

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 149**

21 Número de solicitud: 202130735

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6895** (2008.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.07.2021**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.02.2023**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA EL FOMENTO DE LA  
INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE  
LA COMUNITAT VALENCIANA (FISABIO) (62.0%)  
Micer Mascó, 31  
46010 Valencia (Valencia) ES;  
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (12.0%);  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (12.6%);  
UNIVERSIDAD DE CHILE (12.0%) y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (1.4%)**

72 Inventor/es:

**RUIZ RUIZ, Susana;  
MOYA SIMARRO, Andrés;  
PESANTES SÁENZ, Nicole Stephanía;  
CALDERÓN SANDUBETE, Enrique;  
FRIAZA PATINO, Vicente;  
MEDRANO ORTEGA, Francisco Javier;  
VARGAS MUNITA, Sergio Luis;  
MAGNE, Fabien y  
PONCE OLMOS, Carolina Angélica**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

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 *in vitro* PARA EL DIAGNÓSTICO DE UNA INFECCIÓN POR *Pneumocystis jirovecii***

57 Resumen:

Método *in vitro* para el diagnóstico de una infección por *Pneumocystis jirovecii*.

La presente invención se refiere a métodos útiles para detectar *Pneumocystis jirovecii* en una muestra, para diagnosticar una infección por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente, o para discriminar entre un estado de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente y un estado de infección que se corresponde clínicamente con una neumonía causada por *Pneumocystis* (PCP), donde los métodos comprenden amplificar una muestra una región del gen *Msg-A* de usando un cebador directo para *Msg-A* de secuencia 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y un cebador reverso para *Msg-A* de secuencia 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y otra región del gen mitocondrial *mtLSUrRNA*, usando el cebador directo *MIs F* 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador reverso *MIs R* 5'-CTCCCTCGAGATATTCAAGTGCT (SEQ ID NO:16); y detectar el producto de amplificación. Además, la invención también se refiere a kits con dichos cebadores y a usos del kit, así como a los propios oligonucleótidos.

ES 2 933 149 A1

## DESCRIPCIÓN

### MÉTODO *in vitro* PARA EL DIAGNÓSTICO DE UNA INFECCIÓN POR *Pneumocystis jirovecii*

5

#### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de *Pneumocystis jirovecii* mediante una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos y empleando dos parejas de cebadores específicos para dicho patógeno y que detectan una familia de genes multicopia localizada en el genoma nuclear, así como también un gen mitocondrial también multicopia.

#### ANTECEDENTES

15

La neumonía causada por *Pneumocystis* (PcP) es todavía un importante problema clínico con una alta morbilidad y mortalidad entre los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo en los infectados por el VIH donde constituye la primera causa definitoria de SIDA, aunque también, y de forma cada vez más frecuente, en pacientes inmunodeprimidos por otras causas (trasplantes, quimioterapia, enfermedades autoinmunes, etc.). Sin embargo, actualmente el interés por *Pneumocystis* va más allá de la neumonía ya que están surgiendo evidencias que sugieren su posible papel en la patogenia de otras enfermedades como el síndrome de distrés respiratorio neonatal, principal causa de morbilidad en niños prematuros o en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cuarta causa de mortalidad en todo el mundo.

25

*Pneumocystis jirovecii*, la especie que infecta al ser humano, es un hongo atípico con estenoxenismo y tropismo pulmonar que no ha podido cultivarse, lo que ha dificultado tanto su estudio como las posibilidades de diagnóstico en la clínica. El diagnóstico de la PcP se basa en la presencia de un cuadro clínico compatible y en la identificación del microorganismo con técnicas específicas de tinción que son sobre todo útiles si se disponen de muestras de biopsia o de lavados broncoalveolares (LBA) pero que presentan problemas de sensibilidad cuando se usan muestras no invasivas como esputos, gárgaras o aspirados nasales o en el estudio de situaciones con baja carga parasitaria, como sucede en la neumonía en inmunodeprimidos por causas diferentes al VIH. El coste-efectividad de estas técnicas depende de la experiencia del personal, de los protocolos utilizados, del tipo y la calidad de

35

las muestras y del número de organismos presentes. En muchas ocasiones no es posible obtener muestras de LBA, por estar contraindicado realizar una broncoscopia por la situación clínica de los pacientes, por problemas técnicos, por tratarse de recién nacidos o por negativa de los propios pacientes. Por este motivo se han desarrollado técnicas de PCR para aumentar la sensibilidad y poder aplicarse tanto en muestras invasivas como en muestras no invasivas. Sin embargo, con las técnicas de PCR actualmente disponibles no se ha resuelto completamente el problema pues su sensibilidad aplicada a muestras no invasivas, como los enjuagues orofaríngeos o aspirados nasales, es mucho menor que cuando se utilizan en muestras de LBA. En este contexto, en los últimos 20-30 años se han publicado muchos trabajos donde se han diseñado diferentes protocolos de PCR y PCR a tiempo real (se han utilizado alrededor de 14 genes con fines diagnósticos) con el objetivo de mejorar la detección de este patógeno. De entre estos métodos cabría destacar los siguientes:

- [Wakefield et al., 1990]: Protocolo de PCR con amplificación de parte del gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad mayor mitocondrial de *Pneumocystis* (mtLSUrRNA), mediante PCR anidada, usando en una primera ronda de PCR la pareja de cebadores pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3') (SEQ ID NO: 3) y pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3') (SEQ ID NO: 4), y usando en una segunda ronda de PCR la pareja de cebadores pAZ102-X (5'-GGG AAT TCG TGA AAT ACA AAT CGG ACT AGG-3') (SEQ ID NO: 5) y pAZ102-Y (5'-GGG AAT TCT CAC TTA ATA TTA ATT GGG GAG C-3') (SEQ ID NO: 6) que son internos al primer conjunto de cebadores y específicos para *P. jirovecii* (Wakefield, 1996).
- [Linssen et al., 2006]: Protocolo de qPCR con amplificación de parte de los genes que codifican Msg (Major surface glycoprotein), mediante PCR de una sola ronda con los cebadores PCP For (5'-CAA AAA TAA CAY TSA CAT CAA CRA GG- 3 ') (SEQ ID NO: 7) y PCP Rev (5'-AAA TCA TGA ACG AAA TAA CCA TTG C-3') (SEQ ID NO: 8) y detección con la sonda PCP Probe FAM-TGC AAA CCA ACC AAG TGT ACG ACA GG-TAMRA (SEQ ID NO: 9), o alternativamente con los cebadores JKK114/15-F (5'-GAA TGC AAA TCY TTA CAG ACA ACA- 3 ') (SEQ ID NO: 10) y JKK17-R (5'-AAA TCA TGA ACG AAA TAA CCA TTG C- 3') (SEQ ID NO: 11) y detección con las sondas PC MSG FRET1U-P1 (CAA AAA TAA CAY TSA CAT CAA CRA GGC) (SEQ ID NO: 12) y PC MSG FRET1D-P2 (TGC AAA CCA ACC AAG TGT ACG ACA GG) (SEQ ID NO: 13).

- [Chabé et al., 2014]: Protocolo de PCR con amplificación de parte del gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad mayor mitocondrial de *Pneumocystis* (mtLSUrRNA), mediante PCR de una sola ronda con un nuevo cebador directo (pH207, 5'-ACA AAT CGG ACT AGG ATA TAG CTG GT-3') (SEQ ID NO: 14) y usando el cebador inverso pAZ102-E de Wakefield et al., 1990.
- [Rudramurthy et al., 2018]: Protocolo de qPCR con amplificación de parte del gen que codifica *Msg*, mediante PCR de una sola ronda con los cebadores descritos en Linssen et al., 2006 MSG-For (5'-CAA AAA TAA CAY TSA CAT CAA CRA GG-3 ') (SEQ ID NO: 7) y MSG-Rev (5'-AAA TCA TGA ACG AAA TAA CCA TTG C-3') (SEQ ID NO: 8). El producto amplificado se detecta con SYBR Green I (Roche Diagnostics).

