

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 187**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6895** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2018** **E 18163653 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021** **EP 3382041**

54 Título: **Ensayo para el diagnóstico de la dermatofitosis**

30 Prioridad:

**30.03.2017 EP 17000524**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.03.2022**

73 Titular/es:

**EUROIMMUN MEDIZINISCHE  
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)  
Seekamp 31  
23560 Lübeck, DE**

72 Inventor/es:

**HARDER, MELANIE;  
GRÄSER, YVONNE;  
KUPSCH, CHRISTIANE y  
CAVALAR, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 899 187 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Ensayo para el diagnóstico de la dermatofitosis

- 5 La presente invención se refiere a un par de cebadores que comprende un cebador directo y un cebador inverso para amplificar un ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas que comprende la SEC. ID NÚM. 22, un procedimiento que comprende la etapa de detección en una muestra de una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas, un uso del par de cebadores para el diagnóstico de una enfermedad y un kit que comprende el par de cebadores para el diagnóstico de una enfermedad de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.
- 10 Los dermatofitos patógenos humanos, que pertenecen a los tres géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, son hongos que infectan la piel, las uñas y el cabello humanos. Mientras que el género *Epidermophyton* está representado por una sola especie (*E. floccosum*), los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* comprenden varias especies diferentes. Recientemente, varias especies anteriormente asignadas a *Arthroderma* han sido reclasificadas y asignadas a *Trichophyton* (Hoog *et al.*, 2016), y esta reasignación se mantendrá a lo largo
- 15 de esta solicitud de patente.
- Las tasas de prevalencia de las infecciones por dermatofitos en la piel, el pelo y las uñas en los países europeos varían entre el 3 y el 22%. La terapia tópica es suficiente en la mayoría de los casos, pero es necesario un tratamiento sistémico a largo plazo y a menudo costoso si la infección está causada por cepas específicas de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*, tales como *T. verrucosum* y *T. mentagrophytes*.
- 20 Los antifúngicos sistémicos se asocian a diversos efectos secundarios, tales como los gastrointestinales, que se producen en el 3 a 5% de los pacientes tratados por vía oral con terbinafina. Además, se puede producir una supresión de la médula ósea y efectos secundarios hepáticos, aunque son menos frecuentes. Por lo tanto, el diagnóstico de la infección de la piel, el pelo y las uñas con una cepa específica se debe confirmar antes de idear un régimen de tratamiento e iniciar la terapia.
- 25 El diagnóstico actual de los dermatofitos se basa en la identificación microscópica de las esporas e hifas en las muestras clínicas, seguida por el cultivo *in vitro* y la identificación morfológica del hongo. El examen microscópico directo del material de la piel, el pelo y las uñas suele ser suficiente para el diagnóstico preventivo de una infección fúngica, pero no conduce a un diagnóstico específico de la especie. Aunque es rápida y barata, esta técnica tiene una sensibilidad relativamente baja y muestra resultados falsos negativos hasta en un 15% de los casos.
- 30 La aplicación del cultivo permite la identificación de especies específicas en 10 a 15 días en aproximadamente el 95% de los casos. Sin embargo, para algunos aislados de crecimiento lento o atípicos el tiempo de diagnóstico es de hasta 3 a 6 semanas. Por lo tanto, se necesita un procedimiento sencillo, rápido y específico para el diagnóstico de las infecciones por dermatofitos.
- 35 Se han introducido procedimientos basados en la PCR para el diagnóstico de las infecciones fúngicas. Por ejemplo, el documento US2010/0311041 desvela un procedimiento para extraer ácidos nucleicos de hongos, un procedimiento de PCR para detectar hongos en muestras de pacientes y un kit de PCR para detectar dermatofitos y para diagnosticar infecciones por los tres géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.
- 40 Los documentos WO 01/86003 A2, WO 2007/106407 A2 y Wang *et al.* (Wang, L. *et al.*, 2006, *BMC Genomics*, Biomed Central Ltd, Londres, Reino Unido, vol. 7, núm.1, 11, página 255) desvelan ácidos nucleicos capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico de *T. tonsurans* que comprende la SEC. ID NÚM.: 22 o la cadena complementaria de la SEC. ID NÚM.: 22.
- Sin embargo, los procedimientos desvelados en el estado de la técnica tienen deficiencias. En particular, no permiten distinguir de forma rápida y fiable las cepas estrechamente relacionadas del género *Trichophyton* y *Microsporum*, que incluyen especies zoófilas y no zoófilas.
- 45 Por lo tanto, un problema subyacente a la presente invención es proporcionar procedimientos y reactivos para el diagnóstico de una enfermedad de la piel, el cabello y las uñas, concretamente una infección fúngica de la piel, el cabello y las uñas.
- Otro problema subyacente a la presente invención es proporcionar procedimientos y reactivos para identificar y distinguir de especies estrechamente relacionadas un patógeno del género *Trichophyton*, en particular *T. benhamiae* (amarillo) y *T. concentricum*.
- 50 El problema subyacente a la presente invención se resuelve por medio del objeto de las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas.
- En un primer aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve por medio de un par de cebadores que comprende un cebador directo y un cebador inverso capaces de amplificar un ácido nucleico de un

patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas que comprende la SEC. ID NÚM. 22, preferentemente la SEC. ID NÚM. 1 de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

5 Además en la presente memoria se describe un ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una secuencia de ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas que comprende la SEC. ID NÚM. 22, preferentemente la SEC. ID NÚM. 1, o su cadena complementaria o un vector o célula que comprende dicha secuencia de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

En una realización preferida, el par de cebadores comprende una etiqueta detectable, preferentemente del grupo que comprende una etiqueta fluorescente, radiactiva, de oro coloidal o enzimáticamente activa.

10 En un tercer aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve por medio de un ácido nucleico que comprende el par de cebadores de acuerdo con la presente invención y, entre el cebador directo y el inverso, la secuencia de ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas localizada en el genoma del patógeno entre las secuencias del cebador directo y el inverso obtenidas por medio de la amplificación de una muestra que comprende dicho patógeno mediante el uso de los cebadores de acuerdo con la presente invención, como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

15 Además en la presente memoria se describe un portador que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

El soporte puede ser una placa de microarray de vidrio, plástico o material de silicio recubierto de silano.

20 En un quinto aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve por medio de un procedimiento que comprende la etapa de detectar en una muestra una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22, preferentemente SEC. ID NÚM. 1, de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Más preferentemente, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que comprende la SEC. ID NÚM. 2, la SEC. ID NÚM. 3, la SEC. ID NÚM. 4, la SEC. ID NÚM. 5, la SEC. ID NÚM. 6, la SEC. ID NÚM. 7, la SEC. ID NÚM. 8 y la SEC. ID NÚM. 9.

25 En una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención además comprende las etapas de:

a) proporcionar una muestra, preferentemente de uñas, pelo o material de piel o uñas, de un paciente  
 b) amplificar cualquier ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22, preferentemente la SEC. ID NÚM. 1, presente en la muestra mediante el uso del par de cebadores, para de ese modo generar un amplicón si en la muestra está presente una secuencia de ácido nucleico que comprenda la SEC. ID NÚM. 22 (o la SEC. ID NÚM. 30 1) de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas. Más preferentemente, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que comprende la SEC. ID NÚM. 2, la SEC. ID NÚM. 3, la SEC. ID NÚM. 4, la SEC. ID NÚM. 5, la SEC. ID NÚM. 6, la SEC. ID NÚM. 7, la SEC. ID NÚM. 8 y la SEC. ID NÚM. 9 y una variante de las mismas.

En una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención además comprende la etapa de:

35 c) detectar el amplicón.

En una realización preferida, el amplicón se detecta por medio de fluorescencia, radiactividad, oro coloidal o quimioluminiscencia.

40 En un sexto aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve por medio de un uso del par de cebadores, de acuerdo con la presente invención para el diagnóstico de una enfermedad, preferentemente una infección de la piel, el cabello y las uñas asociada con un patógeno de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

En un séptimo aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve por medio de un kit que comprende el par de cebadores de acuerdo con la presente invención, preferentemente para el diagnóstico de una enfermedad, más preferentemente una infección de la piel, el cabello y las uñas asociada con un patógeno.

45 En un octavo aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve por medio de un uso del par de cebadores, el ácido nucleico o el portador de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un kit para el diagnóstico de una enfermedad, preferentemente un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas, más preferentemente con una infección de la piel, el cabello y las uñas que tiene un ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22, preferentemente la SEC. ID NÚM. 1 de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

50 Además en la presente memoria se describe el uso del par de cebadores, el ácido nucleico, el portador, el uso o el kit para la identificación de un hongo, preferentemente del género *Trichophyton*, más preferentemente del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae* (africano), *T. benhamiae* (amarillo), *T. concentricum*, *T. erinacei* (africano) y *T. erinacei*.

El patógeno es del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae* (africano), *T.*

benhamiae (amarillo), T. concentricum, T. erinacei (africano) y T. erinacei.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de los inventores de que varios patógenos asociados con una infección de la piel, el pelo y las uñas tienen en común una metaloproteasa homóloga relacionada con la secuencia de consenso de la SEC. ID NÚM. 22 o la SEC. ID NÚM. 1, con ligeras, pero distintivas diferencias de secuencia entre las cepas pertinentes, estas diferencias se pueden utilizar para distinguir, en muestras tales como las muestras clínicas de pacientes que sufren una infección de la piel, el pelo y las uñas, varias cepas estrechamente relacionadas de patógenos asociados con una infección de la piel, el pelo y las uñas, del género Trichophyton, concretamente del grupo que comprende T. tonsurans, T. equinum, T. interdigitale, T. benhamiae (blanco), T. benhamiae (africano), T. benhamiae (amarillo), T. concentricum, T. erinacei (africano) y T. erinacei.

El par de cebadores comprende un cebador directo y un cebador inverso capaces de amplificar un ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas, el patógeno se selecciona del grupo que comprende T. tonsurans, T. equinum, T. interdigitale, T. benhamiae (blanco), T. benhamiae (africano), T. benhamiae (amarillo), T. concentricum, T. erinacei (africano) y T. erinacei.

Se describe además que el ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una secuencia de ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas se selecciona del grupo que comprende T. tonsurans, T. equinum, T. interdigitale, T. benhamiae (africano), T. benhamiae (amarillo), T. concentricum, T. erinacei (africano) y T. erinacei.

De acuerdo con la presente invención, se detecta un ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas. La SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de un patógeno del género Trichophyton, concretamente de un patógeno del grupo que comprende T. tonsurans, T. equinum, T. interdigitale, T. benhamiae (blanco), T. benhamiae (africano), T. benhamiae (amarillo), T. concentricum, T. erinacei (africano) y T. erinacei. En una realización preferida, la SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de T. tonsurans y está representada por la SEC. ID NÚM. 2. En otra realización preferida, la SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de T. equinum y está representada por la SEC. ID NÚM. 3. En otra realización preferida, la SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de T. interdigitale (antrofilica + zoófila), I, II, III\*, IV, M y está representada por la SEC. ID NÚM. 4. En otra realización preferida, la SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de T. benhamiae (amarillo) y está representada por la SEC. ID NÚM. 5. En otra realización preferida, la SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de T. benhamiae (blanco) y está representada por la SEC. ID NÚM. 6. En otra realización preferida, la SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de T. benhamiae (africano) y está representada por la SEC. ID NÚM. 7. En otra realización preferida, la SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de T. concentricum y está representada por la SEC. ID NÚM. 8. En otra realización preferida, la SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de T. erinacei y está representada por la SEC. ID NÚM. 9.

La invención contempla varios reactivos tales como un par de cebadores que comprenden un cebador directo y un cebador inverso para amplificar un ácido nucleico que codifica dicha metaloproteasa de un patógeno. En el estado de la técnica se describen procedimientos para diseñar un cebador que garantice una hibridación específica y evite la dimerización del cebador o la formación de estructuras secundarias, por ejemplo en Dennis, Y. M., Chius, R. W. K., y Allen Chan, K. C. (2006) *Clinical applications of PCR*, Humana Press, página 18. En una realización preferida, cada cebador tiene una longitud de 10 a 40, más preferentemente de 12 a 35, más preferentemente de 14 a 30 nucleótidos. El término "cebador directo", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un cebador que se hibrida corriente arriba de la SEC ID NÚM. 22 o 1 en el genoma del patógeno, de forma que el cebador se pueda extender en una reacción de PCR en la dirección 5' a 3', lo que da como resultado la síntesis de un ácido nucleico que comprende la SEC ID NÚM. 22 o 1.

El cebador directo es un cebador directo universal que se hibrida específicamente con una región del genoma del patógeno corriente arriba de la SEC ID NÚM. 22 o 1 que está suficientemente conservada entre los patógenos a distinguir, preferentemente especies del género Trichophyton, de forma que se pueda utilizar para amplificar la SEC ID NÚM. 22 o 1 de más de una especie, aunque las partes variables de la SEC ID NÚM. 22 o 1 de dichas especies difieran. En una realización preferida, el cebador de avance hibrida con una región conservada compartida por T. tonsurans, T. equinum y T. interdigitale (antrofilica + zoófilica), I, II, III, III\*, IV, M, y comprende una secuencia que comprende GGGAGGACTAGTTG o una variante de la misma. En otra realización preferida, el cebador directo se une a una región conservada compartida por T. benhamiae (amarillo), T. benhamiae (blanco), T. benhamiae (africano) T. concentricum y T. erinacei, y comprende una secuencia que comprende GCATTTCCCATGGCT o una variante de la misma.

El término "cebador inverso", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un cebador que se hibrida específicamente corriente abajo de la SEC ID NÚM. 22 o 1 en el genoma del patógeno, de forma que el cebador se pueda extender en una reacción de PCR en la dirección 5' a 3', lo que da como resultado la síntesis de un ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria a la SEC ID NÚM. 22 o 1.

El cebador inverso es un cebador inverso universal que se hibrida específicamente con una región del genoma del patógeno corriente abajo de la SEC ID NÚM. 22 o 1 que está suficientemente conservada entre los patógenos a distinguir, preferentemente especies del género Trichophyton, de forma que se pueda utilizar para amplificar las secuencias complementarias a la SEC ID NÚM. 22 o 1 de más de una especie, aunque las secuencias que comprenden la SEC ID NÚM. 22 o 1 y las secuencias complementarias a ellas de dichas especies difieran. En una

realización preferida, el cebador inverso hibrida con una región conservada compartida por *T. tonsurans*, *T. equinum* y *T. interdigitale* (antrofilica + zoofilica), I, II, III, III\*, IV, M, y comprende una secuencia que comprende AATTTTCGCCGCAAG o una variante de la misma. En otra realización preferida, el cebador inverso se une a una región conservada compartida por *T. benhamiae* (amarillo), *T. benhamiae* (blanco), *T. benhamiae* (africano), *T. concentricum* y *T. erinacei*, y comprende una secuencia que comprende TGGCTGTACGTG o una variante de la misma.

