización del material de la etapa a) mediante la unión de un grupo orgánico neutro o catiónico a la superficie, y

c) Adición del oligonucleótido que reconoce el ADN de *C. auris*.

35 31. Método según la reivindicación 30 donde después del paso b) y antes del paso c) se derivatiza el grupo orgánico neutro o catiónico unido a la superficie del material de la etapa a).

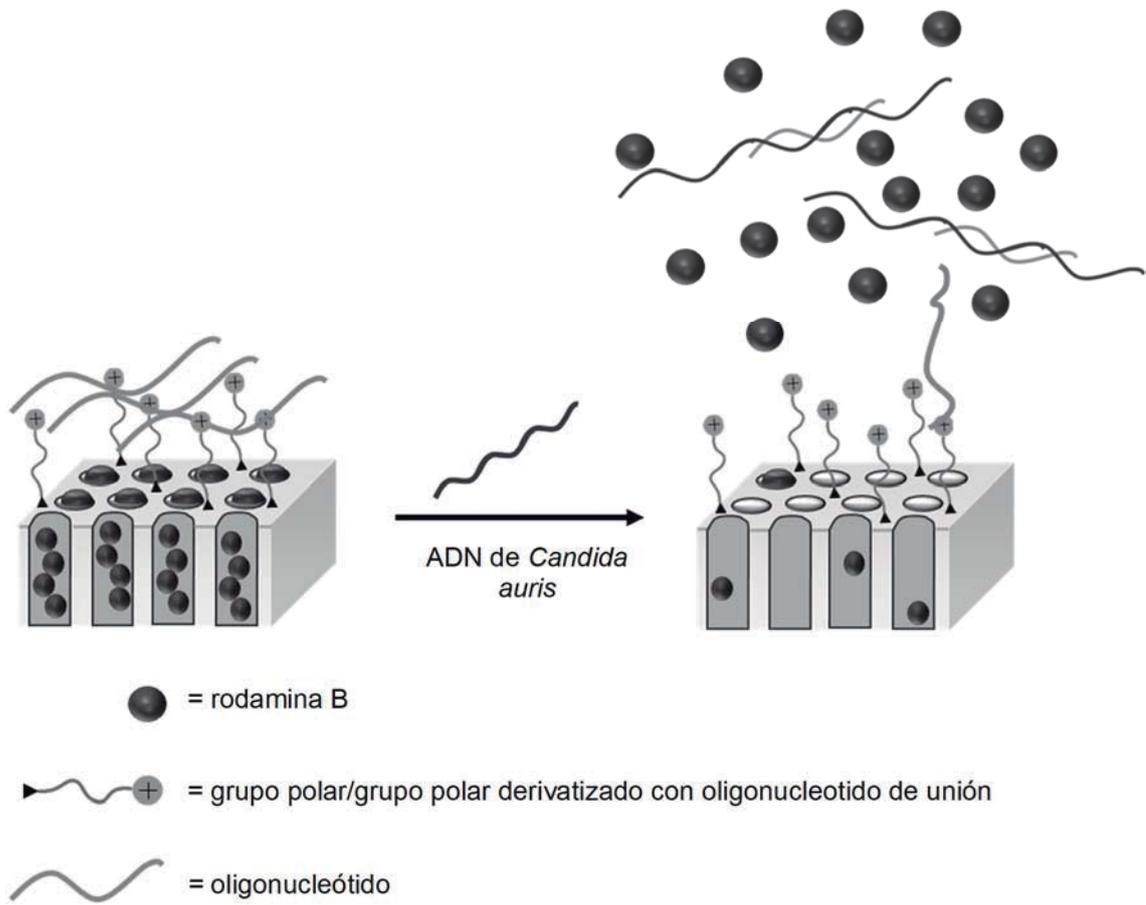