Sin embargo, a día de hoy el método más comúnmente aceptado para detectar el ADN de *Pneumocystis* en muestras respiratorias de mamíferos sigue siendo la amplificación de parte del gen que codifica mtLSUrRNA, mediante PCR anidada (Wakefield et al., 1990). Las desventajas de esta PCR anidada son que requiere mucho tiempo, alrededor de las 8-10h para poder obtener un resultado fiable, y que debido a las dos rondas de amplificación y a la apertura de los tubos entre rondas, el resultado está expuesto a un riesgo considerable de contaminación y por lo tanto aumenta el riesgo de falsos positivos. Además, Chabé et al., 2014, encontraron que los dos cebadores pAZ102-H y pAZ102-E, tenían una diferencia de  $T_m > 5^\circ \text{C}$  y seis posiciones polimórficas entre el cebador interno pAZ102-Y y *P. carinii* y otras secuencias de mtLSUrDNA de *P. murina* que podrían tener un impacto negativo sustancial en la explotación de secuencias de mtLSUrDNA de *Pneumocystis* para estudios de genotipado o filogenéticos. Por todas estas razones, desarrollaron una PCR de una sola ronda, en este caso con un nuevo cebador directo (pH207) y conservaron el cebador inverso pAZ102-E de Wakefield et al., 1990, Sin embargo, en esta nueva PCR, se observa un producto no específico de tamaño similar al esperado con esta nueva PCR en muestras de ADN de pulmón sin *Pneumocystis* (Chabé et al., 2014), por ello no resulta tampoco muy fiable el resultado. Por su parte, los métodos descritos en Linssen *et al* y Rudramurthy *et al* tampoco resuelven estos problemas ya que, comparándolo con nuestro método aquí descrito, su sensibilidad aplicada a las muestras invasivas y no invasivas es mucho menor y en el caso de Linssen *et al* que requiere el uso de sondas marcadas con un fluoróforo, lo que supone un coste adicional en el análisis de cada muestra. Por este motivo, existe el riesgo de obtener falsos negativos al usar los métodos de Linssen *et al* o Rudramurthy *et al* en pruebas de detección del patógeno.

Por lo tanto, resulta necesario en vista del estado de la técnica ofrecer un método alternativo que permita mejorar la sensibilidad, cuantificar el número de copias del patógeno en muestras clínicas, y que resuelva problemas existentes en los métodos descritos en el estado de la técnica.

5

## COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En este contexto, los inventores proponen un nuevo protocolo para la detección de *Pneumocystis jirovecii* en una muestra basado en la amplificación por PCR de dos regiones de *Pneumocystis jirovecii*, una de ellas localizada en el genoma nuclear, en el extremo 3' de la familia de genes Msg-A, con el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTWG GY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y la otra localizada en el gen mitocondrial mtLSUrRNA, con el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCA GTGCT (SEQ ID NO: 16). Estos cebadores están dirigidos a secuencias conservadas en los genes que codifican para Msg-A o mtLSUrRNA y en el caso de la pareja Msg-A contienen cada uno de los dos cebadores tres posiciones degeneradas de tal manera que se aumenta el anillamiento en posiciones donde puede haber polimorfismo entre secuencias, permitiendo así la detección en la muestra de distintas variantes del microorganismo. Además, ambas parejas de cebadores amplifican una región de tamaño similar, aunque el porcentaje de bases GC es de un 51% para la región Msg-A y un 36% para la región mtLSUrRNA a diferencia del procedimiento convencional de uso habitual de la comunidad científica basado en el uso de sondas marcadas con diferentes fluoróforos para la detección.

25

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para detectar *Pneumocystis jirovecii* en una muestra, donde el método comprende:

- i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID

35

NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y

ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de una infección por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente, donde el método comprende:

i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de una muestra del paciente de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y

ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i),

donde la detección de los productos de amplificación generados en la etapa (i) es indicativo de que el paciente sufre de una infección por *Pneumocystis jirovecii* y donde la falta de detección de los productos de amplificación generados en la etapa (i) es indicativo de que el paciente no sufre de una infección por *Pneumocystis jirovecii*.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para discriminar entre un estado de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente y un estado de infección que se corresponde clínicamente con una neumonía causada por *Pneumocystis* (PCP), donde el método comprende:

i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de una muestra del paciente de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y

una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y

ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i).

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un kit *Pneumocystis jirovecii*, en donde comprende una primera y una segunda pareja de cebadores en donde la primera pareja de cebadores es específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y comprende el cebador directo de secuencia 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso de secuencia 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la segunda pareja de cebadores es específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA y comprende el cebador directo de secuencia 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador reverso de secuencia 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16).

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del kit de la invención para detectar *Pneumocystis jirovecii* en una muestra. En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del kit de la invención para el diagnóstico de una infección por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente.

En un último aspecto, la invención se refiere a una composición de oligonucleótidos seleccionada del grupo formado por:

- a. una pareja de oligonucleótidos de secuencias 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-CAC TTC GTWGGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2),

- b. una pareja de cebadores de secuencias  
 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y  
 5'-CTCCCTCGAGATATTTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y
- c. Una combinación de las dos parejas de cebadores.

5

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

Tal y como se explica más arriba, los inventores proponen un nuevo protocolo para la detección de *Pneumocystis jirovecii* basado en el empleo de PCR para la amplificación de dos regiones de *Pneumocystis jirovecii*, una del extremo 3' de la familia de genes Msg-A en el genoma nuclear, con el cebador Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y la otra del gen mitocondrial mtLSUrRNA usando el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16). Estos cebadores están dirigidos a secuencias conservadas en los genes que codifican para Msg-A o mtLSUrRNA y contienen, en el caso de los cebadores utilizados para amplificar una región de las Msg-A, cada uno de ellos tres posiciones degeneradas de tal manera que se aumenta el anillamiento en posiciones donde puede haber polimorfismo entre secuencias, permitiendo así la detección en la muestra de distintas cepas o variantes del microorganismo que puedan presentar variaciones en las secuencias de los genes Msg-A.

### Métodos de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para detectar *Pneumocystis jirovecii* en una muestra, donde el método comprende:

- i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC

C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y

- 5 ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i).

En el contexto de la invención, el término *Pneumocystis jirovecii* (antiguamente conocido como *P. carinii sp. f. hominis*) se refiere a la especie de hongo ascomicete del género *Pneumocystis* que parasita el sistema respiratorio del ser humano. *Pneumocystis jirovecii* es un hongo  
10 atípico con estenoxenismo y tropismo pulmonar que no se puede cultivar, lo que dificulta tanto su estudio como las posibilidades de diagnóstico en la clínica.

En el contexto de la invención, la familia de genes Msg-A de *Pneumocystis jirovecii* se refiere a la familia A de glicoproteínas de superficie principales (Major Surface Glycoprotein).  
15 Recientemente, se han descrito los ensamblajes completos del genoma de tres especies de *Pneumocystis* que infectan a humano (*P. jirovecii*), rata (*P. carinii*) y ratón (*P. murina*) (Ma et al., 2016). Los datos de secuenciación obtenidos por Ma et al., 2016, demostraron que los dominios más significativamente enriquecidos en *P. jirovecii* y *P. carinii* son las grandes familias de genes multicopia que codifican las principales glucoproteínas de superficie (Msg),  
20 que se comparten entre las especies de *Pneumocystis* pero están ausentes en todas las demás especies de hongos secuenciadas. Los genes Msg representan aproximadamente el 3–6% (encontrando de 64 a 179 genes únicos por especie) de un genoma altamente reducido, lo que sugiere que son las proteínas de *Pneumocystis* más expresadas y juegan un papel esencial en la supervivencia del organismo evadiendo el sistema inmunitario del huésped a  
25 través de la variación antigénica. Según la similitud de secuencia, las proteínas Msg se clasifican en cinco familias: Msg-A, -B, -C, -D y -E (Ma et al., 2016), donde Msg-A es con diferencia la familia más grande.