En otra realización preferida, el par de cebadores puede estar presente en una composición que comprende más de un par de cebadores, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 28, 32, 36, 40 o 48 o más pares de cebadores. En una realización preferida, la composición comprende un par de cebadores que se pueden utilizar para amplificar los ácidos nucleicos que codifican SEC. ID NÚM. 22 o 1 de *T. tonsurans*, *T. equinum* y *T. interdigitale* (antrofilico + zoofilico), I, II, III, III\*, IV, M y además un par de cebadores que se pueden utilizar para amplificar los ácidos nucleicos que codifican SEC. ID NÚM. 22 o 1 de *T. benhamiae* (amarillo), *T. benhamiae* (blanco), *T. benhamiae* (africano), *T. concentricum* y *T. erinacei*. En una realización preferida, la composición puede comprender un par de cebadores que se pueden utilizar para amplificar o detectar, por medio de hibridación específica con ellos, una o más secuencias que se pueden utilizar para distinguir los patógenos asociados con una infección de la piel, el cabello y las uñas, preferentemente una secuencia seleccionada del grupo que comprende las secuencias de ácido nucleico denominadas beta tubulina (Rezaei-Matehkolaei *et al.* (2014) *Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes*, *Medical Mycology* 42, 674), factor de elongación de la transcripción (Mirhendi *et al.* (2015), *Translation elongation factor 1-alpha gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes*, *Medical Mycology* 53, 215), regiones espaciadoras transcritas internas 1 y 2 (Gräser *et al.* (2008), *The New Species Concept in Dermatophytes - a Polyphasic Approach*, *Mycopathologia* 166, 239) y la topoisomerasa o una parte de ella. Dicha composición de cebadores se puede utilizar de acuerdo con la presente invención y analizarse mediante el uso de un soporte que comprenda uno o más ácidos nucleicos capaces de hibridarse específicamente con una secuencia seleccionada del grupo que comprende las secuencias de ácido nucleico denominadas beta tubulina, factor de elongación de la transcripción, regiones espaciadoras transcritas internas 1 y 2, y topoisomerasa o una parte de ellas se puede utilizar para detectar la presencia de cualquiera de dichas secuencias.

La distancia entre el último par de bases del cebador directo, en su orientación 5'-3', y el primer par de bases de SEC. ID NÚM. 22 o 1, en su orientación 5'-3', es, en orden de preferencia creciente, de 200, 100 o menos pares de bases.

La distancia entre el par de bases final del cebador inverso, en su orientación 5'-3', y el par de bases final de la SEC. ID NÚM. 22 o 1, en su orientación 5'-3', es, en orden de preferencia creciente, de 200, 100 o menos pares de bases.

Las enseñanzas de la presente invención no sólo se pueden llevar a cabo mediante el uso de ácidos nucleicos que tengan las secuencias exactas a las que se hace referencia en esta solicitud de forma explícita, por ejemplo por función, nombre, secuencia o número de acceso, o de forma implícita, sino también mediante el uso de variantes de dichos ácidos nucleicos. En una realización preferida, el término "variante" de un ácido nucleico comprende ácidos nucleicos que tienen al menos un 70, más preferentemente un 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 99,5% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de referencia o de tipo salvaje, preferentemente con la capacidad de hibridar específicamente con la misma diana que el ácido nucleico de referencia o de tipo salvaje, así como ácidos nucleicos cuya cadena complementaria se hibrida, preferentemente en condiciones estrictas, con el ácido nucleico de referencia o de tipo salvaje. En una realización preferida, el término "se hibrida específicamente", como se utiliza en la presente memoria, significa que un ácido nucleico, tal como un cebador o una sonda, se hibrida en condiciones estrictas con el ácido nucleico objetivo. La rigurosidad de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por los expertos en la técnica y, en general, es un cálculo empírico que depende de la longitud del cebador o de la sonda, de la temperatura de reacción y de la concentración de sal. En general, los cebadores o sondas más largos soportan temperaturas más altas para un recocido adecuado, mientras que los cebadores o sondas más cortos no. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN de una o dos hebras para unirse a las hebras complementarias presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que se podrá utilizar. En consecuencia, las temperaturas relativas más altas tenderían a hacer más estrictas las condiciones de reacción y a evitar las uniones inespecíficas, mientras que las temperaturas más bajas lo harían menos. Para más detalles y explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel, F. M. (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. Además, los expertos en la técnica pueden seguir las instrucciones dadas en el manual Boehringer Mannheim GmbH (1993) *The DIG System Users Guide for Filter Hybridization*, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania y en Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., y Schleifer, K. H. (1991) *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 255 a 260 sobre cómo identificar secuencias de ADN por medio de hibridación. En una realización preferida, se aplican condiciones estrictas para cualquier hibridación, es decir, la hibridación se produce sólo si los cebadores o la sonda son un 70%, preferentemente un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 99% o más idénticos a la secuencia diana. El ácido nucleico que tiene un menor grado de identidad con respecto a la secuencia diana se puede hibridar, pero tales híbridos son inestables y se eliminarán durante la etapa de recocido de una PCR o las etapas de lavado después de la hibridación de la sonda. En una etapa de lavado de una hibridación de la sonda en condiciones estrictas, por ejemplo, por medio de la disminución de la concentración de sal a 2 x SSC o, opcional y

posteriormente, a 0,25 x SSC, mientras la temperatura es, en orden de preferencia creciente, de aproximadamente 39 °C a 69 °C, de aproximadamente 41 °C a 67 °C, de aproximadamente 43 °C a 65 °C, de aproximadamente 45 °C a 63 °C, de aproximadamente 47 °C a 61 °C, de aproximadamente 49 °C a 59 °C, de aproximadamente 51 °C a 57 °C, de aproximadamente 53 °C a 57 °C. En una realización particularmente preferida, la temperatura es de aproximadamente 51 °C a 57 °C o de aproximadamente 53 °C a 57 °C. En una realización preferida, el par de cebadores utilizado en una reacción de PCR comprende una etiqueta detectable, preferentemente del grupo que comprende una etiqueta fluorescente, radiactiva, de oro coloidal o enzimáticamente activa. Más preferentemente, la etiqueta es una etiqueta fluorescente seleccionada preferentemente del grupo que comprende cy-3, cy-5, HEX, FAM, ROX y TAMRA. En el estado de la técnica se han descrito etiquetas adecuadas, formas de unir las a los ácidos nucleicos, tales como los cebadores, y de detectar dichas etiquetas.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos de cada cebador del par de cebadores y/o la sonda de la invención comprende o consiste en una secuencia que es capaz de amplificar o hibridar con una secuencia establecida en la SEC ID NÚM. 22, 1 o la secuencia de complemento de la misma a condición de que dicho par de cebadores y/o dicha sonda no sea capaz de amplificar o hibridar con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 6, 29, 30 y/o la secuencia de complemento de la misma. De este modo, en algunas realizaciones la sonda de la invención comprende o consiste en una secuencia que es capaz de hibridarse con una secuencia establecida en la SEC ID NÚM. 22 o la secuencia de complemento de la misma a condición de que dicha sonda no sea capaz de hibridarse con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 6, 29, 30 y/o la secuencia de complemento de la misma. En realizaciones alternativas, la sonda de la invención comprende o consiste en una secuencia que es capaz de hibridarse con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 1 o la secuencia de complemento de la misma a condición de que dicha sonda no sea capaz de hibridarse con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 6, 29, 30 y/o la secuencia de complemento de la misma. Las condiciones estrictas para la hibridación se describen más arriba. Los procedimientos para la medición de la hibridación de nucleótidos son muy conocidos en la técnica. En las realizaciones relativas a la condición de que el par de cebadores y/o la sonda de la invención no sean capaces de ampliar o hibridar con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 6, 29, 30 y/o la secuencia de complemento de la misma, dicha secuencia tiene una identidad de secuencia de 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% con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 6, 29, 30 y/o la secuencia de complemento de la misma en toda su longitud.

En realizaciones preferidas, la secuencia de nucleótidos de cada cebador del par de cebadores de la invención comprende o consiste en una secuencia que es capaz de amplificar o hibridar con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 22, 1 o la secuencia de complemento de la misma, en la que dicha secuencia de nucleótidos de cada cebador del par de cebadores de la invención comprende o consiste en una secuencia que es un fragmento de la secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 22, 1 o la secuencia de complemento de la misma, en la que dicho fragmento tiene 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 identidad de secuencia con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 22, 1 o la secuencia de complemento de la misma en una longitud de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25 o al menos 26 nucleótidos consecutivos. Se describe además que la secuencia de nucleótidos de la sonda comprende o consiste en una secuencia que es un fragmento de la secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 22 o la secuencia del complemento de la misma, en la que dicho fragmento tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 22 o la secuencia de complemento de la misma en una longitud de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25 o al menos 26 nucleótidos consecutivos.

La sonda tiene una longitud de no más de 250, no más de 200, no más de 150, no más de 100, no más de 90, no más de 80, no más de 70, no más de 65, no más de 60, no más de 55, no más de 50, no más de 45, no más de 40, no más de 35, no más de 30, no más de 25 o no más de 20 nucleótidos fusionados a una molécula de señal detectable.

Se describe además que la secuencia de nucleótidos de la sonda puede comprender o consistir en una secuencia que es un fragmento de la secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 1 o la secuencia de complemento de la misma, en la que dicho fragmento tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 1 o la secuencia de complemento de la misma en una longitud de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25 o al menos 26 nucleótidos consecutivos.

En otras realizaciones preferidas de la invención, se combinan las propiedades descritas anteriormente de cada cebador del par de cebadores y de la sonda, a saber (1) que dicho par de cebadores y/o dicha sonda no sea capaz de hibridarse ampliamente o con una secuencia establecida en la SEC. ID NÚM. 6, 29, 30 y/o la secuencia de complemento de la misma, (2) que la sonda tenga una longitud limitada y (3) que cada cebador del par de cebadores y la sonda comprenda un fragmento de la SEC. ID NÚM. 22 o la secuencia del complemento de la misma, en el que dicho fragmento tenga al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia establecida en la SEC ID NÚM. 22 o la secuencia del complemento de la misma en una longitud de al menos 5 nucleótidos consecutivos.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas o su cadena complementaria. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico aislado. Este ácido nucleico se puede utilizar como sonda para detectar el ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 del patógeno y para distinguirlo de otras secuencias, más específicamente de secuencias homólogas de otros patógenos asociados con dicha infección que también comprenden la SEC. ID NÚM. 22 o 1. Por lo tanto, este ácido nucleico comprende una hebra capaz de hibridarse específicamente con la secuencia que comprende la SEC ID NÚM. 22 o 1 o una secuencia complementaria. El ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID NÚM. 22 o 1 de dicho patógeno se puede seleccionar del grupo que comprende la SEC. ID NÚM. 14, la SEC. ID NÚM. 15, la SEC. ID NÚM. 16, la SEC. ID NÚM. 17, la SEC. ID NÚM. 18, la SEC. ID NÚM. 19, la SEC ID NÚM. 20, la SEC ID NÚM. 21, las SEC ID NÚMS. 24 a 28 y una variante de las mismas.

El ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con una secuencia de ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas que comprende la SEC ID NÚM. 22 o 1 se puede inmovilizar, preferentemente en un portador. De esta manera, es más sencillo separar dicho ácido nucleico cuando se anuda a un ácido nucleico de un patógeno que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de cualquier otro ácido nucleico u otras sustancias en una muestra de un paciente. El portador se puede hacer por medio del revestimiento de un portador con un ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con un ácido nucleico que comprenda la SEC ID NÚM. 22 o 1 o una variante de la misma, más preferentemente un ácido nucleico que comprenda una secuencia seleccionada del grupo que comprende la SEC. ID NÚM. 14, SEC. ID NÚM. 15, SEC. ID NÚM. 16, SEC. ID NÚM. 17, SEC. ID NÚM. 18, SEC. ID NÚM. 19, SEC. ID NÚM. 20, SEC. ID NÚM. 21, las SEC ID NÚMS. 24 a 28 y una variante de la misma. En una realización preferida, el soporte es una placa de microarrays. Los microarrays adecuados, la forma de prepararlos y la manera de utilizarlos se describen en el estado de la técnica, por ejemplo en Müller, H. J & Röder, T. (2004) *Der Experimentator - Microarrays*, Elsevier/Spektrum, Capítulos 3 y 4.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento que comprende la etapa de detectar en una muestra un ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas. El término "detectar", como se utiliza en la presente memoria, significa que se detecta la presencia o ausencia de la SEC. ID NÚM. 22 o 1 o una variante de la misma. El término significa que se determina si el ácido nucleico presente comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de uno o más patógenos del género *Trichophyton*, concretamente del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae* (blanco), *T. benhamiae* (africano), *T. benhamiae* (amarillo), *T. concentricum*, *T. erinacei* (africano), *T. erinacei* y *T. concentricum* y, opcionalmente, de qué secuencia de estos patógenos se trata. En una realización más preferida, el término significa que se determina si un ácido nucleico presente en la muestra es o no de *T. benhamiae* (amarillo) o de *T. concentricum*, para de este modo distinguir ambos organismos. En otra realización preferida, la detección puede ser semicuantitativa o cuantitativa. Los procedimientos que se pueden utilizar para detectar una secuencia específica se describen en el estado de la técnica, por ejemplo en Lottspeich, F. & Engels, J. W. (2012), *Bioanalytik*, Springer Spektrum, 3ra edición. En una realización preferida, el procedimiento se selecciona del grupo que comprende el microarray, la secuenciación de ácidos nucleicos, la espectrometría de masas y la PCR, más preferentemente la PCR en tiempo real. En otra realización preferida, el patógeno asociado con una infección de la piel, el pelo y las uñas se detecta por medio de la identificación del polipéptido parcialmente codificado por SEC. ID NÚM. 22 o 1. Los expertos en la técnica están familiarizados con los procedimientos adecuados, preferentemente seleccionados del grupo que comprende los inmunoensayos y la espectrometría de masas. Se pueden generar anticuerpos para distinguir las diferencias entre las secuencias de ácido nucleico que comprenden la SEC ID NÚM. 22 o 1 a nivel proteico mediante el uso de procedimientos estándar descritos en el estado de la técnica, por ejemplo Lottspeich, F. & Engels, J. W. (2012), *Bioanalytik*, Capítulo 6.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente la detección en una muestra de una o más secuencias de ácido nucleico adicionales, además del ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas. Dicha secuencia puede ser otra SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas. Por ejemplo, el procedimiento puede comprender la detección de un primer ácido nucleico que comprenda SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno del grupo *T. tonsurans*, *T. equinum* y *T. interdigitale* (antrofilico + zoofilico), I, II, III, III\*, IV, M, y un segundo ácido nucleico que comprenda otro SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno del grupo que comprende *T. benhamiae* (amarillo), *T. benhamiae* (blanco), *T. benhamiae* (africano), *T. concentricum* y *T. erinacei*. Dichas secuencias adicionales se detectan preferentemente de forma simultánea junto con la secuencia que codifica una metaloproteasa de un patógeno asociado con una enfermedad de la piel, el cabello y las uñas. En una realización preferida, se lleva a cabo una reacción de PCR múltiple para amplificar las secuencias que se van a detectar, y esto puede ir seguido opcionalmente por un análisis de micromatriz, preferentemente mediante el uso de la detección por medio de fluorescencia de los amplicones que comprenden la SEC ID NÚM. 22 o 1 de la secuencia que codifica una metaloproteasa y cualquier amplicón que comprenda una de las secuencias adicionales.