Fig. 1

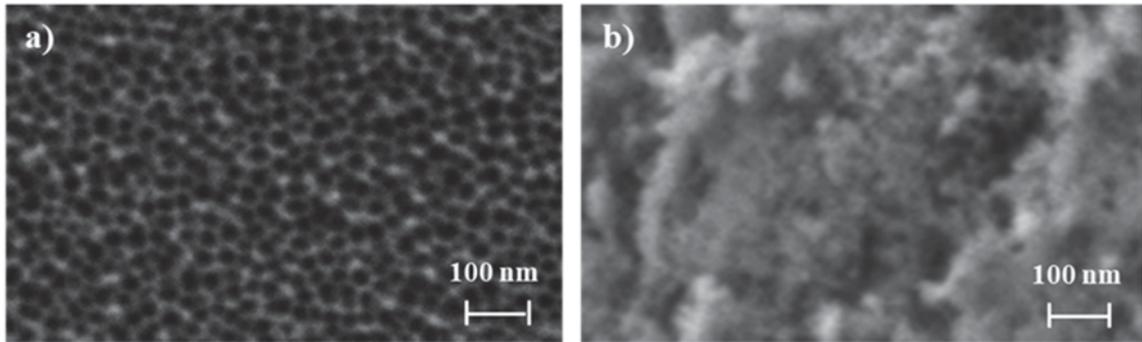


Fig. 2

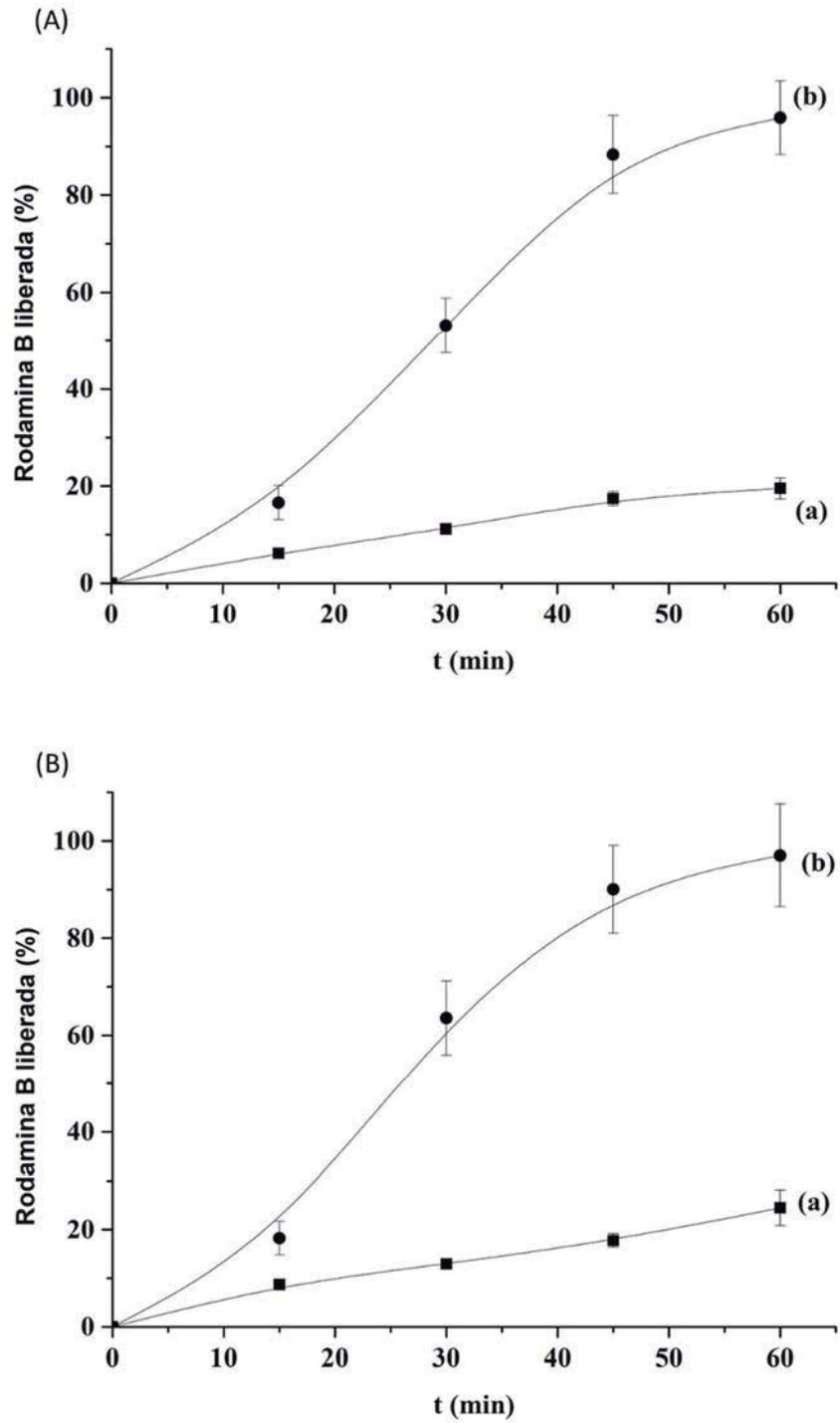


Fig. 3

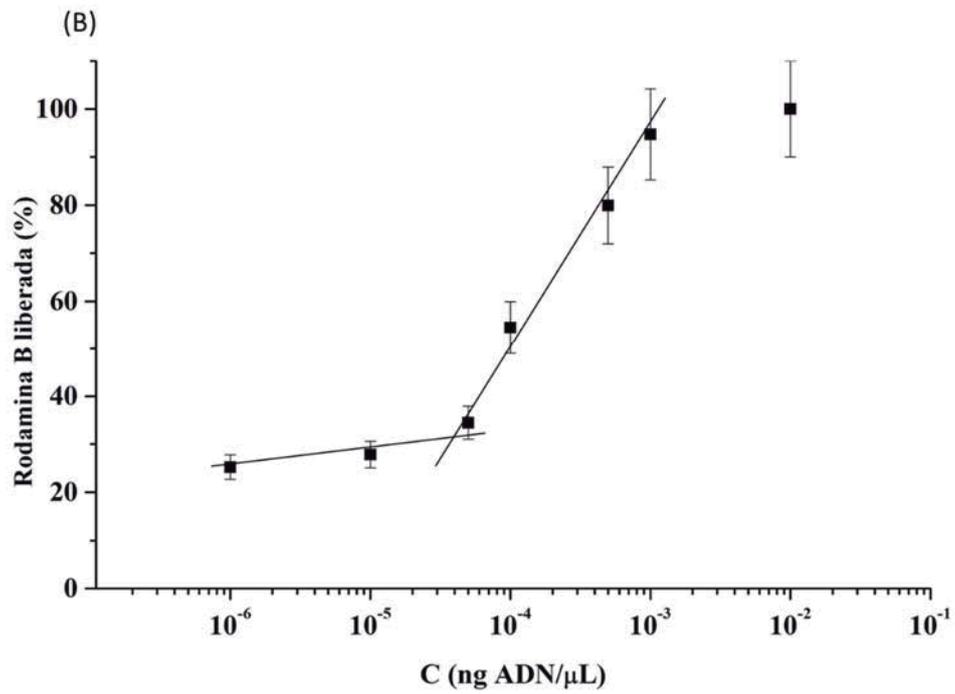
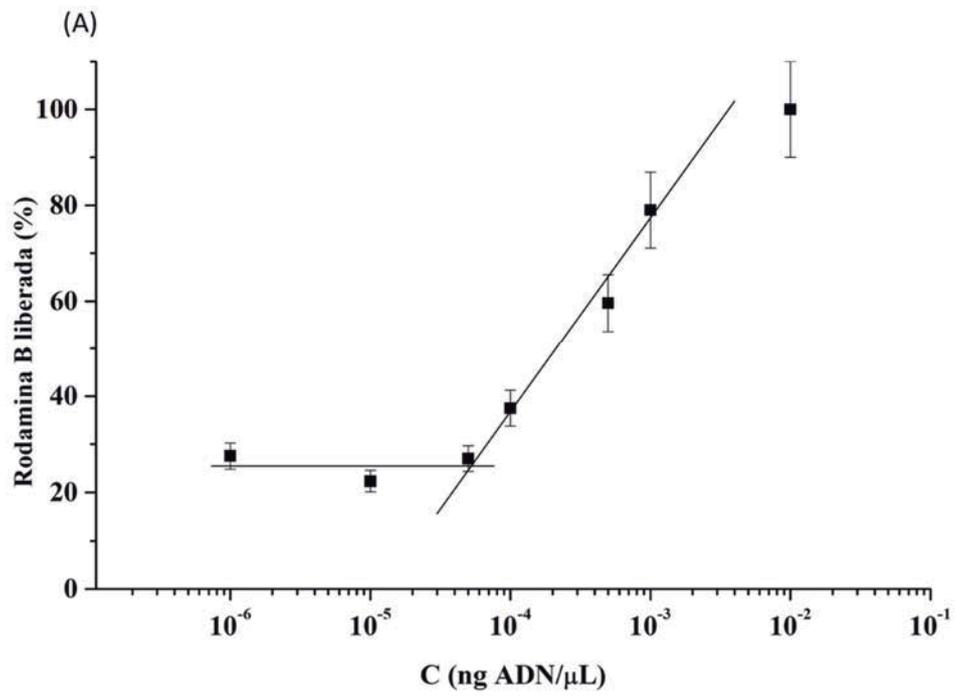