En la presente invención, se entiende por “ácido nucleico” a la repetición de monómeros  
30 llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos de ácidos nucleicos: ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Adicionalmente, de forma artificial, a partir de ARN se puede obtener ADN complementario (ADNc) que también se considera un ácido nucleico. Por tanto, en la presente invención, se entiende por “preparación de ácidos nucleicos” al conjunto de ácidos nucleicos, es decir, ADN y/o ADNc  
35 procedente de la retrotranscripción del ARN presentes en una preparación que va a ser sometida a una reacción de amplificación. En la presente invención se entiende por “ADN” al

material genético de los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo o en las mitocondrias de las células. En la presente invención se entiende por “ARN” a la molécula resultado de la transcripción de una secuencia de ADN. En la presente invención, se entiende por “ADNc” al ADN obtenido a partir del ARNm por acción de la retrotranscriptasa inversa.

El ácido nucleico de la invención puede contener una o más modificaciones en las nucleobases, en los azúcares y/o en los enlaces entre nucleótidos.

Las modificaciones a uno o más residuos del esqueleto de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: modificaciones del azúcar en 2' tal como 2'-O-metil (2'-OMe), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-O-metoxietoxi, 2'-fluoro (2'-F), 2'-alil, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetil], 2'-O-(N-metilcarbamato); modificaciones del azúcar en 4' incluyendo 4'-tio, puente 4'-CH<sub>2</sub>-O-2', puente 4-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'; ácido nucleico cerrado (LNA, locked nucleic acid); ácido péptido nucleico (APN); ácido nucleico intercalante (INA); ácido nucleico intercalante enrollado (TINA); ácidos nucleicos de hexitol (HNA); ácido arabinonucleico (ANA); ácidos ciclohexano nucleicos (CNA); ácido ciclohexenilnucleico (CeNA); ácido treosil nucleico (TNA); oligonucleótidos morfolinos; Gap-meros; Mix-meros; incorporación de péptidos ricos en arginina; adición de 5'-fosfato a ARN sintéticos; o cualquier combinación de los mismos.

Las modificaciones a uno o más enlaces de nucleósidos de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: fosforotioato, fosforamidato, fosforodiamidato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato y fosforanilidato, o cualquier combinación de los mismos.

Un ácido nucleico cerrado (LNA), con frecuencia denominado ARN inaccesible, es un nucleótido de ARN modificado. El grupo ribosa de un nucleótido LNA se modifica con un puente extra que une los carbonos 2' y 4' (puente O2',C4'-metileno). El puente “cierra” la ribosa en la conformación estructural 3'-endo, que con frecuencia se encuentra en la forma A del ADN o ARN. Los nucleótidos LNA se pueden mezclar con bases de ADN o ARN en el ácido nucleico cuando se desee. Tales oligómeros están comercialmente disponibles. La conformación cerrada de la ribosa aumenta el apilamiento de bases y pre-organización del esqueleto. Esto aumenta significativamente la estabilidad térmica (temperatura de fusión) y la afinidad de hibridación de ácidos nucleicos modificados con LNA, además de tener capacidades mejoradas en la discriminación a malos emparejamientos. Estas propiedades los

hacen muy útiles para técnicas antisentido. Además, los oligonucleótidos LNA anti-miR se han probado en primates con resultados esperanzadores y baja toxicidad.

Un ácido péptido nucleico (APN) es un polímero artificialmente sintetizado similar a ADN o ARN y se usa en investigación biológica y tratamientos médicos. No se sabe que el APN se produzca de forma natural. EL ADN y ARN tienen un esqueleto de azúcar de desoxirribosa y ribosa, respectivamente, mientras que el esqueleto de APN está compuesto de unidades repetitivas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. Las diferentes bases de purina y pirimidina están unidas al esqueleto por enlaces metilen-carbonilo. Los APN se representan como péptidos, con el N-terminal en la primera posición (izquierda) y el C-terminal a la derecha. Puesto que el esqueleto del APN no contiene grupos fosfato cargados, la unión entre las hebras APN/ADN es más fuerte que entre las hebras ADN/ADN debido a la falta de repulsión electrostática. Las moléculas de bases mezcladas de APN son imitadores verdaderos de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. La unión APN/APN es más fuerte que la unión APN/ADN.

Un ácido nucleico intercalante (INA) es un análogo de ácido nucleico modificado que comprende desoxirribonucleótidos normales unidos covalentemente a inserciones hidrofóbicas. El INA tiene una gran afinidad por el ADN complementario con estabilización de hasta 11 grados para cada modificación. El INA tiene mayor especificidad por una diana completamente apareada sobre dianas mal apareadas que el ADN normal. Utilizando que los INA tienen mayor afinidad por ADN hace posible usar sondas más cortas y aumentar así la especificidad incluso más. Además, un INA es un análogo oligonucleotídico selectivo de ADN, con una capacidad única para discriminar entre ADN y ARN. Incluso aunque los INA tienen altas afinidades para ADN complementario, tiene una menor afinidad por una secuencia complementaria de INA complementarios. Los ácidos nucleicos intercalantes enrollados se denominan TINA.

Los ácidos nucleicos de hexitol (HNA) son nucleótidos contruidos de nucleobases naturales y un esqueleto 1,5-anhidrohexitol fosforilado. Las asociaciones moleculares entre HNA y ARN son más estables que entre HNA y ADN y entre ácidos nucleicos naturales (ADNbc, ARNbc, ADN/ARN). Otros oligonucleótidos sintéticamente modificados comprenden ANA (ácido arabinonucleico), CNA (ácidos ciclohexano nucleicos), CeNA (ácido ciclohexilnucleico) y TNA (ácido treosilnucleico).

35

Los morfolinos son moléculas sintéticas que son el producto de un rediseño de la estructura natural del ácido nucleico. Estructuralmente, la diferencia entre morfolinos y ADN o ARN es que mientras los morfolinos tienen nucleobases estándar, esas bases están unidas a anillos de 6 miembros de morfolina en lugar de a anillos de desoxirribosa/ribosa y los enlaces fosforodiamidato no iónicos entre las subunidades reemplazan los enlaces fosfodiéster aniónicos. Los morfolinos se denominan algunas veces PMO (oligonucleótido fosforodiamidato de morfolino). El anillo de morfolina de 6 miembros tiene la fórmula química  $O-(CH_2-CH_2)_2-NH$ .

Los gapmeros son sondas oligonucleotídicas quiméricas de ARN-ADN-ARN, donde se insertan ventanas o 'huecos' ('gaps') de ADN en un oligonucleótido de ARN de otra manera normal o modificado. Esta modificación aumenta la estabilidad del oligonucleótido in vivo y la avidez de la interacción de la sonda con la diana, de modo que se pueden usar sondas más cortas de forma eficaz.

Como entiende el experto en la materia, la detección de *Pneumocystis jirovecii* a partir del ARN implica la existencia de células viables de *Pneumocystis jirovecii* en la muestra analizada. Por tanto, la puesta en práctica del método de la invención permitiría no sólo detectar *Pneumocystis jirovecii* (si la muestra de partida es una preparación de ADN genómico), sino también detectar exclusivamente células viables de *Pneumocystis jirovecii* presentes en la muestra analizada (si la muestra de partida es una preparación de ADNc obtenida a partir de una preparación ARN de *Pneumocystis jirovecii*). El método de la invención requiere la extracción del ácido nucleico de una muestra. Las distintas técnicas de la extracción de ácidos nucleicos son ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.*, 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3). Adicionalmente, existen kits de extracción de ácidos nucleicos comercialmente disponibles para realizar dicha extracción.