En una realización preferida, el procedimiento puede comprender la etapa a) proporcionar una muestra, preferentemente de un paciente. Una muestra examinada por medio de un procedimiento o reactivo de acuerdo con la presente invención se puede obtener de un paciente del que se sospecha que padece una infección de la piel, el cabello y las uñas, y es preferentemente una muestra de una parte del cuerpo del paciente que comprende

queratina. En una realización más preferida, la muestra es una muestra de uñas, pelo o piel, más preferentemente una muestra aislada. El paciente es preferentemente un paciente mamífero, más preferentemente un humano. Alternativamente, la muestra puede ser una muestra ambiental, por ejemplo del suelo o del piso de áreas potencialmente contaminadas tales como una piscina o un hospital. Antes de proceder al análisis, la muestra puede ser procesada, por ejemplo, por medio de la extracción de los ácidos nucleicos presentes. En una realización preferida, el término "extraer", como se utiliza en la presente memoria, significa que los ácidos nucleicos se purifican de la muestra y/o se concentran, por ejemplo para eliminar cualquier contaminante que pueda interferir con la amplificación y/o la detección. En una realización preferida, el ácido nucleico es ADN o ARN, más preferentemente ADN. Existen en el mercado procedimientos y reactivos para la extracción de ácidos nucleicos, preferentemente para la detección de patógenos, más preferentemente de hongos. Es posible utilizar la muestra directamente o el ácido nucleico extraído para la detección, pero se prefiere que el procedimiento comprenda la etapa b) amplificar cualquier ácido nucleico que comprenda SEC. ID NÚM. 22 o 1 y opcionalmente cualquier secuencia o secuencias adicionales, para de ese modo generar uno o más amplicones. Dicha amplificación se puede llevar a cabo por PCR. Los procedimientos y reactivos adecuados se describen en el estado de la técnica, por ejemplo en Dennis, Y. M., Chius, R. W. K., y Allen Chan, K. C. (2006) *Clinical applications of PCR*, Humana Press, capítulo 1. Esencialmente, la muestra o el ácido nucleico extraído se pone en contacto con al menos un par de cebadores de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, con pares de cebadores adicionales, seguido por la adición de una polimerasa capaz de amplificar el ácido nucleico en presencia de cualquier reactivo necesario, tal como los NTP y los cationes bivalentes en un tampón de PCR. La mezcla de reacción resultante se somete a varios ciclos de amplificación, cada uno de los cuales comprende una etapa de desnaturalización, que implica la separación de las dos hebras complementarias del ácido nucleico, una etapa de recocido, en la que los cebadores se hibridan con las hebras del ácido nucleico, y una reacción de elongación, que implica la generación de hebras complementarias a ambas hebras del ácido nucleico. Como resultado, se genera un amplicón de doble cadena que comprende el par de cebadores y la secuencia del ácido nucleico genómico del patógeno localizada entre los cebadores directo e inverso del par de cebadores. El amplicón está presente en una concentración que excede la concentración del ácido nucleico en la muestra, preferentemente, en orden de preferencia creciente, más de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  o  $10^5$  veces. Se pueden llevar a cabo varias reacciones para la amplificación por PCR y la generación de amplicones que comprendan secuencias adicionales. Los cebadores directo y/o inverso pueden estar marcados, lo que da como resultado un amplicón marcado.

En una realización preferida, el par de cebadores utilizado en una reacción de PCR comprende una etiqueta detectable, preferentemente del grupo que comprende una etiqueta fluorescente, radiactiva, de oro coloidal o enzimáticamente activa. Más preferentemente, la etiqueta es una etiqueta fluorescente seleccionada preferentemente del grupo que comprende cy-3, cy-5, HEX, FAM, ROX y TAMRA. En el estado de la técnica se han descrito etiquetas adecuadas, formas de unirlos a los ácidos nucleicos, tales como los cebadores, y de detectar dichas etiquetas.

Posteriormente o de forma concomitante a la realización de la etapa b), cualquier amplicón puede ser etiquetado, preferentemente por medio de fluorescencia, radiactividad, oro coloidal o quimioluminiscencia. En una realización preferida, la etiqueta puede estar unida a los cebadores antes de llevar a cabo la etapa b), por ejemplo si una etiqueta fluorescente, radiactiva, enzimáticamente activa o quimioluminiscente está unida a uno o ambos cebadores del par de cebadores. En otra realización preferida, el amplicón se puede etiquetar a medida que avanza la reacción de amplificación, por ejemplo, por medio de la incorporación de NTP etiquetados o una reacción de etiquetado en paralelo. En otra realización preferida, el amplicón se puede etiquetar tras la etapa b), por ejemplo, por medio de la unión al amplicón una etiqueta fluorescente, radiactiva, enzimáticamente activa o quimioluminiscente o por medio de la adición al amplicón de una etiqueta que se una al ADN de doble cadena, por ejemplo, un agente intercalante fluorescente tal como bromuro de etidio o de propidio.

Posteriormente o de forma concomitante a la realización de la etapa b), el amplicón o los amplicones pueden ser detectados. Por ejemplo, la PCR puede ser una PCR en tiempo real que implique la detección continua de fluorescencia a medida que la reacción progresa. Si el amplicón se va a detectar posteriormente, el amplicón se puede extraer de la mezcla de reacción de PCR antes de la etapa c). Para una detección posterior, el amplicón, extraído o no, se puede poner en contacto, en condiciones que permitan una hibridación específica, con un ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con un ácido nucleico de un patógeno que comprenda la SEC ID NÚM. 22 o 1, preferentemente un ácido nucleico que comprenda una secuencia del grupo que comprende la SEC. ID NÚM. 14, la SEC. ID NÚM. 15, la SEC. ID NÚM. 16, la SEC. ID NÚM. 17, la SEC. ID NÚM. 18, la SEC. ID NÚM. 19, la SEC. ID NÚM. 20, la SEC. ID NÚM. 21, las SEC. ID NÚMS. 24 a 28 y una variante de los mismos. El ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 está preferentemente inmovilizado en un soporte. Se puede someter a una etapa de lavado para eliminar los contaminantes antes de llevar a cabo la detección. En tal configuración, se prefiere que el amplicón esté etiquetado y que la etiqueta se detecte en caso de que un amplicón etiquetado presente hibridación específica con el ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1.

Preferentemente, la detección se lleva a cabo de forma que un amplicón que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno asociado con una enfermedad de la piel, el cabello y las uñas se puede distinguir de un amplicón que comprende la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de otro patógeno asociado con una enfermedad de la piel, el cabello y las uñas o un amplicón que comprende una secuencia adicional o de hecho cualquier otra.

De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar un kit que comprende el par de cebadores. El par de cebadores puede ser etiquetado. Las enseñanzas inventivas proporcionan un kit, preferentemente para diagnosticar una enfermedad. El kit puede comprender instrucciones que detallen cómo utilizar el kit y un medio para poner en contacto el ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno con una muestra de un sujeto, preferentemente un sujeto humano, en un soporte, por ejemplo, un microarray. Además, el kit puede comprender un control positivo, por ejemplo uno o más ácidos nucleicos que comprenden la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno asociado con una enfermedad de la piel, el cabello y las uñas, y un control negativo, por ejemplo un ácido nucleico que carece de la SEC. ID NÚM. 22 o 1. Por último, dicho kit puede comprender una solución estándar que comprende uno o más ácidos nucleicos que comprenden la SEC. ID NÚM. 22 o 1 de un patógeno asociado con una enfermedad de la piel, el cabello y las uñas para preparar una curva de calibración. La SEC. ID NÚM. 22 o 1 es de un patógeno de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*, concretamente de un patógeno del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae* (blanco), *T. benhamiae* (africano), *T. benhamiae* (amarillo), *T. concentricum*, *T. erinacei* (africano) y *T. erinacei*.

De acuerdo con la presente invención, el par de cebadores, el portador, el ácido nucleico, la célula, el vector o el kit se pueden utilizar para el diagnóstico de una enfermedad o para la fabricación de un kit para el diagnóstico de una enfermedad, preferentemente una enfermedad de la piel, el cabello y las uñas, más preferentemente una infección de la piel, el cabello y las uñas, más preferentemente una infección fúngica de la piel, el cabello y las uñas, más preferentemente dermatofitosis. Dicha enfermedad es una infección asociada con un patógeno del género *Trichophyton*, concretamente a un patógeno del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae* (blanco), *T. benhamiae* (africano), *T. benhamiae* (amarillo), *T. concentricum* *T. erinacei* (africano) y *T. erinacei*.

En una realización preferida, el término "diagnóstico", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de procedimiento destinado a obtener información de apoyo en la evaluación de si un paciente sufre o es probable o más probable que la media o un sujeto comparativo, este último preferentemente con síntomas similares, de sufrir una determinada enfermedad o trastorno en el pasado, en el momento del diagnóstico o en el futuro, para saber cómo progresa o es probable que progrese la enfermedad en el futuro o para evaluar la capacidad de respuesta de un paciente con respecto a un determinado tratamiento, por ejemplo, la administración de medicamentos adecuados, tales como los fármacos para la desensibilización de pacientes alérgicos. En otras palabras, el término "diagnóstico" comprende no sólo el diagnóstico, sino también el pronóstico y/o el seguimiento del curso de una enfermedad o trastorno.

Por lo tanto, el término "diagnóstico" preferentemente no implica que los procedimientos o agentes de diagnóstico de acuerdo con la presente invención sean definitivos y suficientes para finalizar el diagnóstico sobre la base de una sola prueba, y mucho menos de un parámetro, sino que se puede referir a una contribución a lo que se denomina "diagnóstico diferencial", es decir, un procedimiento de diagnóstico sistemático que considera la probabilidad de una serie de posibles afecciones sobre la base de una serie de parámetros de diagnóstico. Esto puede incluir un diagnóstico indirecto, es decir, un resultado negativo significa que se puede descartar una enfermedad pero que, a su vez, es más probable que exista otra enfermedad. El término "diagnóstico" también se puede referir a un procedimiento o agente utilizado para elegir el régimen de tratamiento más prometedor para un paciente. En otras palabras, el procedimiento o agente puede estar relacionado con la selección de un régimen de tratamiento para un sujeto. El término "diagnóstico" también se puede referir a la identificación del patógeno causante de una enfermedad o a la distinción de dos patógenos estrechamente relacionados, preferentemente *T. benhamiae* (amarillo) o *T. concentricum*.

La presente invención se ilustra además por medio de las siguientes figuras, secuencias y ejemplos no limitativos de los que se pueden extraer otras características, realizaciones, aspectos y ventajas de la presente invención.

La Fig. 1 muestra una alineación de secuencias que comprende las diversas secuencias relacionadas con una metaloproteasa con motivos de secuencia de ácido nucleico compartidos y la secuencia consenso derivada.

La Fig. 2 muestra microarrays capturados con productos de PCR hibridados de *Trichophyton interdigitale* (antrofilico) (A), *Trichophyton interdigitale* (zoofilico) (B), *Trichophyton tonsurans* (C) y *Trichophyton equinum* (D). La sonda específica para *Trichophyton tonsurans* está resaltada por un círculo blanco y los puntos rodeados son controles necesarios del software para establecer la cuadrícula. Sólo los productos de la PCR de la plantilla de *Trichophyton tonsurans* (C) se hibridaron con la sonda específica (6a, 6b) y mostraron señales fluorescentes.

La Fig. 3 muestra los microarrays capturados con productos de PCR hibridados de *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (A), *Trichophyton benhamiae* (blanco) (B), *Trichophyton benhamiae* (africano) (C) y *Trichophyton concentricum* (D). Las sondas específicas para *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum* están resaltadas por un círculo blanco y los puntos rodeados son controles necesarios del software para establecer la cuadrícula. Sólo los productos de la PCR de la plantilla de *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (A) y *Trichophyton concentricum* (D) se hibridaron con las sondas específicas y mostraron señales fluorescentes.

La Fig. 4 muestra los microarrays capturados con productos de PCR hibridados de *Trichophyton benhamiae* (blanco) (A), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (B) y *Trichophyton benhamiae* (africano) (C). Las sondas

específicas para *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton benhamiae* (blanco/africano) están resaltadas por un círculo blanco y los puntos rodeados son controles necesarios del software para establecer la cuadrícula. Los productos de la PCR de la plantilla de *Trichophyton benhamiae* (blanco) (A), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (B) y *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (C) se hibridaron con las sondas específicas y mostraron señales fluorescentes.

La Fig. 5 muestra los microarrays capturados con productos de PCR hibridados de *Trichophyton erinacei* (A), *Trichophyton benhamiae* (blanco) (B) y *Trichophyton benhamiae* (africano) (C). Las sondas específicas para *Trichophyton erinacei* están resaltadas por un círculo blanco y los puntos rodeados son controles necesarios del software para establecer la cuadrícula. Sólo el producto de la PCR del molde de *Trichophyton erinacei* (A) hibridó con la sonda específica y mostró señales fluorescentes.