Fig. 4

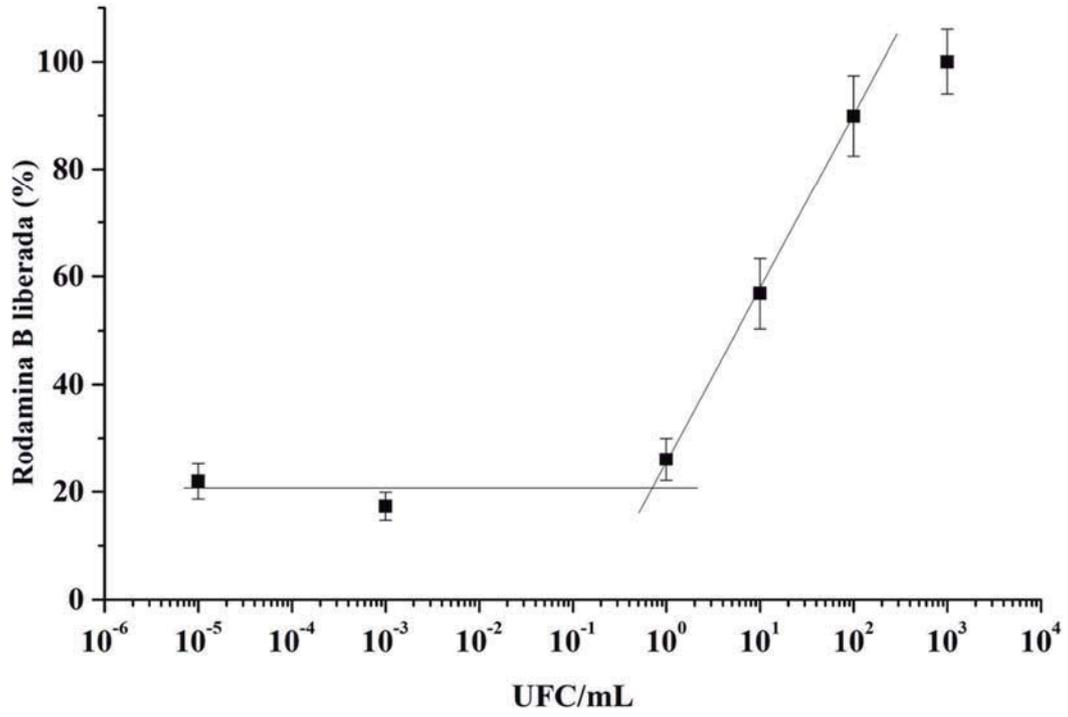


Fig. 5

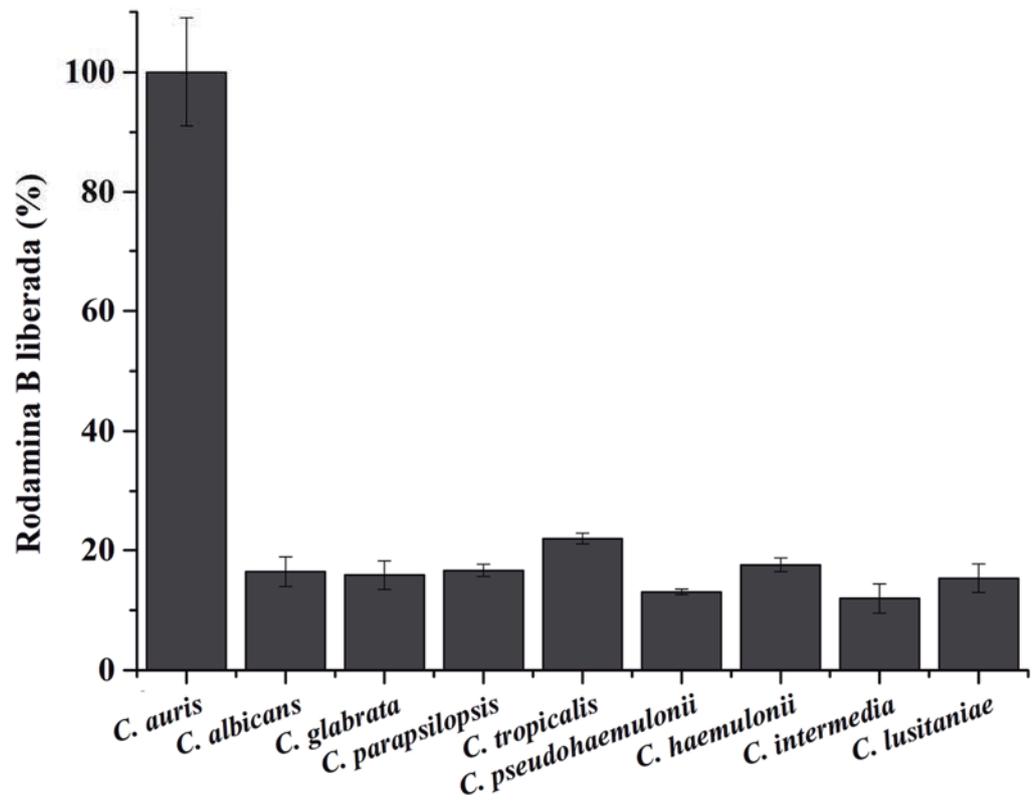


Fig. 6



- ②① N.º solicitud: 202030357
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.2020
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2019048722 A1 (UNIV VALENCIA POLITECNICA <i>et al.</i>) 14/03/2019, Párrafos [0003], [0007], [0015], [0033], [0034], [0039]-[0043],[0048]-[0052], nº 160;[0059], [0076], [0080], [0081], [0085], [0130], [0133]-[0134] , [0091], ejemplos. 1-12, tablas 1-4, reivindicaciones 1-13.	1-31
X	RIBES ÁNGELA <i>et al.</i> 24/05/2019 "Selective and Sensitive Probe Based in Oligonucleotide-Capped Nanoporous Alumina for the Rapid Screening of Infection Produced by <i>Candida albicans</i> ". ACS sensors United States, Vol. 4, Páginas 1291 – 1298; resumen [en línea][recuperado el 14/05/2020]. <DOI: doi:10.1021/acssensors.9b00169 pubmed:31020831>. Todo el documento.	1-31
A	PASCUAL L <i>et al.</i> 28/01/2015 "Oligonucleotide-capped mesoporous silica nanoparticles as DNA-responsive dye delivery systems for genomic DNA detection". Chemical Communications Royal Society of Chemistry gbr., Vol. 51, Páginas 1414 – 1416; resumen [en línea][recuperado el 14/05/2020]. , ISSN 1359-7345 (print) ISSN 1364-548X (electronic), <DOI: doi:10.1039/c4cc08306g pubmed:25429395>. Todo el documento.	1-31

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 14.05.2020	Examinador M. L. Serriñá Ramírez	Página 1/2
--	-------------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/6895 (2018.01)

G01N33/53 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

B82Y15/00 (2011.01)

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

C12Q, G01N, B82Y

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

INVENES, EPODOC, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP, XPESP2, EMBL-EBI