El método de la invención comprende una reacción de amplificación de dos regiones a partir de una preparación de ácidos nucleicos. Como entiende el experto en la materia, una reacción de amplificación consiste, básicamente, en la multiplicación exponencial de una molécula de ADN diana (o de una región diana de una molécula de ADN) mediante el empleo de oligonucleótidos que hibridan con las regiones que flanquean la región diana que se quiere amplificar. Además, la reacción de amplificación de las dos regiones a partir de una preparación de ácidos nucleicos se puede hacer de modo simultáneo, donde las dos regiones son amplificadas a la vez con dos parejas de cebadores específicos, uno para cada región, o

de modo secuencial donde se amplifica cualquier una de las dos regiones primero y después se amplifica la siguiente región aun no amplificada. Así, en un modo de realización particular de la invención, la reacción de amplificación amplifica las dos regiones de modo simultáneo o de modo secuencial. En una forma preferida de realización, en el caso de que la detección se lleve a cabo de forma consecutiva, es posible amplificar en primer lugar la región correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A de *Pneumocystis jirovecii* y, en segundo lugar, la región localizada en el gen mitocondrial mtLSUrRNA. En otra forma preferida de realización, en el caso de que la detección se lleve a cabo de forma consecutiva, es posible amplificar en primer lugar la región localizada en el gen mitocondrial mtLSUrRNA y, en segundo lugar, la región correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A de *Pneumocystis jirovecii*.

Las diferentes técnicas o procedimientos de llevar a cabo reacciones de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001. (*supra.*). Ejemplos de reacciones de amplificación son, sin limitarse a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y variaciones de la misma [amplificación regional de la reacción en cadena de la polimerasa (RA-PCR, del inglés Regional Amplification PCR), la reacción en cadena de la polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR del inglés Real Time PCR, etc.] El protocolo seguido para llevar a cabo una PCR es ampliamente conocido en el estado de la técnica y actualmente, existen kits comerciales que contienen los materiales necesarios para llevar a cabo dicha amplificación. Asimismo, las condiciones de temperatura, tiempo, concentraciones de reactivos y número de ciclos de la PCR dependerán de la ADN polimerasa utilizada en la reacción de amplificación, de la especificidad de los cebadores, etc. Si se emplea un kit comercial, las condiciones de la reacción serán las especificadas por el fabricante del kit. Así, en un modo de realización particular de la invención, la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a Tiempo Real. Una reacción de PCR a Tiempo Real es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia, basándose dicha detección en la utilización de unas moléculas específicas.

Como entiende el experto en la materia, una reacción de amplificación requiere el empleo de una pareja de oligonucleótidos, denominados cebadores, que van a hibridar con la región/secuencia diana que se quiere amplificar. En el caso concreto del presente método, las regiones diana a amplificar son, una de ellas localizada en el genoma nuclear, en el extremo 3' de la familia de genes Msg-A, con el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC

CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y la otra localizada en el gen mitocondrial mtLSUrRNA, con el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16). La base indicada con el símbolo A se refiere a adenina. La base indicada con el símbolo G se refiere a guanina. La base indicada con el símbolo C se refiere a citosina. La base indicada con el símbolo T se refiere a timina. La base indicada con el símbolo U se refiere a uracilo. La base indicada con el símbolo R se refiere a guanina (G) o a adenina (A), es decir, se refiere a una purina. La base indicada con el símbolo Y se refiere a timina (T)/ uracilo (U) o a citosina (C), es decir, se refiere a una pirimidina. La base indicada con el símbolo W se refiere a adenina (A) o a timina (T)/ uracilo (U), es decir, se refiere a bases que establecen interacciones débiles por 2 puentes de hidrógeno. La base indicada con el símbolo S se refiere a guanina (G) o a citosina (C), es decir, se refiere a bases que establecen interacciones fuertes por 3 puentes de hidrógeno.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la degeneración de secuencia indicada por los símbolos R, e Y, la secuencia GACRACAGACACRTGGGTYAC (SEQ ID NO: 1) engloba las siguientes secuencias:

- GACGACAGACACGTGGGTCAC (SEQ ID NO: 17);
- GACGACAGACACGTGGGTTAC (SEQ ID NO: 18);
- GACGACAGACACATGGGTCAC (SEQ ID NO: 19);
- GACGACAGACACATGGGTTAC (SEQ ID NO: 20);
- GACAACAGACACGTGGGTCAC (SEQ ID NO: 21);
- GACAACAGACACGTGGGTTAC (SEQ ID NO: 22);
- GACAACAGACACATGGGTCAC (SEQ ID NO: 23);
- GACAACAGACACATGGGTTAC (SEQ ID NO: 24).

De igual manera, teniendo en cuenta la degeneración de secuencia indicada por los símbolos R, Y y W, la secuencia CACTTCGTWGGYTTRCACCGCC (SEQ ID NO: 2) engloba las siguientes secuencias:

- CACTTCGTAGGTTTGCACCGCC (SEQ ID NO: 25);
- CACTTCGTAGGTTTACACCGCC (SEQ ID NO: 26);
- CACTTCGTAGGCTTGCACCGCC (SEQ ID NO: 27);
- CACTTCGTAGGCTTACACCGCC (SEQ ID NO: 28);
- CACTTCGTTGGTTTGCACCGCC (SEQ ID NO: 29);
- CACTTCGTTGGTTTACACCGCC (SEQ ID NO: 30);
- CACTTCGTTGGCTTGCACCGCC (SEQ ID NO: 31);

– CACTTCGTTGGCTTACACCGCC (SEQ ID NO: 32).

En el contexto de la presente invención, los parámetros de ciclado comprenden una incubación a 90-100°C por 5-10 minutos; 20-50 ciclos de 90-100°C por 5-20 segundos, 55-60°C por 5-20 segundos y 70-75°C por 5-10 segundos y por último una extensión final de 70-75°C por 3-10 minutos. En un modo de realización particular de la invención, los parámetros de ciclado para la reacción de amplificación comprenden una incubación a 95°C por 10 minutos; 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, 58°C por 10 segundos y 72°C por 10 segundos y por último una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Una vez llevada a cabo la reacción de amplificación es necesario detectar los productos de amplificación o amplicones. Nuevamente, las técnicas para detectar los productos de amplificación están ampliamente descritos en el estado de la técnica, como por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001 (citado *at supra*). En dicha detección puede emplearse cualquiera de los procedimientos de identificación de fragmentos de amplificación conocidos del estado de la técnica, tales como hibridación con sondas marcadas (por ejemplo, con un fluoróforo), o tinción con moléculas de tinción de ácidos nucleicos, como por ejemplo, tinción de plata, tinción con agentes intercalantes (i.e., bromuro de etidio, SYBR Green®, etc.). Como es conocido del estado de la técnica, si el método de amplificación elegido es una PCR a tiempo real, la detección del producto de amplificación se realiza simultáneamente a la reacción de amplificación. Para ello, pueden emplearse tanto mecanismos de detección no específicos como específicos. Los mecanismos de detección no específicos detectan todos los ADN de doble cadena producidos durante la reacción de amplificación (ya sea un producto específico, un producto inespecífico o dímeros de cebadores). Este mecanismo es el método estándar y básicamente consiste en añadir un agente intercalante de la doble cadena o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a esta. Agentes adecuados para este propósito incluyen SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, SYBR Green I, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTO 16, SYTOX, SYTO BC, DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, PicoGreen, y cualquier combinación de los mismos. Así, en una realización particular, la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante una molécula de tinción de ácidos nucleicos, preferiblemente un agente fluorescente. En un modo de realización particular, la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante un agente intercalante. En un modo de realización todavía más particular, la molécula de tinción de ácidos nucleicos es SYBR™ Green I [N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ium-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina], con número CAS 163795-75-3. Una de las ventajas de usar SYBR™ Green I para la detección del producto

amplificado frente al uso de sondas específicas de secuencia es que, además de evitar el coste de síntesis de la sonda, la detección no se ve afectada por alguna heterogeneidad de secuencia en la región donde anillara la sonda.