La Fig. 6 muestra microarrays capturados con productos de PCR hibridados de *Trichophyton benhamiae* (blanco) (A), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (B) y *Trichophyton concentricum* (C). Las sondas específicas para *Trichophyton benhamiae* (blanco/africano), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum* están resaltadas por un círculo blanco y los puntos rodeados son controles necesarios del software para establecer la cuadrícula. Sólo los productos de la PCR de la plantilla de *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum* hibridaron con la sonda específica y mostraron señales fluorescentes.

La presente invención se refiere a las siguientes secuencias de ácido nucleico (presentadas en orientación 5'-3'):

SEC. ID NÚM. 1:

Secuencia de consenso del ácido nucleico relacionado con la metaloproteasa que se va a amplificar

CACNNNNNTAACCCNTACCCnnnnTCCnnGnnGnnnGGnnnnnnAnCnnnTGGATTATGGnnTn  
nTTCGTGGAnTAnGGTnnnnAnnCGATCnTGnnnATGGCACTnnTnGGTnnnnTGnGnCAnnTn  
CCAAAAGnnGnnGCAGGGnnnnACCnnnTTnnnnnnTGGnAnGGTGTAGGCAATnnTnTGnG  
nCnnCATCGnnGAnGnnnATCGnnGnAGnA

SEC. ID NÚM. 2:

Secuencia diana relacionada con la metaloproteasa de *T. tonsurans*

CACGCTTATAACCGTACCCGAGATCCTTGGCGTACGGATGCATAACGGCTGGATTATGG  
GCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGCGATCTTGATGATGGCACTTATCGGTGAGATG  
AGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGCAGGGGAAGACCGAATTCATGGCTGGGAGGGTGTAG  
GCAATAGTTCTGGGACGGCATCGTCGATGTTTATCGTAGCAGAACCACTGAACAGGGC  
CACCTCTGAAACGGATGCTTTGAAATCGAGTAGAGATGCATGGAAACCTCCTTCCTG  
GTTGCAGAATC

SEC. ID NÚM. 3:

Secuencia diana relacionada con la metaloproteasa de *T. equinum*

CACGCTCATAACCGTACCCGAGATCCTTGGCGTACGGACGCATAACGGCTGGATTATG  
GGCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGCGATCTTGATGATGGCACTTATCGGTGAGAT  
GAGGCAGTTGCCAAAAGATGTAGCAGGGGAAGACCGAATTCATGGCTGGGAGGGTGTG  
GGCAATAGTTCTGGGACGGCATCGTCGATGTTTATCGTAGCAGAACCACTGAACAGGG  
CCACCCTCTGAAACGGATGCTTTGAAATCGAGTAGAGATGCATGGAAACCTCCTTCCT  
GTTGCAGAATC

SEC. ID NÚM. 4:

Secuencia diana relacionada con la metaloproteasa de *T. interdigitale* (antrofilica + zoofilica), I, II, III\*, IV, M

CACGGTAATAACCGTACCCGAGGTCCCCGGCGTGCGGACTCATAACGGCTGGATTATG  
GGCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGCGATCTTGACCATGGCACTTCTTGGTGTAGAT  
GGGGCAGTTGCCAAAAGATGTGCGAGGGAAAGACCGAATTCATGGCTGGGAGGGTGTG  
GGCAATAGTTCTGCGACGGCATCGTCGATGTTTATCGTGGCAGAACCACTTAACAGGGC  
CACCTCTGAAACGGATGCTTTGAAATCGAGTTGAGATGCGCGGAAACCTCCTTCCTG  
GTTGCAGGATC

SEC. ID NÚM. 5:

Secuencia diana relacionada con la metaloproteasa de *T. benhamiae* (amarillo)

CTCCGGTGAGAGAGTGC AATTGCACGATCGTAACCGTACCCCAAGTCCTTGCAGAACG  
 GTGTAACAACCCTTGGATTATGGAGTAATTCGTGGATTATGGTGTGACACGATCCTGG  
 CCATGGCACTTATTGGTTTGGTGGGGCAGTTGCCAAAAGATGGAGCAGGGGAAGACCG  
 AGTTCTCGCCTGGAAGGGTGTAGGCAATGATTTTGGCCTACATCGGTGACGTGCATC  
 GGAGCAGTAC

SEC. ID NÚM. 6:  
 Secuencia diana relacionada con la metaloproteasa de *T. benhamiae* (blanco)

CTCTGGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGATTGTAACCATACCCATGGTCCTTGCAGTGCG  
GTGTGACAGCATTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGATTACGGTCCCGACACGATCCTGA  
 CGATGGCACTCATTGGTGCAGTGGGGCAGTTGCCAAAAGAGGGAGCAGGGGTGAACC  
 TCATTCTAGCTGAAAAGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACTGCATCGGCGAGGACCAT  
 CGGAGCAGAAC

5 SEC. ID NÚM. 7:  
 Secuencia diana relacionada con la metaloproteasa *T. benhamiae* (africano)

CTCTTGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGCTGATAACCGTACCCATGGTCCTTGCAGTGCG  
GCTTGACAACACTTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGACTACGGTCCCGATACGATCCTGA  
 CGATGGCACTTATTGGTGCAGTGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTCGCAGGGGTGAACCT  
 CATTCTAGATGAAAAGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACCGCATCGGCGAGGACCATC  
 GGAGCAGAAC

SEC. ID NÚM. 8:  
 Secuencia diana relacionada con la metaloproteasa de *T. concentricum*

10 CTCCGGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGATTGTAACCGTACCCCAAGTCCTTGCAGAACG  
 GTGTAACAACACTTGGATTATGGAGTAATTCGTGGATTATGGTGTGACACGATCCTGG  
 CCATGGCACTTATTGGTTTGGTGGGGCAGTTGCCAAAAGTTGGGGCAGGGGAAGACCG  
 AGTTCTCGCCTGGAAGGGTGTAGGCAATGGTTCTGGCCTACATCGGTGACGTGCATC  
 GGAGTAGTAC

SEC. ID NÚM. 9:  
 Secuencia diana relacionada con la metaloproteasa de *T. erinacei*

CTCCCGTGAGAGAGTGCAGTTGCACTACTGTAACCGTACCCATGGTCCTTGCAGTGTTG  
GGTTAGCAACACTTGGATTATGGAGTGCTTCGTGGATTACGGTCCCAACACGATCCTGA  
 CCATGGCACTTCTTGGTTTGTGCGCCATATCCAAAAGATGGGGCAGGGGTGAACCTC  
 ATTGTTAGATGGAAGGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACCGCATCGGCGAGGACCATCG  
 GAGCAGTA

15 SEC. ID NÚM. 10:  
 Cebador directo universal (*Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton interdigitale* (antrofilico + zoofilico) I, II, III, III\*, IV, M):  
 GGGAGGGAGACTAGTTG

20 SEC. ID NÚM. 11:  
 Cebador directo universal (*Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (africano), *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton erinacei*)  
 GCATTTCCCATGGCT

25 SEC. ID NÚM. 12:  
 Cebador inverso universal (*Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton interdigitale* (antrofilico + zoofilico) I, II, III, III\*, IV, M)  
 AATTTTTCGCCGCAAG

30 SEC. ID NÚM. 13:  
 Cebador inverso universal (*Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (africano), *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton erinacei*)  
 TGGCTGTACGTG

SEC. ID NÚM. 14:

*Sonda Trichophyton tonsurans*  
GATCCTTGCGTACGGATGCATA

5 SEC. ID NÚM. 15:  
*Sonda Trichophyten equinum*  
AGATCCCTGGCGTGCG

SEC. ID NÚM. 16:  
*Trichophyton interdigitale* (antrofilica + zoofilica) I, II, III, III\*, IV, M sonda  
GAGATGCGCGGAAACCTC

10 SEC. ID NÚM. 17:  
*Trichophyton benhamiae* (amarillo) sonda  
GTGTAGGCAATGATTTTGGCCTACAT

SEC. ID NÚM. 18:  
*Trichophyton benhamiae* (blanco) sonda  
TGCAGTGCGGTGACCATTTGG

15 SEC. ID NÚM. 19:  
*Sonda Trichophyton benhamiae* (africano)  
CAGTGCGGCTTGACAACAC

20 SEC. ID NÚM. 20:  
*Sonda Trichophyton concentricum*  
AAAGTTGGGCAGGGAAGA

SEC. ID NÚM. 21:  
*Sonda Trichophyton erinacei*  
TTGCAGTGTGGTAGCAACATTTG

25 SEC. ID NÚM. 22:  
*Secuencia de consenso*

cacnnnnntaacntaccnntccnngnngnngnngnncnntggattatggnntnttctgtggantanggtnn  
nnanncgatcntgnnntatggcactnntnggtgnntgnncanntnccaaaagnngnngcaggggnnnaccnntntnnn  
nntggnanggtgtaggcaatnnttgnncnncatcgngngangnnnatcgngnagna

SEC. ID NÚM. 23:  
*Cebador*  
ctggccatggcacttattgg

30 SEC. ID NÚM. 24:  
*Sonda*  
Gatgtaggccaaaatcattgcctacac

35 SEC. ID NÚM. 25:  
*Sonda*  
ctgccccaaactttggcaactg

SEC. ID NÚM. 26:  
*Sonda*  
taggcaatgatttggccta

40 SEC. ID NÚM. 27:  
*Sonda*  
catcggcgaggaccatcgga

SEC. ID NÚM. 28:  
*Sonda*  
gcaatggttctggcctacac

45 SEC. ID NÚM. 29:  
*Secuencia de T. rubrum*

ctttgtgagagagtccagttgcacgcctgaaccgtaccogaagtccttgagtagcggttggccacattggattatggagtgttc  
gtggactatagtggtgacacgatcctgaccatggcacttattggtccagtgggtagttgccaaaaggggcccaggggaagac  
cgcattctgaatggaagagtgtaggcaatggtctggcctacatcggtagcatatcgagcagtg

SEC. ID NÚM. 30:

Secuencia de *T. verrucosum*

```
ctattgggagggagtcacgttgcaactcctgtaaccgtaccatggtccttggcgtgcggggacataacattggattatgggctcctt
cgtggattacgggtcccaacacacgatcctgacgatggcactccttggtagcgtggggcagttgccaaaagggggggcaggggaag
accgaattcatagatggaaggggtgtaggcaatggttctgggactgcatcgccgatattatcgagcagaac
```

5 **Ejemplos:** Los siguientes ejemplos demuestran que se pueden distinguir diferentes cepas de patógenos mediante el uso de las enseñanzas de acuerdo con la presente invención.

### Ejemplo 1

#### Diseño de cebadores y sondas

10 Para la identificación de *T. tonsurans* en una muestra, se eligió el gen de la metaloproteasa como una región diana útil. A partir de la comparación de las secuencias de oligonucleótidos, se diseñó un conjunto de cebadores (cebador directo 5' cy3- GGGAGGAGACTAGTTG 3', cebador inverso 5' cy3-AATTCGCCGCAAG 3') y una sonda específica para la especie (5' C6-Amino-enlazador-GATCCTTGGCGTACGATGCATA 3') para la detección de *Trichophyton tonsurans*. Las sondas diseñadas se comprobaron en cuanto a repeticiones internas, estructura secundaria, temperatura de fusión y contenido de GC.

#### Microarray de ADN

15 La sonda diseñada para *T. tonsurans* y algunos controles se mancharon con el sciFLEXARRAYER S11 (Scienion AG, Alemania) en un material de soporte sólido como manchas microscópicas pequeñas situadas en posiciones definidas.

#### Extracción de ADN de cultivos de dermatofitos

20 Los cultivos se llevaron a cabo en un medio de prueba para dermatofitos (SIFIN, Alemania, TN 2102). El ADN de los cultivos de *T. tonsurans* (CBS 483.76), *T. interdigitale antrophilic/zoophilic* (2235, Pelo1) y *T. equinum* (CBS 127.97) se extrajo mediante el uso del kit OmniPrep™ para Hongos (G-Biosciences, EE.UU., Núm. 786-399) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se identificó a nivel de especie por medio de la secuenciación del espaciador de transcripción interna (ITS).

#### PCR

25 Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl por medio de la adición de 5 µl de extracto de ADN (5 ng/µl) de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton interdigitale (antrophilico)*, *Trichophyton interdigitale (zoofilico)* o *Trichophyton equinum*. Cada reacción contenía 1 x tampón verde GoTaq® Flexi (Promega, EE.UU., X9801), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega, EE.UU., X9801), 0,4 mM de cada dNTP (25 mM cada uno) (Bioline, Alemania, BIO-39029), 0,75 U de GoTaq® Flexi ADN Polimerasa (5 U/µl) (Promega, USA, M830), 0,5 µM de cebador directo y 0,5 µM de cebador inverso (Metabion, Alemania). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, EE.UU., Núm. 4359659) y consistió en una etapa de pre-fusión durante 3 min a 96 °C y 35 ciclos de 30 15 s a 96 °C (fusión), 15 s a 52 °C (recocido), 40 s a 72 °C (extensión) y finalizó con un mantenimiento de 1 min a 72 °C.

#### Hibridación

35 Los amplicones resultantes de la reacción de PCR comprendían un colorante fluorescente unido al extremo 5' de los cebadores directo y/o inverso, lo que hace que el amplicón sea detectable por un escáner de micromatrices (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101) si los productos de PCR se unen a la sonda complementaria en la micromatriz. Para la etapa de hibridación, se mezclaron 25 µl de productos de PCR con 65 µl de tampón de hibridación A (EUROIMMUN AG, tampón de hibridación A, ZM0101-0108). 65 µl de esta mezcla se 40 hibridaron en el microarray por medio de la técnica Titerplane de EUROIMMUN (EUROIMMUN AG, titerplane + estación de hibridación, ZM 9999-0105 + YG 0615-0101). Tras una hora de incubación a 55 °C, los portaobjetos EUROArray se lavaron con soluciones tampón especiales, de acuerdo con el protocolo del fabricante, para eliminar las secuencias de unión no específicas (EUROIMMUN AG, reactivo de lavado 1 + 2, ZM 0121-0050 + ZM0122-0012). Tras el lavado, los portaobjetos se secaron con aire comprimido y sólo quedaron hibridadas las hebras 45 fuertemente emparejadas. La hibridación con el producto de la PCR etiquetado generó una señal que se detectó a través del escáner del microarray.