5 En el contexto de la presente invención, se considera que se detecta el producto de amplificación en PCR a tiempo real cuando el valor de intensidad de la señal (por ejemplo, el valor de intensidad de fluorescencia) supera el valor umbral de intensidad de la señal (por ejemplo, el valor umbral de fluorescencia). El punto donde el valor de intensidad de la señal correspondiente a la muestra cruza el valor umbral se llama ciclo umbral (Ct por su nombre  
10 en inglés, "threshold cycle"). Es decir, el ciclo umbral, también conocido como Cp ("Crossing point") o Ct ("Threshold point") es el punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal (umbral o "threshold"), y se considera como el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo. El ciclo umbral es inversamente proporcional al número de copias de la diana a detectar, es decir, a mayor concentración de la diana a  
15 detectar, menor será el valor del ciclo umbral. En el caso de utilizar una misma muestra de partida que tenga la misma concentración de la diana a detectar, el valor de Ct se puede usar como medida para discriminar la sensibilidad de distintos métodos (o de distintas parejas de cebadores cuando el método es el mismo). En este caso, el método o la pareja de cebadores que proporcione los valores de Ct más bajos en PCR a tiempo real es más sensible.

20 En una forma de realización, los productos de amplificación detectados derivan de la amplificación de la región derivada del extremo 3' de la familia de genes Msg-A y de la región localizada en el gen mitocondrial mtLSUrRNA, de forma que la cantidad de producto detectado es la suma de las cantidades de cada uno de los productos obtenidos con cada pareja de  
25 cebadores. En otra forma de realización, los productos de amplificación detectados derivan de la amplificación de la región derivada del extremo 3' de la familia de genes Msg-A o de la región localizada en el gen mitocondrial mtLSUrRNA, En una forma preferida de realización, cuando la muestra contiene una cantidad reducida de patógenos, la detección se basa en la detección de la región derivada del extremo 3' de la familia de genes Msg-A.

30 En el contexto de la presente invención, la preparación de ácidos nucleicos se deriva de una muestra de un paciente. El término "muestra" o "muestra biológica" significa material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para determinar la presencia de *Pneumocystis jirovecii*. La muestra se puede aislar  
35 de cualquier tejido o líquido biológico adecuado. En un modo de realización, la muestra es una muestra clínica seleccionada de entre esputo, lavados orofaríngeos, aspirados nasales,

lavados broncoalveolares, tejidos de biopsias o autopsias, sangre, líquido pleural y líquido amniótico. En un modo particular de realización, la muestra es una muestra clínica no invasiva seleccionada de entre esputo, aspirados nasales, frotis faríngeos y lavado orofaríngeo.

5 En el contexto de la presente invención, el término “paciente” o “sujeto” se refiere a un ser humano de cualquier edad o raza. En una forma de realización particular, el paciente es un paciente inmunodeprimido. En un modo de realización particular, el paciente inmunodeprimido es un paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o un paciente inmunodeprimido por otras causas (trasplantes, quimioterapia, enfermedades autoinmunes, etc.). En otro modo de realización, el paciente es un sujeto que sufre de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En un modo de realización adicional, el paciente es un neonato que sufre de síndrome de distrés respiratorio.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de una infección por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente, donde el método comprende:

- 15 i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de una muestra del paciente de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y
- 20 ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i), donde la detección de los producto de amplificación generados en la etapa (i) es indicativo de que el paciente sufre de una infección por *Pneumocystis jirovecii* y donde la falta de detección de los productos de amplificación generadso en la etapa (i) es indicativo de que el paciente no sufre de una infección por *Pneumocystis jirovecii*.

35

Como se usa en el presente documento, "método de diagnóstico" se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto padece una infección por *Pneumocystis jirovecii*. Como seguramente entenderá un experto en la materia, dicha evaluación puede no ser correcta para el 100% de los sujetos a diagnosticar, aunque preferiblemente lo sea. En un modo de realización particular, la evaluación es correcta para al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% de los sujetos a diagnosticar. En cualquier caso, el término requiere poder identificar una parte estadísticamente significativa de los sujetos que padecen dicha infección. El experto en la materia puede determinar si una parte es estadísticamente significativa utilizando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, mediante la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Información y detalles sobre dichas herramientas se pueden encontrar en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% al menos 95%. Los valores de p son preferiblemente 0,05, 0,025, 0,001 o menos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para discriminar entre un estado de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente y un estado de infección que se corresponde clínicamente con una neumonía causada por *Pneumocystis* (PCP), donde el método comprende:

- i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de una muestra del paciente de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTGAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y
- ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i).

La neumonía causada por *Pneumocystis* (PCP) es una infección pulmonar causada por *Pneumocystis jirovecii*. Es típicamente una infección oportunista que se manifiesta y progresa cuando el sistema inmune está muy deteriorado en pacientes inmunosuprimidos. Un ejemplo de esto son los pacientes que han estado infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o pacientes con enfermedades autoinmunes u oncológicas, cuyo manejo terapéutico se basa en tratamientos inmunosupresores como corticoides, anti-TNF y citostáticos.

En un modo de realización, la detección simultánea o secuencial de la familia de genes *Msg-A* de *Pneumocystis jirovecii* y el gen mitocondrial *mtLSUrRNA* en la muestra de dicho paciente, en presencia de síntomas clínicos de neumonía es indicativa de un estado de infección que se corresponde clínicamente con la neumonía causada por *Pneumocystis* (PCP) en el paciente, mientras que la detección de los genes *Msg-A* de *Pneumocystis jirovecii* en una muestra de dicho paciente por PCR, sin síntomas clínicos ni signos radiológicos de neumonía es indicativa de un estado de colonización o infección subclínica por *Pneumocystis jirovecii* en el paciente. Los síntomas clínicos de neumonía son conocidos por el experto en la materia y pueden incluir dolor en el pecho al respirar o toser; tos que puede producir flema; fatiga, fiebre, transpiración y escalofríos con temblor; náuseas, vómitos o diarrea; dificultad para respirar.

Todos los términos y modos de realización descritos en esta parte o en cualquier otra parte del presente documento son igualmente aplicables a cualquiera de los métodos de la invención.

#### Kit de la invención y usos del kit

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección de *Pneumocystis jirovecii* que comprende una primera y una segunda pareja de cebadores en donde la primera pareja de cebadores es específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes *Msg-A* y comprende el cebador directo de secuencia 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso de secuencia 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la segunda pareja de cebadores es específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia *mtLSUrRNA* y comprende el cebador directo de secuencia 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador reverso de secuencia 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16). En el contexto de la presente invención, el término "kit" se entiende como un producto o dispositivo que contiene los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos

de la invención embalados para permitir su transporte y almacenamiento. Los materiales adecuados para embalar los componentes del kit incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares. Además, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los diferentes componentes que están en el kit. Dichas instrucciones pueden estar en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de modo que puedan ser leídas por un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionan dichas instrucciones. Los reactivos para uso en los métodos de la invención se pueden formular como un “kit” y, por tanto, se pueden combinar con uno o más de otros tipos de elementos o componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, envases, paquetes tal como embalaje pretendido para venta comercial, sustratos a los que están unidos los reactivos, componentes de hardware electrónicos, etc.).

En un modo de realización particular, el kit comprende además una molécula de tinción de ácidos nucleicos. En un modo de realización preferido, la molécula de tinción de ácidos nucleicos es un agente intercalante. En otro modo de realización preferido, la molécula de tinción de ácidos nucleicos es SYBR™ Green I [N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ium-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina], con número CAS 163795-75-3.

La invención también se refiere al uso del kit de la invención para detectar *Pneumocystis jirovecii* en una muestra o para el diagnóstico de una infección por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente. El término “muestra” ya ha sido definido más arriba en relación con los métodos de la invención. En un modo de realización particular, la muestra es una muestra clínica seleccionada de entre esputo, lavados orofaríngeos, aspirados nasales, lavados broncoalveolares, tejidos de biopsias o autopsias, sangre, líquido pleural y líquido amniótico.

Por último, la invención se refiere a dos oligonucleótidos cuyas secuencias se seleccionan de entre la secuencia 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y la secuencia 5'-CAC TTC GTWG GY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y de entre la secuencia AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y la secuencia 5'-CTCCCTCGAGATATTCAAGTGCT (SEQ ID NO: 16).

Todos los términos y modos de realización descritos en esta parte o en cualquier otra parte del presente documento son igualmente aplicables a estos aspectos de la invención, el kit de la invención, los usos del kit y los oligonucleótidos de la invención.

- 5 Cabe señalar que, tal como se usa en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el”, “la” incluyen sus referentes plurales “unos”, “unas”, “los”, “las” a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, el término “comprende” también incluye como modo de realización particular un modo de realización en el que no están presentes elementos o componentes adicionales, es decir, incluye como un  
10 modo de realización el término “consiste en”.

## EJEMPLOS

- La invención se describirá por medio de los siguientes ejemplos que deben considerarse  
15 meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

### EJEMPLO 1. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Declaración de Ética

- 20 Este estudio fue aprobado por las comisiones de Ética del Área Metropolitana de Salud del Norte y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile en Santiago.

#### Muestras clínicas y protocolo de extracción de ADN.

- En este estudio, se utilizaron 73 muestras biológicas, entre las que se incluyeron 60 autopsias  
25 pulmonares de lactantes sanos fallecidos por muerte súbita, 7 aspirados nasales (AN), 3 LBA (lavado broncoalveolar) y 3 gárgaras. El ADN total se extrajo y purificó de acuerdo con el Método B (Ruiz-Ruiz et al., 2018). Las concentraciones de ADN se midieron usando el kit de ensayo de ADN de doble cadena Qubit (dsDNA) BR en un fluorómetro Qubit 4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

30

#### Detección por PCR anidada de *Pneumocystis jirovecii*

- El ADN de *Pneumocystis* se detectó primero mediante el procedimiento de PCR anidada (n-PCR) que amplifica parte del gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad grande mitocondrial (ARNm de mtLSUrRNA). (Wakefield et al., 1990). La primera ronda de n-PCR se  
35 realizó utilizando los cebadores pAZ102-E y pAZ102-H y 5 µl de preparación de ADN. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 94 ° C durante 5 min y 40 ciclos de

94 ° C durante 1.0 min, 55 ° C durante 1.0 min y 72 ° C durante 2.0 min. La segunda ronda de n-PCR se realizó utilizando los cebadores pAZ102-X y pAZ102-Y, que son internos al primer conjunto de cebadores y específicos para *P. jirovecii* (Wakefield, 1996) tomando 1 µl del producto de la primera ronda de PCR bajo las siguientes condiciones PCR: 94 ° C durante 5 min y 10 ciclos de 94 ° C durante 1.0 min, 56 ° C durante 1.0 min y 72 ° C durante 2.0 min durante y 94 ° C durante 1.0 min, 64 ° C durante 1.0 min y 72 ° C por 2.0 min por 30 ciclos. Los individuos se clasificaron como *Pneumocystis* positivo cuando se obtuvo la banda de 267 pb específica para ADN de *P. jirovecii* en la segunda ronda de la PCR anidada [Wakefield, 1996] y como *Pneumocystis* negativo si no se documentó ADN de *P. jirovecii*. Los controles positivos fueron ADN de tejido pulmonar de pacientes con PCP.

### Diseño de cebadores para PCR a tiempo real

Las dos nuevas parejas de cebadores, que aquí se presentan, la pareja Msg-A F, 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1), y Msg-A R, 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y la pareja Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16), están dirigidas a secuencias conservadas en los genes que codifican para Msg-A o para mtLSUrRNA.

La secuencia de nucleótidos del cebador Msg-A F, 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1), y el cebador Msg-A R, 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2), contienen tres posiciones degeneradas porque de esta forma, se aumenta el anillamiento en aquellas posiciones que hemos detectado que puede haber polimorfismo entre secuencias. En este caso, los cebadores anillan y amplifican tantas secuencias Msg "A" como les es posible. Además, esta pareja proporcionó los valores de Ct más bajos en PCR a tiempo real comparandola con otras dos parejas de cebadores diseñadas en la misma región y también evaluadas, por ello, la que aquí se presenta es la más sensible.

El porcentaje de bases GC es de un 51% para la región Msg-A y un 36% para la región mtLSUrRNA.

### PCR a tiempo real Msg-A

La PCR a tiempo real aquí desarrollada se ha optimizado en un sistema LightCycler® 480 (Roche Molecular Diagnostics) con SYBR™ Green I (Roche). En comparación con los protocolos basados en sondas específicas de secuencia, el uso de SYBR™ Green elimina el coste de las síntesis de las sondas, y es más fiable para la cuantificación en estos casos ya

que la detección no se ve afectada por la heterogeneidad de secuencia en las regiones abarcada por los cebadores ni por la región donde anilla la sonda. Algunos desajustes en estas regiones pueden llevar a perder algunas variantes de secuencia o incluso a falsos negativos cuando la detección se basa en sondas específicas de secuencia. Las condiciones de ciclado también se han optimizado e incluyen una incubación a 95 ° C por 10 min, y 45 ciclos de 95 ° C por 10 s, 58 ° C por 10 s y 72 ° C por 10 s (donde obtenemos las mediciones de fluorescencia para ambos productos de amplificación) y por último una extensión final de 72 ° C por 5 min.

El análisis de las curvas de fusión se realizó con el software proporcionado por la plataforma LightCycler que muestra la primera derivada de la intensidad de fluorescencia frente a la temperatura. La síntesis de los productos de ADN del tamaño esperado y similar entre ellos, se confirmó por el análisis de las curvas de fusión y por separación electroforética en un gel de agarosa al 2% y tinción con GelRed®. Para cada ejecución, el software LightCycler trazó la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos y proporcionó el valor del ciclo umbral (Ct) utilizando el método automático. Para verificar la especificidad del nuevo par de cebadores se evaluó con otros patógenos pulmonares como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* o *Cryptococcus neoformans*, especies comunes implicadas en otros síndromes pulmonares.

### **Comparación con los protocolos qPCR a tiempo real ya descritos para la detección de *Pneumocystis* (Chabé et al., 2014, Rudramurthy et al., 2018)**

Como se ha explicado anteriormente, es conocida la detección de *Pneumocystis* mediante PCR y PCR en tiempo real. Aquí se compara un nuevo protocolo de PCR cuantitativa a tiempo real que detecta de forma simultánea *Msg-A/mtLSUrRNA* en extracciones de ADN de tejido pulmonar, aspirados nasales, LBA o gárgaras infectadas con el desarrollado por Chabé et al., 2014, basado en una PCR de una sola ronda, con el cebador directo pH207 (5'-ACAAATCGGACTAGGATATAGCTGGT-3') y el cebador inverso conservado pAZ102-E de Wakefield et al., 1990, para usar también en una PCR en tiempo real y con el desarrollado por Rudramurthy et al., 2018, una PCR cuantitativa en tiempo real usando genes *Msg* (pares de cebadores descritos por Linssen et al 2006: F (5'-CAA AAA TAA CAY TSA CAT CAA CRA GG-3 ') y R (5'-AAA TCA TGA ACG AAA TAA CCATTG C-3')). Para este estudio de comparación se analizaron muestras positivas para *Pneumocystis*. La PCR en tiempo real se realizó en un sistema LightCycler® 480 (Roche Molecular Diagnostics) utilizando 10 µl de una mezcla de reacción que contenía 5 µl de LightCycler® FastStart DNA MASTER PLUS SYBR™ Green I (Roche), 2,4 o 1,8, µl de agua (dependiendo de si es amplificación múltiple o única),

0,3  $\mu$ M de cada cebador y 2  $\mu$ l de extracción de DNAt ( $\sim$ 10 ng de ADN/ $\mu$ l). Las condiciones de ciclado se realizaron de acuerdo con Rudramurthy et al., 2018. Las muestras de control en cada ejecución incluyeron ADNt de tejido pulmonar *Pneumocystis* negativo, agua en lugar de extracto de ADNt,. Cada muestra se analizó por duplicado. Las comparaciones estadísticas entre los dos métodos de PCR en tiempo real se realizaron mediante pruebas pareadas.