#### Lectura y evaluación

50 La lectura final de los datos y su evaluación se llevaron a cabo con el software EUROArrayScanner y EUROArrayScan (EUROIMMUN AG, software EUROArrayScan, YG 0901-0101). En la **Fig. 2** se muestran los microarrays capturados con productos de PCR hibridados de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton interdigitale (antrophilico)*, *Trichophyton interdigitale (zoofilico)* y *Trichophyton equinum*.

La sonda específica para *Trichophyton tonsurans* está resaltada por un círculo blanco y los puntos rodeados son controles necesarios del software para establecer la cuadrícula. Sólo los productos de la PCR del molde de *Trichophyton tonsurans* (C) se hibridaron con la sonda específica (6a, 6b) y mostraron señales fluorescentes, que están ausentes cuando se utiliza ADN de cualquiera de los otros trenes.

- 5 Esto demuestra que el procedimiento inventivo se puede utilizar para distinguir las cepas de *Trichophyton* asociadas con una enfermedad de la piel, el cabello y las uñas.

## Ejemplo 2

### Material y procedimientos

10 Los microarrays de ADN consisten en moléculas de ADN (sondas) que se diferencian entre sí por su secuencia de ADN. Cuando el ADN de un organismo contiene segmentos que coinciden con estas sondas definidas en el microarray, las regiones de ADN complementarias se unen (hibridan). Gracias a los cebadores marcados con fluorescencia que se utilizan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se puede detectar una hibridación positiva entre la sonda y la secuencia diana amplificada a través del escáner del microarray. Una señal positiva evaluada significa que la secuencia diana pudo ser detectada. En este ejemplo se mostrará la detección del dermatofito *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum* por medio de un microarray de ADN. Para verificar la especificidad de la sonda, también se incluyeron en el análisis las especies más estrechamente relacionadas *Trichophyton benhamiae* (blanco) y *Trichophyton benhamiae* (africano). El procedimiento utilizado se basa en la plataforma de microarrays de ADN EUROIMMUN.

### Diseño de cebadores y sondas

20 Para la identificación de *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum* en una muestra se eligió el gen de la metaloproteasa como una región diana útil. En base a la comparación de las secuencias de oligonucleótidos, se creó un conjunto de cebadores (cebador directo 5' cy3-CTGGCCATGGCACTTATTGG 3' cebador inverso 5' cy3-TGGCTGTTACGTG 3') y sondas específicas de la especie para la detección de *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (5' C6-Amino-enlazador- GATGTAGGCCCAAAATCATTGCCTACAC 3') y *Trichophyton concentricum* (5' C6-Amino-enlazador- CTGCCCAACTTTGGCAACTG 3'). Las sondas diseñadas se comprobaron en cuanto a repeticiones internas, estructura secundaria, temperatura de fusión (Tm) y contenido de GC.

### Microarray de ADN

30 La sonda diseñada para *Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton concentricum* y algunos controles se mancharon con el sciFLEXARRAYER S11 (Sciencion AG, Alemania) en un material portador sólido como manchas microscópicas pequeñas situadas en posiciones definidas.

### Extracción de ADN de cultivos de dermatofitos

35 Los cultivos se llevaron a cabo en un medio de prueba para dermatofitos (SIFIN, Alemania, TN 2102). El ADN de los cultivos de *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (CBS 623.66), *Trichophyton benhamiae* (blanco) (CBS 280.83), *Trichophyton benhamiae* (africano) (CBS 808.72) y *Trichophyton concentricum* (CBS 563.83) se extrajeron mediante el uso del kit OmniPrep™ para Hongos (G-Biosciences, EE.UU., Núm. 786-399) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se identificaron a nivel de especie por medio de la secuenciación del espaciador de transcripción interna (ITS).

### PCR

40 Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl por medio de la adición de 5 µl de extracto de ADN (5 ng/µl) de *Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (africano) y *Trichophyton concentricum*. Cada reacción contenía 1 x tampón verde GoTaq® Flexi (Promega, USA, X9801), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega, USA, X9801), 0,4 mM de cada dNTP (25 mM cada uno) (Bioline, Germany, BIO-39029), 075 U de GoTaq® Flexi ADN Polimerasa (5 U/µl) (Promega, USA, M830), 0,8 µM de cebador directo y 0,4 µM de cebador inverso (Metabion, Alemania). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, EE.UU., Núm. 4359659) y consistió en un una etapa de pre-fusión durante 3 min a 96 °C y 35 ciclos de 15 s a 96 °C (fusión), 15 s a 52 °C (recocido), 40 s a 72 °C (extensión) y finalizó con un mantenimiento de 1 min a 72 °C.

### Hibridación

50 Los productos de PCR resultantes se marcaron con un colorante fluorescente, que permite detectarlos con el escáner de microarrays (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101) si los productos de PCR se unen a la sonda complementaria del microarray. Para la etapa de hibridación se mezclaron 25 µl de productos de PCR con 65 µl de tampón de hibridación A (EUROIMMUN AG, tampón de hibridación A, ZM0101-0108). 65 µl de esta mezcla se hibridaron en el microarray por medio de la técnica Titerplane de EUROIMMUN (EUROIMMUN AG, titerplane +

estación de hibridación, ZM 9999-0105 + YG 0615-0101). Tras una hora de incubación a 55 °C, los portaobjetos EUROArray se lavaron con soluciones tampón especiales, de acuerdo con el protocolo del fabricante, para eliminar las secuencias de unión no específicas (EUROIMMUN AG, reactivo de lavado 1 + 2, ZM 0121-0050 + ZM0122-0012). Tras el lavado, los portaobjetos se secaron con aire comprimido y sólo quedaron hibridadas las hebras fuertemente emparejadas. La hibridación con el producto de la PCR etiquetado generó una señal que se detectó por medio del escáner de microarrays.

### Lectura y evaluación

La lectura final de los datos y su evaluación se llevaron a cabo con el software EUROArrayScanner y EUROArrayScan (EUROIMMUN AG, software EUROArrayScan, YG 0901-0101). En la Figura 3 se muestran los microarrays con productos de PCR hibridados de *Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (africano) y *Trichophyton concentricum*. Las cepas se identificaron como *Trichophyton benhamiae* (amarillo) o *Trichophyton concentricum* cuando las sondas específicas (círculo blanco en la Fig. 3) se hibridaron con productos de PCR marcados con cy3 y los controles en el microarray también mostraron señales fluorescentes debido a una hibridación entre los oligonucleótidos marcados en el tampón de hibridación y las secuencias de la sonda en la esquina del array.

### Ejemplo 3

#### Material y procedimientos

Los microarrays de ADN consisten en moléculas de ADN (sondas) que se diferencian entre sí por su secuencia de ADN. Cuando el ADN de un organismo contiene segmentos que coinciden con estas sondas definidas en el microarray, las regiones de ADN complementarias se unen (hibridan). Gracias a los cebadores marcados con fluorescencia que se utilizan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se puede detectar una hibridación positiva entre la sonda y la secuencia diana amplificada a través del escáner del microarray. Una señal positiva evaluada significa que la secuencia diana pudo ser detectada. En este ejemplo se mostrará la detección del dermatofito *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton benhamiae* (blanco/africano) por medio de un microarray de ADN. El procedimiento utilizado se basa en la plataforma de microarrays de ADN EUROIMMUN.

#### Diseño de cebadores y sondas

Para la identificación de *Trichophyton benhamiae* (amarillo) o *Trichophyton benhamiae* (blanco/africano) en una muestra se eligió el gen de la metaloproteasa como una región diana útil. En base a la comparación de las secuencias de oligonucleótidos, se creó un conjunto de cebadores (cebador directo 5' cy3-CTGGCCATGGCACTTATTGG 3' cebador inverso 5' cy3- TGGCTGTTACGTG 3') y sondas específicas para la detección de *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (5' C6-Amino- TAGGCAATGATTGGGCCTA 3') y *Trichophyton benhamiae* (blanco/africano) (5' C6-Amino- CATCGGCGAGGACCATCGGA 3'). Las sondas diseñadas se comprobaron en cuanto a repeticiones internas, estructura secundaria, temperatura de fusión (Tm) y contenido de GC.

#### Microarray de ADN

La sonda diseñada para *Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton benhamiae* (blanco/africano) y algunos controles se mancharon con el sciFLEXARRAYER S11 (Sciencion AG, Alemania) en un material portador sólido como manchas microscópicas pequeñas situadas en posiciones definidas.

#### Extracción de ADN de cultivos de dermatofitos

Los cultivos se llevaron a cabo en un medio de prueba para dermatofitos (SIFIN, Alemania, TN 2102). El ADN de los cultivos de *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (CBS 623.66), *Trichophyton benhamiae* (blanco) (CBS 280.83) y *Trichophyton benhamiae* (africano) (CBS 808.72) se extrajo mediante el uso del kit OmniPrep™ para Hongos (G-Biosciences, EE.UU., Núm. 786-399) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se identificó a nivel de especie por medio de la secuenciación del espaciador de transcripción interna (ITS).

#### PCR

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl por medio de la adición de 5 µl de extracto de ADN (5 ng/µl) de *Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton benhamiae* (blanco) y *Trichophyton benhamiae* (africano). Cada reacción contenía 1 x tampón verde GoTaq® Flexi (Promega, USA, X9801), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega, USA, X9801), 0,4 mM de cada dNTP (25 mM cada uno) (Bioline, Germany, BIO-39029), 075 U de GoTaq® Flexi ADN Polimerasa (5 U/µl) (Promega, USA, M830), 0,4 µM de cebador directo y 1,6 µM de cebador inverso (Metabion, Alemania). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, EE.UU., Núm. 4359659) y consistió en una etapa de pre-fusión durante 3 min a 96 °C y 35 ciclos de 15 s a 96 °C (fusión), 15 s a 52 °C (recocido), 40 s a 72 °C (extensión) y finalizó con un mantenimiento de 1 min a 72 °C.

## Hibridación

Los productos de PCR resultantes se marcaron con un colorante fluorescente, que permite detectarlos con el escáner de microarrays (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101) si los productos de PCR se unen a la sonda complementaria del microarray. Para la etapa de hibridación se mezclaron 25 µl de productos de PCR con 65 µl de tampón de hibridación A (EUROIMMUN AG, tampón de hibridación A, ZM0101-0108). 65 µl de esta mezcla se hibridaron en el microarray por medio de la técnica Titerplane de EUROIMMUN (EUROIMMUN AG, titerplane + estación de hibridación, ZM 9999-0105 + YG 0615-0101). Tras una hora de incubación a 55 °C, los portaobjetos EUROArray se lavaron con soluciones tampón especiales, de acuerdo con el protocolo del fabricante, para eliminar las secuencias de unión no específicas (EUROIMMUN AG, reactivo de lavado 1 + 2, ZM 0121-0050 + ZM0122-0012). Tras el lavado, los portaobjetos se secaron con aire comprimido y sólo quedaron hibridadas las hebras fuertemente emparejadas. La hibridación con el producto de la PCR etiquetado generó una señal que se detectó por medio del escáner de microarrays.

## Lectura y evaluación

La lectura final de los datos y su evaluación se llevaron a cabo con el software EUROArrayScanner y EUROArrayScan (EUROIMMUN AG, software EUROArrayScan, YG 0901-0101). En la Figura 4 se muestran los microarrays con productos de PCR hibridados de las plantillas de *Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton benhamiae* (blanco) y *Trichophyton benhamiae* (africano). Las cepas se identificaron como *Trichophyton benhamiae* (amarillo) o *Trichophyton benhamiae* (blanco/africano) cuando las sondas específicas (círculo blanco en la Fig. 4) se hibridaron con productos de PCR marcados con cy3 y los controles en el microarray también mostraron señales fluorescentes debido a una hibridación entre los oligonucleótidos marcados en el tampón de hibridación y las secuencias de la sonda en la esquina del array.

## Ejemplo 4

### Material y procedimientos

Los microarrays de ADN consisten en moléculas de ADN (sondas) que se diferencian entre sí por su secuencia de ADN. Cuando el ADN de un organismo contiene segmentos que coinciden con estas sondas definidas en el microarray, las regiones de ADN complementarias se unen (hibridan). Gracias a los cebadores marcados con fluorescencia que se utilizan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se puede detectar una hibridación positiva entre la sonda y la secuencia diana amplificada a través del escáner del microarray. Una señal positiva evaluada significa que la secuencia diana pudo ser detectada. En este ejemplo se mostrará la detección del dermatofito *Trichophyton erinacei* por medio de un microarray de ADN. Para verificar la especificidad de la sonda, también se incluyeron en el análisis las especies más estrechamente relacionadas *Trichophyton benhamiae* (blanco) y *Trichophyton benhamiae* (africano). El procedimiento utilizado se basa en la plataforma de microarrays de ADN EUROIMMUN.

### Diseño de cebadores y sondas

Para la identificación de *Trichophyton erinacei* en una muestra se eligió el gen de la metaloproteasa como una región diana útil. A partir de la comparación de las secuencias de oligonucleótidos se diseñó un conjunto de cebadores (cebador directo 5' cy3- CTGGCCATGGCACTTATTGG 3', cebador inverso 5' cy3-TGGCTGTTACGTG 3') y una sonda específica para la detección de *Trichophyton erinacei* (5' C6-Amino-enlazador-GATGTAGGCCCAAATCATTGCCTACAC 3'). La sonda diseñada se comprobó en cuanto a repeticiones internas, estructura secundaria, temperatura de fusión (Tm) y contenido de GC.

### Microarray de ADN

La sonda diseñada para *Trichophyton erinacei* y algunos controles se mancharon con el sciFLEXARRAYER S11 (Scienion AG, Alemania) en un material de soporte sólido como manchas microscópicas pequeñas situadas en posiciones definidas.

### Extracción de ADN de cultivos de dermatofitos

Los cultivos se llevaron a cabo en un medio de prueba para dermatofitos (SIFIN, Alemania, TN 2102). El ADN de los cultivos de *Trichophyton erinacei* (CBS 677.86), *Trichophyton benhamiae* (blanco) (CBS 280.83) y *Trichophyton benhamiae* (africano) (CBS 808.72) se extrajo mediante el uso del kit OmniPrep™ para Hongos (G-Biosciences, EE.UU., Núm. 786-399) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se identificó a nivel de especie por medio de la secuenciación del espaciador de transcripción interna (ITS).