## EJEMPLO 2. RESULTADOS

Se evaluaron un total de 73 muestras, entre las que hay autopsias de tejido pulmonar de lactantes, aspirados nasales, LBA y gárgaras por PCR anidada (mtLSUrRNA) y con el nuevo protocolo de PCR a tiempo real aquí desarrollado (Msg-A/ mtLSUrRNA). 51/73 (70.4%) de las muestras fueron positivas por ambos métodos de PCR. Sin embargo, es importante considerar que cuatro autopsias pulmonares positivas, fueron negativas en la primera ronda y positivas en la segunda ronda de PCR anidada (los pacientes con número 22, 24, 30 y 35). Tres muestras de aspirados nasales fueron negativas para las dos rondas de PCR anidada (501, 502 y 113) y positivas para la PCR a tiempo real Msg-A/mtLSUrRNA, observándose solo la curva de fusión de la región Msg-A con un valor de Ct alto, pudiendo indicar niveles muy bajos del patógeno y que en este tipo de muestras no invasivas es importante disponer de métodos muy sensibles, así como también la presencia de variabilidad en la región que anillarían los cebadores en el gen mtLSUrRNA. También en algunos pacientes el resultado positivo fue una banda muy débil en la primera ronda de n-PCR. En cuanto a la nueva PCR a tiempo real, la primera derivada de la curva de fusión proporcionada por el software LightCycler mostró un pico único para cada una de las regiones amplificadas, con una temperatura de fusión ( $T_m$ ) entre 81.00 y 83.00  $^{\circ}$ C para Msg-A y una  $T_m$  entre 74.00 y 75.00 para mtLSUrRNA. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y en todos los casos se observó una sola banda del tamaño esperado, puesto que ambas regiones amplificadas tienen un tamaño similar (solo en muestras infectadas con *Pneumocystis*).

Por otro lado, para verificar la especificidad de la diana, además las nuevas parejas de cebadores se evaluaron mediante PCR a tiempo real con otros patógenos pulmonares como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* o *Cryptococcus neoformans*, no obteniendo en ningún caso amplificado o curva de melting.

Como se ha discutido brevemente en la introducción, se han publicado muchos trabajos en los que se han diseñado protocolos basados en PCR o PCR a tiempo real para mejorar la

detección de *Pneumocystis*. Por ello, hemos comparado nuestro nuevo protocolo de PCR cuantitativa a tiempo real con el desarrollado por Chabé et al., 2014, consistente en una PCR de una sola ronda, diseñada para detectar el gen multicopia mtLSUrRNA, con un cebador directo pH207 (5'-ACAAATCGGACTAGGATATAGCTGGT-3') y el cebador reverso conservado pAZ102-E descrito por Wakefield et al., 1990, recomendado para PCR a tiempo real y con el protocolo desarrollado por Rudramurthy et al., 2018, consistente en una PCR cuantitativa a tiempo real basada en la detección de genes Msg, utilizando los pares de cebadores descritos por Linssen et al., 2006, F (5'-CAA AAA TAA CAY TSA CAT CAA CRA GG- 3 ') y R (5'-AAA TCA TGA ACG AAA TAA CCATTG C-3') que ayudarían a diferenciar la neumonía de la colonización por *P. jirovecii*. Para este estudio de comparación, se analizaron todas las muestras *Pneumocystis* positiva. Los resultados obtenidos para las tres diferentes PCR a tiempo real confirmaron la presencia de ADN específico de *P. jirovecii*, pero, para la sensibilidad, los resultados mostraron una diferencia cuantitativa significativa. Los valores de Ct fueron significativamente más bajos para las muestras amplificadas con la nueva PCR Msg-A/mtLSUrRNA a tiempo real (ver tabla 1 con una representación de muestras) en comparación con las amplificadas con las desarrolladas por Chabé et al., 2014 (mtLSUrRNA)  $33,75 \pm 2,7$  vs  $39,97 \pm 0$ , p value  $<0.05$ ) o comparado con los amplificados con el desarrollado por Rudramurthy et al., 2018 (Msg)) ( $33,75 \pm 2,7$  vs  $39,18 \pm 3,1$ , p value  $<0.05$ ), demostrando que nuestro nuevo protocolo de PCR Msg-A/mtLSUrRNA a tiempo real mostró la mayor sensibilidad para detectar simultáneamente la familia de genes Msg-A (genoma nuclear) y el gen multicopia mtLSUrRNA (genoma mitocondrial) de *P. jirovecii* (ver Tabla 1). Por otro lado, la comparación de cada una de las parejas de cebadores Msg-A/mtLSUrRNA por separado, también obtuvo valores de Ct más bajos que los obtenidos con el protocolo de Chabé et al., 2014 (mtLSUrRNA) o Rudramurthy et al., 2018 (Msg), demostrando una mejor optimización en el diseño de estos cebadores nuevos.

|             | Media Ct $\pm$ SD        |                    |                                   |
|-------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| MUESTRA     | Rudramurthy et al., 2017 | Chabé et al., 2014 | New real-time PCR Msg-A/mtLSUrRNA |
| G 05v4      | NEG                      | NEG                | 39.6 $\pm$ 0.3                    |
| G 04v5      | >40.0 $\pm$ 0            | NEG                | 34.8 $\pm$ 0.5                    |
| G 02v5      | NEG                      | NEG                | 40.0 $\pm$ 0.0                    |
| NA 113      | >40.0 $\pm$ 0            | NEG                | 35.9 $\pm$ 0.3                    |
| NA 119      | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 29.7 $\pm$ 0.1                    |
| NA 143      | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 34.9 $\pm$ 0.5                    |
| NA 501      | NEG                      | NEG                | 40.0 $\pm$ 0.0                    |
| NA502       | NEG                      | NEG                | 40.0 $\pm$ 0.0                    |
| NA 150      | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 27.8 $\pm$ 0.2                    |
| NA 102      | NEG                      | NEG                | NEG                               |
| BAL FQ773   | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 34.3 $\pm$ 0.5                    |
| BAL 953     | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 35.9 $\pm$ 0.4                    |
| BAL C965    | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 33.1 $\pm$ 0.3                    |
| LUNG 1650-4 | NEG                      | NEG                | 40.0 $\pm$ 0.0                    |
| LUNG 1783-4 | >40.0 $\pm$ 0            | NEG                | 38.4 $\pm$ 0.5                    |
| LUNG 895-4  | >40.0 $\pm$ 0            | NEG                | 38.8 $\pm$ 0.6                    |
| LUNG 2604-4 | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 31.4 $\pm$ 0.2                    |
| LUNG 73B    | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 32.3 $\pm$ 0.2                    |
| LUNG 65B    | 33.2 $\pm$ 0.7           | >40.0 $\pm$ 0      | 25.7 $\pm$ 0.4                    |
| LUNG 19     | 36.7 $\pm$ 0.4           | >40.0 $\pm$ 0      | 26.3 $\pm$ 0.3                    |
| LUNG 23     | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 33.7 $\pm$ 0.5                    |
| LUNG 27     | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 30.3 $\pm$ 0.2                    |
| LUNG 42     | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 32.7 $\pm$ 0.3                    |
| LUNG 51     | >40.0 $\pm$ 0            | >40.0 $\pm$ 0      | 33.2 $\pm$ 04                     |

Tabla 1 – Comparación de protocolos de PCR

## BIBLIOGRAFÍA

- 5 Chabé M., Khalife S., Gantois N., Even G., and Audebert C. An improved single-round PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Pneumocystis* spp., *Medical Mycology*, 2014, 52, 841–846, doi: 10.1093/mmy/myu032
- 10 Linssen CFM, Jacobs JA, Beckers, P, Templeton KE, Bakkers J, Kuijper, EJ, Melchers WJG, Drent M, and Vink C, Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in bronchoalveolar lavage fluid samples, *Journal of Medical Microbiology* (2006), 55, 1229–1235 DOI 10.1099/jmm.0.46552-0

Ma, L., Chen, Z., Huang, D. W., Kutty, G., Ishihara, M., Wang, H., Kovacs, J. A. (2016). Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. Nature Communications. <https://doi.org/10.1038/ncomms10740>

5

Rudramurthy, S. M., Sharma, M., Sharma, M., Rawat, P., Ghosh, A., V, L., Chakrabarti, A. (2017). Reliable differentiation of *Pneumocystis pneumonia* from *Pneumocystis* colonization by quantification of Major Surface Glycoprotein gene using real-time polymerase chain reaction. Mycoses. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

10

Wakefield, A., Pixley, F., Banerji, S., Sinclair, K., Moxon, E., Miller, R., & Hopkin, J. (1990). Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. The Lancet Medical Science, 336.

Wakefield AE., DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora., J Clin Microbiol. 1996 Jul;34(7):1754-9.

15

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar *Pneumocystis jirovecii* en una muestra, donde el método comprende:

- 5           i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, , empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT-3' (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT-3' (SEQ ID NO: 16) y
- 20           ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i).

2. Un método *in vitro* para el diagnóstico de una infección por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente, donde el método comprende:

- 25           i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de una muestra del paciente de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la
- 30           región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el
- 35

cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y  
el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y

ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i),

donde la detección de los productos de amplificación generados en la etapa (i) es  
indicativo de que el paciente sufre de una infección por *Pneumocystis jirovecii* y donde  
la falta de detección de los productos de amplificación generados en la etapa (i) es  
indicativo de que el paciente no sufre de una infección por *Pneumocystis jirovecii*.

3. Un método *in vitro* para discriminar entre un estado de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente y un estado de infección que se corresponde clínicamente con una neumonía causada por *Pneumocystis* (PCP), donde el método comprende:

- i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de una muestra del paciente de una primera región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y una segunda región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii*, empleando para ello una pareja de cebadores específicos para cada región capaces de amplificar ambas regiones en donde la pareja de cebadores específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A comprende el cebador directo Msg-A F 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso Msg-A R 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la pareja de cebadores específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA comprende el cebador Mls F 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador Mls R 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y
- ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i).

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde

- la detección de la familia de genes Msg-A y del gen multicopia mitocondrial mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii* en la muestra de dicho paciente, en presencia de síntomas clínicos de neumonía es indicativa de un estado de infección que se corresponde clínicamente con la neumonía causada por *Pneumocystis* (PCP) en el paciente, y donde
- la detección de la familia de genes Msg-A y del gen multicopia mitocondrial mtLSUrRNA de *Pneumocystis jirovecii* en una muestra de dicho paciente, sin

síntomas clínicos de neumonía es indicativa de un estado de colonización o infección subclínica por *Pneumocystis jirovecii* en el paciente.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la muestra es una muestra clínica seleccionada de entre esputo, lavados orofaríngeos, aspirados nasales, frotis faríngeos, lavados broncoalveolares, tejidos de biopsias o autopsias, sangre, líquido pleural y líquido amniótico.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la reacción de amplificación amplifica ambas regiones de modo simultáneo en una sola ronda.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde los parámetros de ciclado comprenden una incubación a 95°C por 10 minutos; 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, 58°C por 10 segundos y 72°C por 10 segundos y por último una extensión final de 72°C por 5 minutos.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el producto de la amplificación se detecta mediante una molécula de tinción de ácidos nucleicos.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde la molécula de tinción de ácidos nucleicos es un fluoróforo intercalante.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde el fluoróforo intercalante se selecciona del grupo que consiste en SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, SYBR Green I, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTO 16, SYTOX, SYTO BC, DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, PicoGreen y combinaciones de los mismos.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde el fluoróforo intercalante es SYBR™ Green I [N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ium-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina], con número CAS 163795-75-3.

13. Un kit para la detección de *Pneumocystis jirovecii* que comprende una primera y una segunda pareja de cebadores en donde la primera pareja de cebadores es específica para la región del genoma nuclear correspondiente al extremo 3' de la familia de genes Msg-A y comprende el cebador directo de secuencia 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador reverso de secuencia 5'-CAC TTC GTW GGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2) y en donde la segunda pareja de cebadores es específica para la región localizada en el gen mitocondrial multicopia mtLSUrRNA y comprende el cebador directo de secuencia 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y el cebador reverso de secuencia 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16).

14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, donde el kit comprende además una molécula de tinción de ácidos nucleicos.

15. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, donde la molécula de tinción de ácidos nucleicos es un fluoróforo intercalante.

16. El kit de acuerdo con la reivindicación 15, donde el fluoróforo intercalante se selecciona del grupo que consiste en SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, SYBR Green I, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTO 16, SYTOX, SYTO BC, DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, PicoGreen y combinaciones de los mismos.

17. El kit de acuerdo con la reivindicación 16, donde el fluoróforo intercalante es SYBR™ Green I [N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ium-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina], con número CAS 163795-75-3.

18. Uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para detectar *Pneumocystis jirovecii* en una muestra.

19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18 donde la muestra es una muestra clínica seleccionada de entre esputo, lavados orofaríngeos, aspirados nasales, frotis

faríngeos, lavados broncoalveolares, tejidos de biopsias o autopsias, sangre, líquido pleural y líquido amniótico.

20. Uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para el diagnóstico de una infección por *Pneumocystis jirovecii* en un paciente.

21. Una composición de oligonucleótidos seleccionada del grupo formado por:

- a. una pareja de oligonucleótidos de secuencias 5'-GAC RAC AGA CAC RTG GGT YAC-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-CAC TTC GTWGGY TTR CAC CGC C-3' (SEQ ID NO: 2),
- b. una pareja de cebadores de secuencias 5'-AATCGGACTAGGATATAGCTGGTTT (SEQ ID NO: 15) y 5'-CTCCCTCGAGATATTCAGTGCT (SEQ ID NO: 16) y
- c. Una combinación de las dos parejas de cebadores.

22. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, o el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 21, donde al menos uno de los cebadores contiene una o más modificaciones en las nucleobases, en los azúcares y/o en los enlaces entre nucleótidos.



- ②① N.º solicitud: 202130735  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.07.2021  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **C12Q1/6895** (2018.01)  
**C12R1/645** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| D, Y      | WAKEFIELD, A. E. DNA sequences identical to <i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>carinii</i> and <i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>hominis</i> in samples of air spora. Journal of Clinical Microbiology. Julio 1996, Vol. 34, N° 7, páginas 1754 - 1758. ISSN 0095-1137, <DOI:10.1128/jcm.34.7.1754-1759.1996>. Especialmente: páginas 1755, 1758.                                                | 1, 2, 5-19, 21             |
| Y         | US 6664053 B1 (KOVACS, J. A. et al.) 16/12/2003, columna 2, líneas 50 - 60; columna 12, líneas 11 - 20; ejemplo 3; SEQ ID NO: 15, 17, 18, 20.                                                                                                                                                                                                                                                           | 1, 2, 5-19, 21             |
| A         | BOTTEREL, F. et al. Clinical significance of quantifying <i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. Journal of Clinical Microbiology. Febrero 2012, Vol. 50, N° 2, páginas 227 - 231. ISSN 0095-1137 (impreso), ISSN 1098-660X (electrónico), <DOI:10.1128/JCM.06036-11>. Especialmente: página 228.                     | 1, 2, 5-19, 21             |
| A         | MONROY-VACA, E. X. et al. Prevalence and genotype distribution of <i>Pneumocystis jirovecii</i> in cuban infants and toddlers with whooping cough. Journal of Clinical Microbiology. Enero 2014, Vol. 52, N° 1, páginas 45 - 51. ISSN 0095-1137 (impreso), ISSN 1098-660X (electrónico), <DOI:10.1128/JCM.02381-13>. Especialmente: páginas 46; página 47, último párrafo - página 48, segundo párrafo. | 1, 2, 5-19, 21             |
| A         | WO 2016/166287 A1 (INSTITUT PASTEUR et al.) 20/10/2016, páginas 1 - 3, 66 - 67, 77 - 78; SEQ ID NO:11, 12, 13.                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1, 2, 5-19, 21             |

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

D: documento citado por el solicitante en la solicitud

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: 1, 2, 5-19, 21

Fecha de realización del informe  
11.05.2022

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/2

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

C12Q, C12R

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

NVENES, EPODOC, WPI, DIALNET, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, EM\_FUN, NRNL1