### PCR

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl por medio de la adición de 5 µl de extracto de ADN (5 ng/µl) de *Trichophyton erinacei*, *Trichophyton benhamiae* (blanco) y *Trichophyton benhamiae* (africano). Cada reacción contenía 1 x tampón verde GoTaq® Flexi (Promega, USA, X9801), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega, USA, X9801), 0,4 mM de cada dNTP (25 mM cada uno) (Bioline, Germany, BIO-39029), 075 U de GoTaq® Flexi ADN Polimerasa (5 U/µl) (Promega, USA, M830), 0,5 µM de cebador directo y 0,5 µM de cebador inverso (Metabion,

Alemania). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, EE.UU., Núm. 4359659) y consistió en una etapa de pre-fusión durante 3 min a 96 °C y 35 ciclos de 15 s a 96 °C (fusión), 15 s a 52 °C (recocido), 40 s a 72 °C (extensión) y finalizó con un mantenimiento de 1 min a 72 °C.

### Hibridación

5 Los productos de PCR resultantes se marcaron con un colorante fluorescente, que permite detectarlos con el escáner de microarrays (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101) si los productos de PCR se unen a la sonda complementaria del microarray. Para la etapa de hibridación se mezclaron 25 µl de productos de PCR con 65 µl de tampón de hibridación A (EUROIMMUN AG, tampón de hibridación A, ZM0101-0108). 65 µl de esta mezcla se hibridaron en el microarray por medio de la técnica Titerplane de EUROIMMUN (EUROIMMUN AG, titerplane + 10 estación de hibridación, ZM 9999-0105 + YG 0615-0101). Tras una hora de incubación a 55 °C, los portaobjetos EUROArray se lavaron con soluciones tampón especiales, de acuerdo con el protocolo del fabricante, para eliminar las secuencias de unión no específicas (EUROIMMUN AG, reactivo de lavado 1 + 2, ZM 0121-0050 + ZM0122-0012). Tras el lavado, los portaobjetos se secaron con aire comprimido y sólo quedaron hibridadas las hebras fuertemente emparejadas. La hibridación con el producto de la PCR etiquetado generó una señal que se detectó por 15 medio del escáner de microarrays.

### Lectura y evaluación

La lectura final de los datos y su evaluación se llevaron a cabo con el software EUROArrayScanner y EUROArrayScan (EUROIMMUN AG, software EUROArrayScan, YG 0901-0101). En la Figura 5 se muestran los 20 microarrays con productos de PCR hibridados de las plantillas de *Trichophyton erinacei*, *Trichophyton benhamiae* (blanco) y *Trichophyton benhamiae* (africano). Las cepas se identificaron como *Trichophyton erinacei* cuando la sonda específica (círculo blanco en la Fig. 5) se hibridó con productos de PCR marcados con cy3 y los controles en el microarray también mostraron señales fluorescentes debido a una hibridación entre los oligonucleótidos marcados en el tampón de hibridación y las secuencias de la sonda en la esquina del array.

### Ejemplo 5

#### 25 Material y procedimientos

Los microarrays de ADN consisten en moléculas de ADN (sondas) que se diferencian entre sí por su secuencia de ADN. Cuando el ADN de un organismo contiene segmentos que coinciden con estas sondas definidas en el microarray, las regiones de ADN complementarias se unen (hibridan). Gracias a los cebadores marcados con fluorescencia que se utilizan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se puede detectar una hibridación 30 positiva entre la sonda y la secuencia diana amplificada a través del escáner del microarray. Una señal positiva evaluada significa que la secuencia diana pudo ser detectada. En este ejemplo se mostrará la detección del dermatofito *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum* por medio de un microarray de ADN. El procedimiento utilizado se basa en la plataforma de microarrays de ADN EUROIMMUN.

#### 35 Diseño de cebadores y sondas

Para la identificación de *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum* en una muestra se eligió el gen de la metaloproteasa como una región diana útil. En base a la comparación de las secuencias de oligonucleótidos, se ha creado un conjunto de cebadores (cebador directo 5' cy3-GCATTTCATGGCT 3', cebador inverso 5' cy3-TGGCTGTTACGTG 3') y sondas específicas de la especie para 40 la detección de *Trichophyton benhamiae* (blanco/africano) (5' C6-Amino-enlazador- CATCGAGGACCATCGGA 3'), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (5' C6-Amino-enlace- TAGGCAATGATTGGGCCTA 3') y *Trichophyton concentricum* (5' C6-Amino-enlace- GCAATGGTTCTGGCCTACATC 3'). Las sondas diseñadas se comprobaron en cuanto a repeticiones internas, estructura secundaria, temperatura de fusión (Tm) y contenido de GC.

### Microarray de ADN

45 Las sondas diseñadas para *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton concentricum* y algunos controles se mancharon con el sciFLEXARRAYER S11 (Scienion AG, Alemania) en un material portador sólido como manchas microscópicas pequeñas situadas en posiciones definidas.

### Extracción de ADN de cultivos de dermatofitos

Los cultivos se llevaron a cabo en un medio de prueba para dermatofitos (SIFIN, Alemania, TN 2102). El ADN de los 50 cultivos de *Trichophyton benhamiae* (africano) (CBS 808.72), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) (CBS 623.66) y *Trichophyton concentricum* (CBS 563.83) se extrajo mediante el uso del kit OmniPrep™ para Hongos (G-Biosciences, EE.UU., Núm. 786-399) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se identificó a nivel de especie por medio de la secuenciación del espaciador de transcripción interna (ITS).

**PCR**

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl por medio de la adición de 5 µl de extracto de ADN (5 ng/µl) de *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (amarillo), *Trichophyton concentricum*. Cada reacción contenía 1 x tampón verde GoTaq® Flexi (Promega, USA, X9801), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega, USA, X9801), 0,4 mM de cada dNTP (25 mM cada uno) (Bioline, Germany, BIO-39029), 075 U de GoTaq® Flexi ADN Polimerasa (5 U/µl) (Promega, USA, M830), 1,0 µM de cebador directo y 1,0 µM de cebador inverso (Metabion, Alemania). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, EE.UU., Núm. 4359659) y consistió en una etapa de pre-fusión durante 3 min a 96 °C y 35 ciclos de 15 s a 96 °C (fusión), 15 s a 52 °C (recocido), 40 s a 72 °C (extensión) y finalizó con un mantenimiento de 1 min a 72 °C.

**Hibridación**

Los productos de PCR resultantes se marcaron con un colorante fluorescente, que permite detectarlos con el escáner de microarrays (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101) si los productos de PCR se unen a la sonda complementaria del microarray. Para la etapa de hibridación se mezclaron 25 µl de productos de PCR con 65 µl de tampón de hibridación A (EUROIMMUN AG, tampón de hibridación A, ZM0101-0108). 65 µl de esta mezcla se hibridaron en el microarray por medio de la técnica Titerplane de EUROIMMUN (EUROIMMUN AG, titerplane + estación de hibridación, ZM 9999-0105 + YG 0615-0101). Tras una hora de incubación a 55 °C, los portaobjetos EUROArray se lavaron con soluciones tampón especiales, de acuerdo con el protocolo del fabricante, para eliminar las secuencias de unión no específicas (EUROIMMUN AG, reactivo de lavado 1 + 2, ZM 0121-0050 + ZM0122-0012). Tras el lavado, los portaobjetos se secaron con aire comprimido y sólo quedaron hibridadas las hebras fuertemente emparejadas. La hibridación con el producto de la PCR etiquetado generó una señal que se detectó a través del escáner del microarray.

**Lectura y evaluación**

La lectura final de los datos y su evaluación se llevaron a cabo con el software EUROArrayScanner y EUROArrayScan (EUROIMMUN AG, software EUROArrayScan, YG 0901-0101). En la Figura 6 se muestran los microarrays con productos de PCR hibridados de *Trichophyton benhamiae* (blanco), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum*. Las cepas se identificaron como *Trichophyton benhamiae* (blanco-africano), *Trichophyton benhamiae* (amarillo) y *Trichophyton concentricum* cuando la sonda específica (círculo blanco en la Fig. 6) se hibridó con productos de PCR marcados con cy3 y los controles en el microarray también mostraron señales fluorescentes debido a una hibridación entre los oligonucleótidos marcados en el tampón de hibridación y las secuencias de la sonda en la esquina del array.

**Listado de secuencias**

<110> EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG

<120> Ensayo para el diagnóstico de la dermatofitosis

<130> 14PP038EP

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 220

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso del ácido nucleico a amplificar

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(8)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14)..(14)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(23)

<223> n es a, c, g, o t

<220> <221> misc\_feature

<222> (27)..(28)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (30)..(31)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (33)..(35)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (38)..(43)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (45)..(45)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (47)..(49)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (60)..(61)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (63)..(64)  
 30 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (73)..(73)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (76)..(76)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (80)..(83)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (85)..(86)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (92)..(92)  
 50 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (95)..(97)  
 <223> n es a, c, g, o t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (106)..(107)  
 <223> n es a, c, g, o t

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (109)..(109)  
 <223> n es a, c, g, o t

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (113)..(116)  
 <223> n es a, c, g, o t

15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (119)..(119)  
 <223> n es a, c, g, o t

20

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (121)..(121)  
 <223> n es a, c, g, o t

25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (124)..(125)  
 <223> n es a, c, g, o t

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (127)..(127)  
 <223> n es a, c, g, o t

35

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (135)..(136)  
 <223> n es a, c, g, o t

40

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (138)..(139)  
 <223> n es a, c, g, o t

45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (146)..(149)  
 <223> n es a, c, g, o t

50

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (153)..(155)  
 <223> n es a, c, g, o t

55

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (158)..(163)  
 <223> n es a, c, g, o t

60

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (167)..(167)  
 <223> n es a, c, g, o t

65

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (169)..(169)

<223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (182)..(183)  
 5 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (186)..(186)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (189)..(189)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (191)..(191)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (193)..(194)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (200)..(201)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (204)..(204)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (206)..(208)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (213)..(214)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (216)..(216)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (219)..(219)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400>1

cacnnnnnta accntaccn nnntccnngn ngnnnggnnn nnnancnnt ggattatggn	60
ntnnttcgtg gantanggn nnnanncgat cntgnnnatg gcactnntng gtnnntng	120
ncanntcca aaagnngng cagggnnna ccnnttnnn nnntggnang gtgtaggcaa	180
tnnttntgng ncnnatcgn ngangnnat cgnngnagna	220

<210> 2  
 <211> 304

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana de T. tonsurans	
5	<400>2	
	cacgcttata accgtaccog agatccttgg cgtacggatg cataacggct ggattatggg	60
	ctccttcgtg gattatggtc gagacgogat cttgatgatg gcacttatcg gtgagatgag	120
	gcagttgccca aaagatggtg caggggaaga ccgaattcat ggctgggagg gtgtaggcaa	180
	tagttctggg acggcatcgt cgatgtttat cgtagcagaa ccactgaaca gggccaccct	240
	ctgaaacgga tgctttggaa atcgagtaga gatgcatgga aacctccttc ctggttgcag	300
	aatc	304
	<210> 3	
	<211> 304	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana de T. equinum	
	<400>3	
	cacgctcata accgtaccog agatccctgg cgtgocggacg cataacggct ggattatggg	60
	ctccttcgtg gattatggtc gagacgogat cttgatgatg gcacttatcg gtgagatgag	120
	gcagttgccca aaagatgtag caggggaaga ccgaattcat ggctgggagg gtgtaggcaa	180
	tagttctggg acggcatcgt cgatgtttat cgtagcagaa ccactgaaca gggccaccct	240
	ctggaacgga tgctttggaa atcgagtaga gatgcatgga aacctccttc ctggttgcag	300
15	aatc	304
	<210> 4	
	<211> 304	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia diana de T. interdigitale (antrofilica + zoofilica), I, II, III*, IV, M	
	<400>4	
	cacggtaata accgtaccog agtccccgg cgtgocggact cataacggct ggattatggg	60
	ctccttcgtg gattatggtc gagacgogat cttgacctg gcacttcttg gtgagatggg	120
	gcagttgccca aaagatgtcg cagggaaaga ccgaattcat ggctgggagg gtgtaggcaa	180
	tagttctgcg acggcatcgt cgatgtttat cgtggcagaa ccacttaaca gggccaccct	240
	ctgaaacgga tgctttggaa atcgagttga gatgocggga aacctccttc ctggttgcag	300
	gatc	304
	<210> 5	
25	<211> 243	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana de T. benhamiae (amarillo)	

ES 2 899 187 T3

	<400>5	
	ctccggtgag agagtgcaat tgcacgatcg taaccgtacc ccaagtcctt gcagaacggt	60
	gtaacaacc ttggattatg gagtaattcg tggattatgg tgtcgacacg atcctggcca	120
	tggcacttat tggtttggtg gggcagttgc caaaagatgg agcaggggaa gaccgagttc	180
	tgcctggaa ggggtgtaggc aatgattttg ggcctacatc ggtgacgtgc atcggagcag	240
	tac	243
	<210> 6	
	<211> 243	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana de T. benhamiae (blanco)	
	<400>6	
	ctctggtgag agagtgcagt tgcacgattg taaccatacc catggtcctt gcagtgcggt	60
	gtgacagcat ttggattatg ggctccttcg tggattacgg tcccgacacg atcctgacga	120
	tggcactcat tgggtgcggtg gggcagttgc caaaagaggg agcaggggtg aacctcattc	180
	ctagctggaa aggtgtaggc aatggttctg ggactgcatc ggcgaggacc atcggagcag	240
10	aac	243
	<210> 7	
	<211> 243	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> T. benhamiae (africano)	
	<400>7	
	ctcttgtgag agagtgcagt tgcacgctga taaccgtacc catggtcctt gcagtgcggc	60
	ttgacaacac ttggattatg ggctccttcg tggactacgg tcccgatacg atcctgacga	120
	tggcacttat tgggtgcggtg gggcagttgc caaaagatgt cgcaggggtg aacctcattc	180
	ctagatggaa aggtgtaggc aatggttctg ggaccgcatc ggcgaggacc atcggagcag	240
	aac	243
	<210> 8	
20	<211> 243	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana de T. concentricum	
25	<400>8	
	ctccggtgag agagtgcagt tgcacgattg taaccgtacc ccaagtcctt gcagaacggt	60
	gtaacaacac ttggattatg gagtaattcg tggattatgg tgtcgacacg atcctggcca	120
	tggcacttat tggtttggtg gggcagttgc caaaagtgg ggcaggggaa gaccgagttc	180
	tgcctggaa ggggtgtaggc aatggttctg ggcctacatc ggtgacgtgc atcggagtag	240
	tac	243

ES 2 899 187 T3

<210> 9  
 <211> 242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia diana de T. erinacei

<400>9

ctcccgtgag agagtgcagt tgcactactg taaccgtacc catggtcctt gcagtgtggg	60
ttagcaacat ttggattatg gagtgccttcg tggattacgg tcccaacacg atcctgacca	120
tggcacttct tggttttgtg cgccatattc caaaagatgg ggcaggggtg aacctcattg	180
ttagatggaa ggggtgtaggc aatggttctg ggaccgcacg ggcgaggacc atcggagcag	240
ta	242

10 <210> 10  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Cebador directo universal (Trichophyton tonsurans, Trichophyten equinum, Trichophyton interdigitale (antrofilico + zoofilico) I, II, III, III\*, IV, M)

<400> 10  
 gggagggaga ctagttg 17

20 <210> 11  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Cebador directo universal (Trichophyton benhamiae (amarillo), Trichophyton benhamiae (blanco), Trichophyton benhamiae (africano), Trichophyton concentricum, Trichophyton erinacei)

30 <400> 11  
 gcattccca tggct 15

35 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Cebador inverso universal (Trichophyton tonsurans, Trichophyten equinum, Trichophyton interdigitale (antrofilico + zoofilico) I, II, III, III\*, IV, M)

45 <400> 12  
 aatthttcgc cgccaag 17

<210> 13  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Cebador inverso universal (Trichophyton benhamiae (amarillo), Trichophyton benhamiae (blanco), Trichophyton benhamiae (africano), Trichophyton bullosum, Trichophyton concentricum, Trichophyton erinacei)

<400> 13  
 tggctctgtt acgtg 15

45 <210> 14  
 <211> 23

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda Trichophyton tonsurans  
 5 <400> 14  
 gatccttggc gtacggatgc ata 23  
  
 <210> 15  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda Trichophyten equinum  
  
 <400> 15  
 agatccctgg cgtgcg 16  
 15 <210> 16  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Trichophyton interdigitale (antrofilica + zoofilica) I, II, III, III\*, IV, M sonda  
  
 <400> 16  
 gagatgcg gaaacctc 18  
  
 <210> 17  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda Trichophyton benhamiae (amarilla)  
 30 <400> 17  
 gtgtaggcaa tgatttggg cctacat 27  
  
 <210> 18  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda Trichophyton benhamiae (blanco)  
  
 <400> 18  
 tgcagtgcgg tgtgacagca tttgg 25  
  
 <210> 19  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Sonda Trichophyton benhamiae (africano)  
  
 <400> 19  
 cagtgcggct tgacaacac 19  
 45 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> AAAGTTGGGGCAGGGGAAGA  
  
 <400> 20  
 aaagtgggg caggggaaga 20  
 5 <210> 21  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 10 <223> Sonda Trichophyton erinacei  
  
 <400> 21  
 ttgcagtg ggtagcaac atttg 25  
  
 <210> 22  
 <211> 220  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
  
 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(8)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(23)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(28)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (30)..(31)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(35)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (38)..(43)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (45)..(45)  
 50 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (47)..(49)  
 <223> n es a, c, g, o t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (60)..(61)  
 <223> n es a, c, g, o t

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (63)..(64)  
 <223> n es a, c, g, o t

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (73)..(73)  
 <223> n es a, c, g, o t

15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (76)..(76)  
 <223> n es a, c, g, o t

20

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (80)..(83)  
 <223> n es a, c, g, o t

25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (85)..(86)  
 <223> n es a, c, g, o t

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (92)..(92)  
 <223> n es a, c, g, o t

35

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (95)..(97)  
 <223> n es a, c, g, o t

40

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (106)..(107)  
 <223> n es a, c, g, o t

45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (109)..(109)  
 <223> n es a, c, g, o t

50

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (113)..(116)  
 <223> n es a, c, g, o t

55

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (119)..(121)  
 <223> n es a, c, g, o t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (124)..(125)  
 <223> n es a, c, g, o t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (127)..(127)

<223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (135)..(136)  
 5 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (138)..(139)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (146)..(149)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (153)..(155)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (158)..(163)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (167)..(167)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (169)..(169)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (182)..(183)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (186)..(186)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (189)..(191)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (193)..(194)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (200)..(201)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (204)..(204)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (206)..(208)  
 <223> n es a, c, g, o t

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (213)..(214)  
 <223> n es a, c, g, o t

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (216)..(216)  
 <223> n es a, c, g, o t

15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (219)..(219)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400>22

cacnnnnnta accntaccn nnntccnngn ngnnngggnn nnnancnnt ggattatggn	60
ntnnttcgtg gantangtn nnnanncgat cntgnnnatg gcactnntng gtnnnntggn	120
ncanntcca aaagnngng cagggnnna ccnnnttnn nnntggngang gtgtaggcaa	180
tnntntggn ncncatcgn ngangnnat cgngnagna	220

20

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>  
 <223> Cebador

<400> 23  
 ctggccatgg cacttattgg 20

30

<210> 24  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sonda

<400> 24  
 gatgtaggcc caaatcatt gcctacac 28

35

<210> 25  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sonda

40

<400> 25  
 ctgcccacac ttttgcaac tg 22

45

<210> 26  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sonda

<400> 26  
 taggcaatga tttgggcct a 21

5  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sonda

10  
 <400> 27  
 catcggcgag gaccatcgga 20

<210> 28  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15  
 <220>  
 <223> Sonda

<400> 28  
 gcaatggttc tgggcctaca tc 22

20  
 <210> 29  
 <211> 243  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de T. rubrum

25  
 <400>29

cttttgtgag agagtccagt tgcacgcctg taaccgtacc cgaagtcctt gcagtacggt	60
ttggccacat ttggattatg gaggcttcg tggactatag tggtagacacg atcctgacca	120
tggcacttat tggtagcagt gggtagttgc caaaaggggc cgcaggggaa gaccgcattc	180
tgaattgaa gaggtaggc aatggttctg ggcctacatc ggtgatgcat atcggagcag	240
tgc	243

<210> 30  
 <211> 243  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30  
 <220>  
 <223> Secuencia de T. verrucosum

<400>30

ctattgggag ggagtccagt tgcactcctg taaccgtacc catggtcctt ggcgtgcggg	60
gacataacat ttggattatg ggctccttcg tggattacgg tcccaacacg atcctgacga	120
tggcactcct tgttgacgtg gggcagttgc caaaaggggg ggcaggggaa gaccgaattc	180
atagatgaa gggtagtaggc aatggttctg ggactgcatc ggcgatattt atcggagcag	240
aac	243

35

## REIVINDICACIONES

1. Un par de cebadores que comprende un cebador directo y un cebador inverso capaces de amplificar un ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas, en el que el ácido nucleico amplificado comprende la SEC. ID NÚM. 22, en el que el cebador directo se hibrida específicamente con una región del genoma del patógeno corriente arriba de la SEC. ID NÚM. 22 y el cebador inverso se hibrida específicamente con una región del genoma del patógeno corriente abajo de la SEC. ID NÚM. 22, en el que la distancia entre el par de bases final del cebador directo, en su orientación 5'-3', y el primer par de bases de la SEC. ID NÚM. 22, en su orientación 5'-3', es de 200, 100 o menos pares de bases, en el que la distancia entre el par de bases final del cebador inverso, en su orientación 5'-3', y el par de bases final de la SEC. ID NÚM. 22, en su orientación 5'-3', es de 200, 100 o menos pares de bases, en el que cada cebador tiene una longitud de 10 a 40, 12 a 35, o 14 a 30 nucleótidos y en el que el patógeno se selecciona del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae (africano)*, *T. benhamiae (amarillo)*, *T. concentricum* y *T. erinacei*.
2. Un ácido nucleico que comprende (a) una secuencia de cebadores directos y una secuencia de cebadores inversos de acuerdo con el par de cebadores de la reivindicación 1 y, entre la secuencia de cebadores directos y la secuencia de cebadores inversos, (b) la secuencia de ácido nucleico de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas que comprende la SEC. ID NÚM. 22, en el que el patógeno se selecciona del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae (africano)*, *T. benhamiae (amarillo)*, *T. concentricum* y *T. erinacei* y en el que el ácido nucleico se obtiene por medio de la amplificación de una muestra que comprende dicho patógeno y mediante el uso del par de cebadores de la reivindicación 1.
3. El par de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1 o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende una etiqueta detectable, preferentemente del grupo que comprende una etiqueta fluorescente, radiactiva, de oro coloidal o enzimáticamente activa.
4. Un procedimiento que comprende la etapa de detectar en una muestra una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 de un patógeno asociado con una infección de la piel, el cabello y las uñas y en el que el patógeno se selecciona del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae (africano)*, *T. benhamiae (amarillo)*, *T. concentricum* y *T. erinacei*.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende las etapas de:
  - a) amplificar cualquier ácido nucleico que comprenda la SEC. ID NÚM. 22 presente en la muestra proporcionada, preferentemente material de uñas, cabello o piel, mediante el uso del par de cebadores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, para de ese modo generar un amplicón si una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC. ID NÚM. 22 del patógeno está presente en la muestra.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende la etapa de:
  - b) detectar el amplicón.
7. El procedimiento de acuerdo con la etapa 6, en el que el amplicón se detecta por medio de fluorescencia, radiactividad, oro coloidal o quimioluminiscencia.
8. Un uso del par de cebadores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 para el diagnóstico de una infección de la piel, el cabello y las uñas asociada con un patógeno y en el que el patógeno se selecciona del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae (africano)*, *T. benhamiae (amarillo)*, *T. concentricum* y *T. erinacei*.
9. Un kit que comprende el par de cebadores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, preferentemente para el diagnóstico de una infección de la piel, el cabello y las uñas asociada con un patógeno y en el que el patógeno se selecciona del grupo que comprende *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. benhamiae (africano)*, *T. benhamiae (amarillo)*, *T. concentricum* y *T. erinacei*.

```

T.interdigitale -----CACGGTAATAACCGTACCCGAGGTCCCCGGCGIGCGGA
T.tonsurans -----CACGCTTATAACCGTACCCGAGATCCTTGGCGTACGGA
T.benhamiae (blanco) CTCTGGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGATTGTAACCATACCCATGGTCCTTGCAGTGCGGT
T.erinacei CTCCCCTGAGAGAGTGCAGTTGCACACTACTGTAACCGTACCCATGGTCCTTGCAGTGTGGG
T.benhamiae (africano) CTCTTGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGCTGATAACCGTACCCATGGTCCTTGCAGTGCGGC
T.equinum -----CACGCTCATAACCGTACCCGAGATCCCTGGCGTGCGGA
T.benhamiae (amarillo) CTCCGGTGAGAGAGTGC AATTGCACGATCGTAACCGTACCCCAAGTCCTTGCAGAACCGT
T.concentricum CTCCGGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGATTGTAACCGTACCCCAAGTCCTTGCAGAACCGT
                    *** .*****.***** :..*** * .*. * **
consenso xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxCACXXXXTAACCXTACCCxxxxTCCxxGxxGxxxGGx

T.interdigitale CTCATAACGGCTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGGCATCTIGACCA
T.tonsurans TGCATAACGGCTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGGCATCTIGATGA
T.benhamiae (blanco) GTGACAGCATTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGATTACGGTCCCGACACGATCCTIGACGA
T.erinacei TTAGCAACATTGGATTATGGAGTGCCTTCGTGGATTACGGTCCCAACACGATCCTIGACCA
T.benhamiae (africano) TTGACAACACTTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGACTACGGTCCCGATACGATCCTIGACGA
T.equinum CGCATAACGGCTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGGCATCTIGATGA
T.benhamiae (amarillo) GTAACAACCCCTGGATTATGGAGTAATTTCGTGGATTATGGTGTTCGACACGATCCTIGGCCA
T.concentricum GTAACAACCCCTGGATTATGGAGTAATTTCGTGGATTATGGTGTTCGACACGATCCTIGGCCA
                    . * . * ***** . * . ***** * * * * . * . * * * * *
consenso xxxxxxAxCxxxTGGATTATGGxxTxITCGTGAxTAxGGTxxxxAxxCGATCIGxxxA

T.interdigitale TGGCACTTCTTGGTGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTCGCAGGGAAAGACCEAATTC
T.tonsurans TGGCACTTATCGGTGAGATGAGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGCAGGGGAAGACCEAATTC
T.benhamiae (blanco) TGGCACTCATTGGTGGCGTGGGGCAGTTGCCAAAAGAGGGAGCAGGGGTGAACCTCATT
T.erinacei TGGCACTTCTTGGTTTTGTGCGCCATATTCAAAAGATGGGGCAGGGGTGAACCTCATTG
T.benhamiae (africano) TGGCACTTATGGTGGCGTGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTCGCAGGGGTGAACCTCATT
T.equinum TGGCACTTATCGGTGAGATGAGGCAGTTGCCAAAAGATGTAGCAGGGGAAGACCEAATTC
T.benhamiae (amarillo) TGGCACTTATGGTTTTGGTGGGGCAGTTGCCAAAAGATGGAGCAGGGGAAGACCCAGTT
T.concentricum TGGCACTTATGGTTTTGGTGGGGCAGTTGCCAAAAGTTGGGGCAGGGGAAGACCCAGTT
                    ***** . * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
consenso TGGCACTxxTxGGTxxxxTGxGxCxTxCCAAAAGxxGxxGCAGGGxxxxACCxxxTTx

T.interdigitale ATGGCTGGGAGGGTGTAGGCAATAGTTCTGGACGGCATCGTCGATGTTTATCGIAGCAG
T.tonsurans ATGGCTGGGAGGGTGTAGGCAATAGTTCTGGGACGGCATCGTCGATGTTTATCGIAGCAG
T.benhamiae (blanco) CTAGCTGGAAAGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACTGCATCGGCAGGACCATCGGAGCAG
T.erinacei TTAGATGGAAGGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACCGCATCGGCAGGACCATCGGAGCAG
T.benhamiae (africano) CTAGATGGAAAGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACCGCATCGGCAGGACCATCGGAGCAG
T.equinum ATGGCTGGGAGGGTGTAGGCAATAGTTCTGGGACGGCATCGTCGATGTTTATCGIAGCAG
T.benhamiae (amarillo) TCGCCTGGAAGGGTGTAGGCAATGATTTTGGGCTACATCGGTGACGTGCATCGGAGCAG
T.concentricum TCGCCTGGAAGGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGCTACATCGGTGACGTGCATCGGAGTAG
                    . . * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
consenso xxxxxxTGGxAxGGTGTAGGCAATxxTTxTGxGxCxxCATCGxxGxGxxxATCGxxGxAG

T.interdigitale AACCACTTAACAGGGCCACCCCTCTGAAACGGATGCTTTGGAAATCGAGTTGAGAIGCGCG
T.tonsurans AACCACTGAACAGGGCCACCCCTCTGAAACGGATGCTTTGGAAATCGAGTAGAGATGCATG
T.benhamiae (blanco) AAC-----
T.erinacei TA-----
T.benhamiae (africano) AAC-----
T.equinum AACCACTGAACAGGGCCACCCCTCTGAAACGGATGCTTTGGAAATCGAGTAGAGATGCATG
T.benhamiae (amarillo) TAC-----
T.concentricum TAC-----
                    : *
consenso xA

T.interdigitale GAAACCTCCTTCCTGGTTGCAGGATC
T.tonsurans GAAACCTCCTTCCTGGTTGCAGAATC
T.benhamiae (blanco) -----
T.erinacei -----
T.benhamiae (africano) -----
T.equinum GAAACCTCCTTCCTGGTTGCAGAATC
T.benhamiae (amarillo) -----
T.concentricum -----

```

Fig. 1

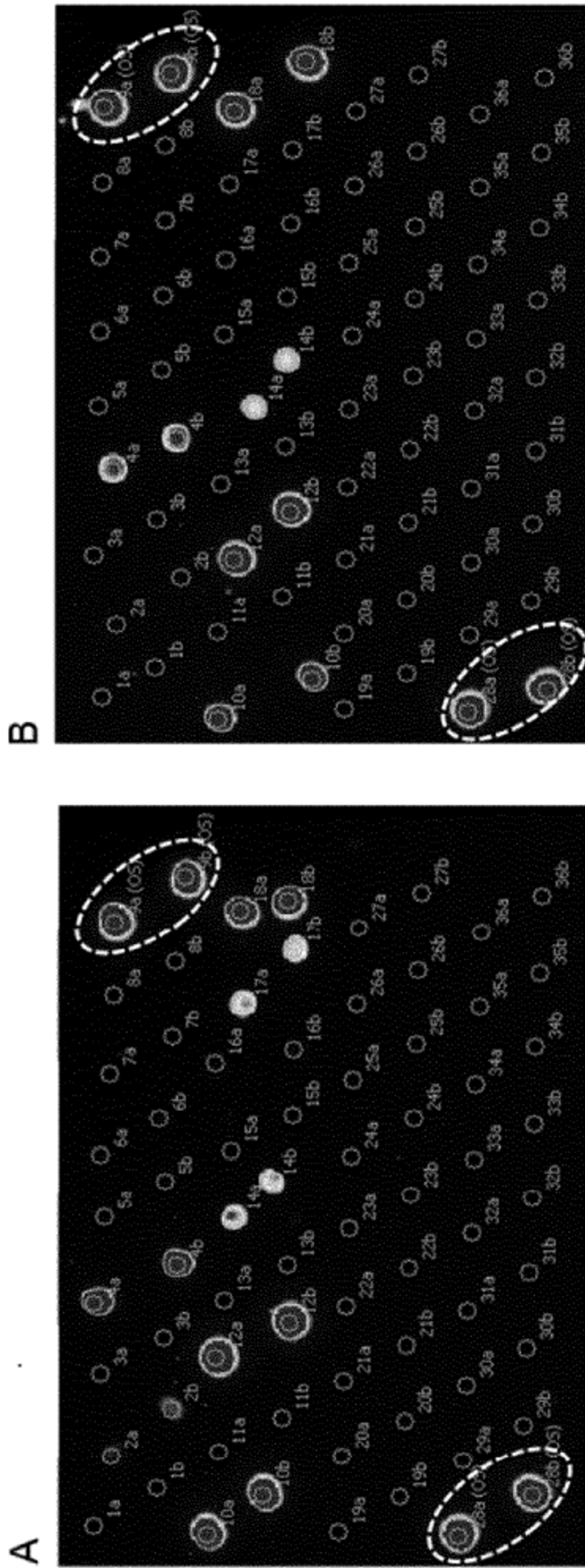


Fig. 2

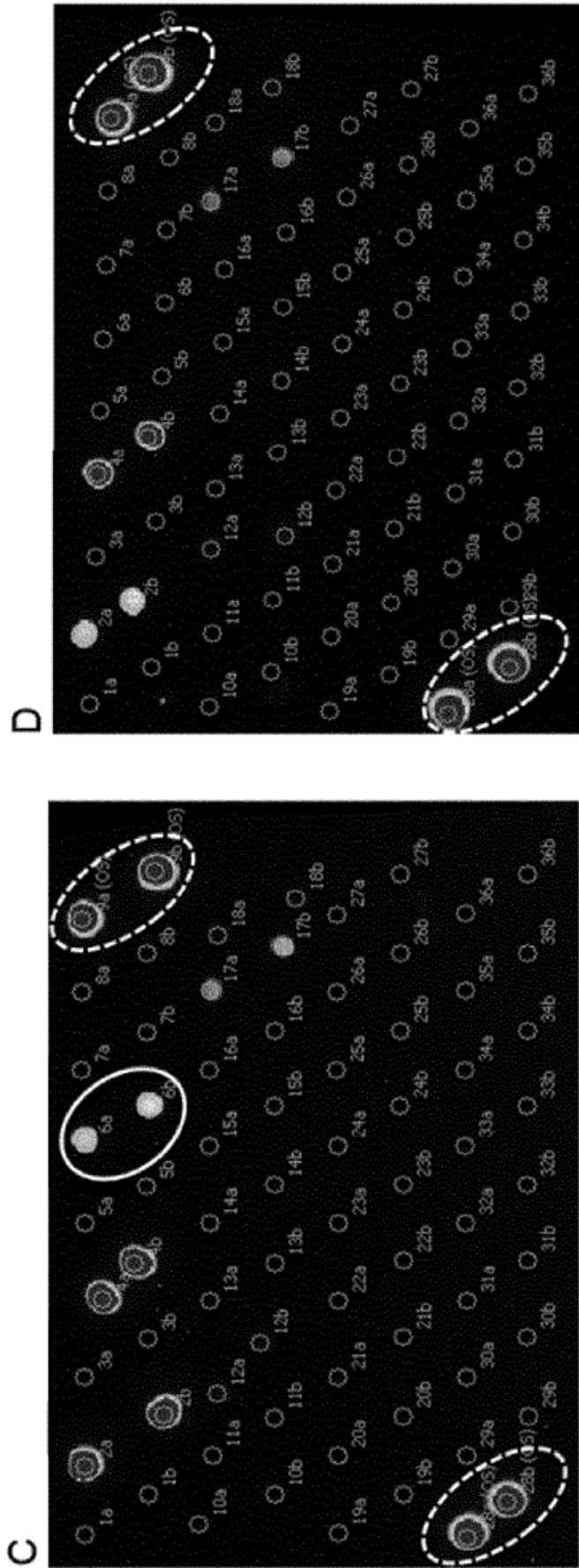
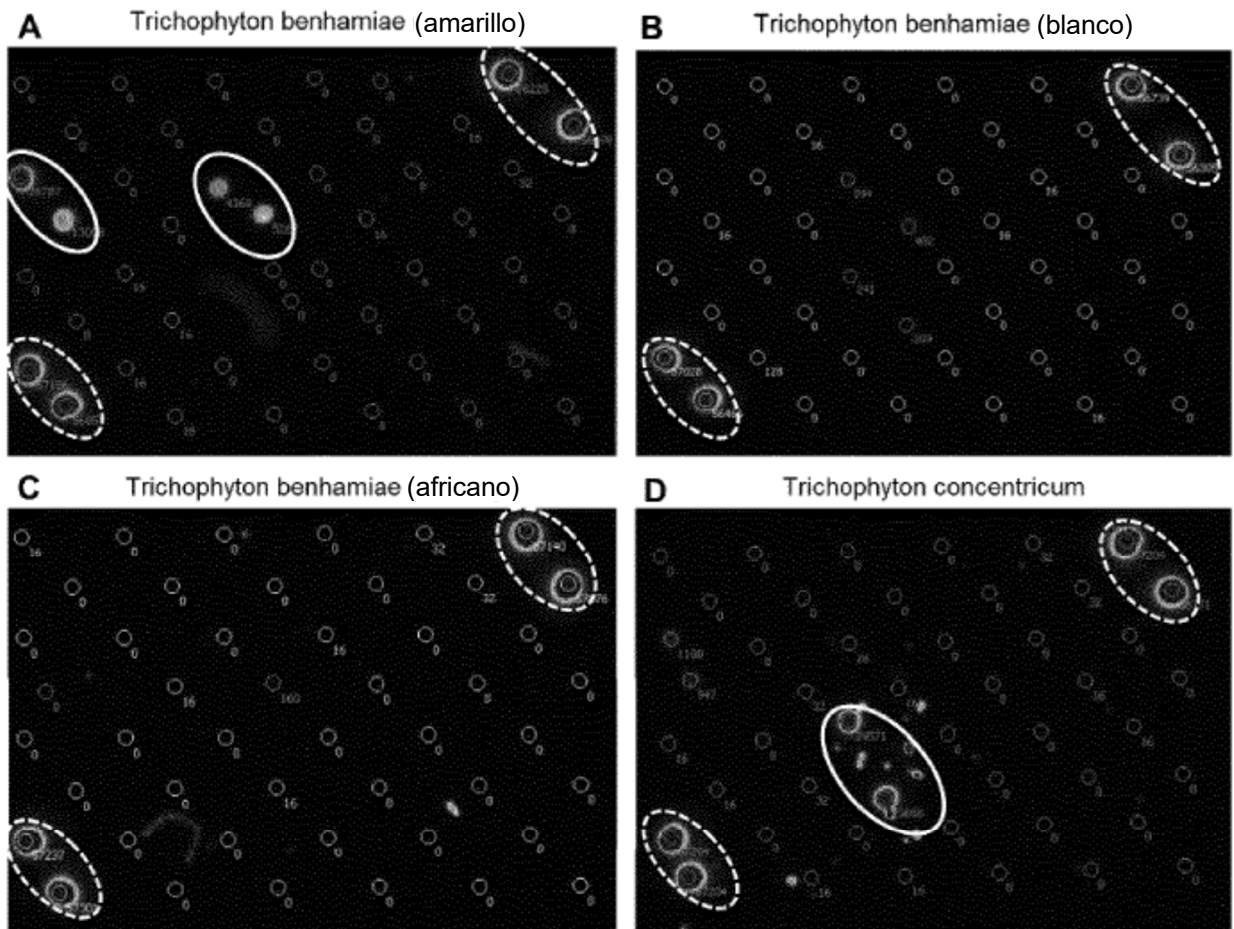
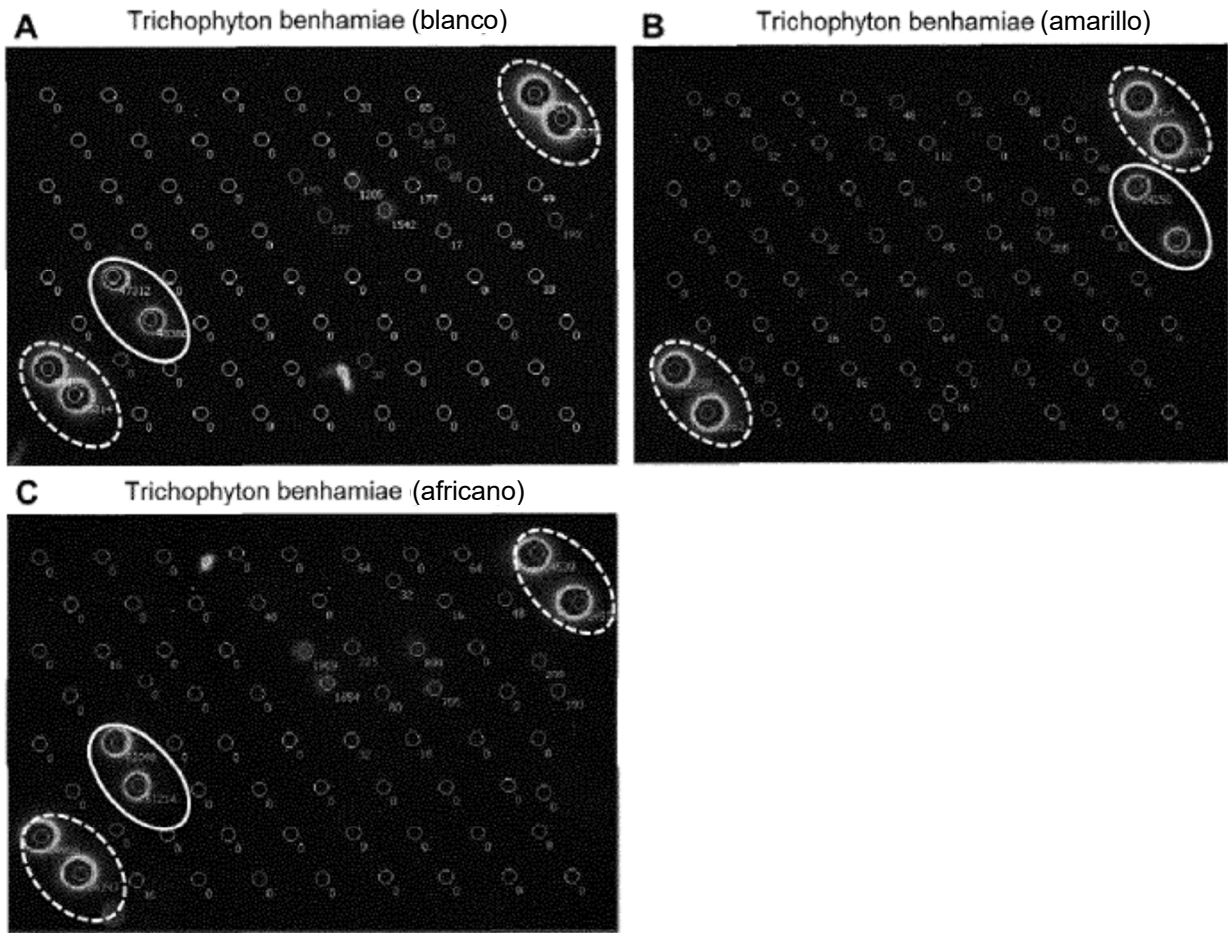


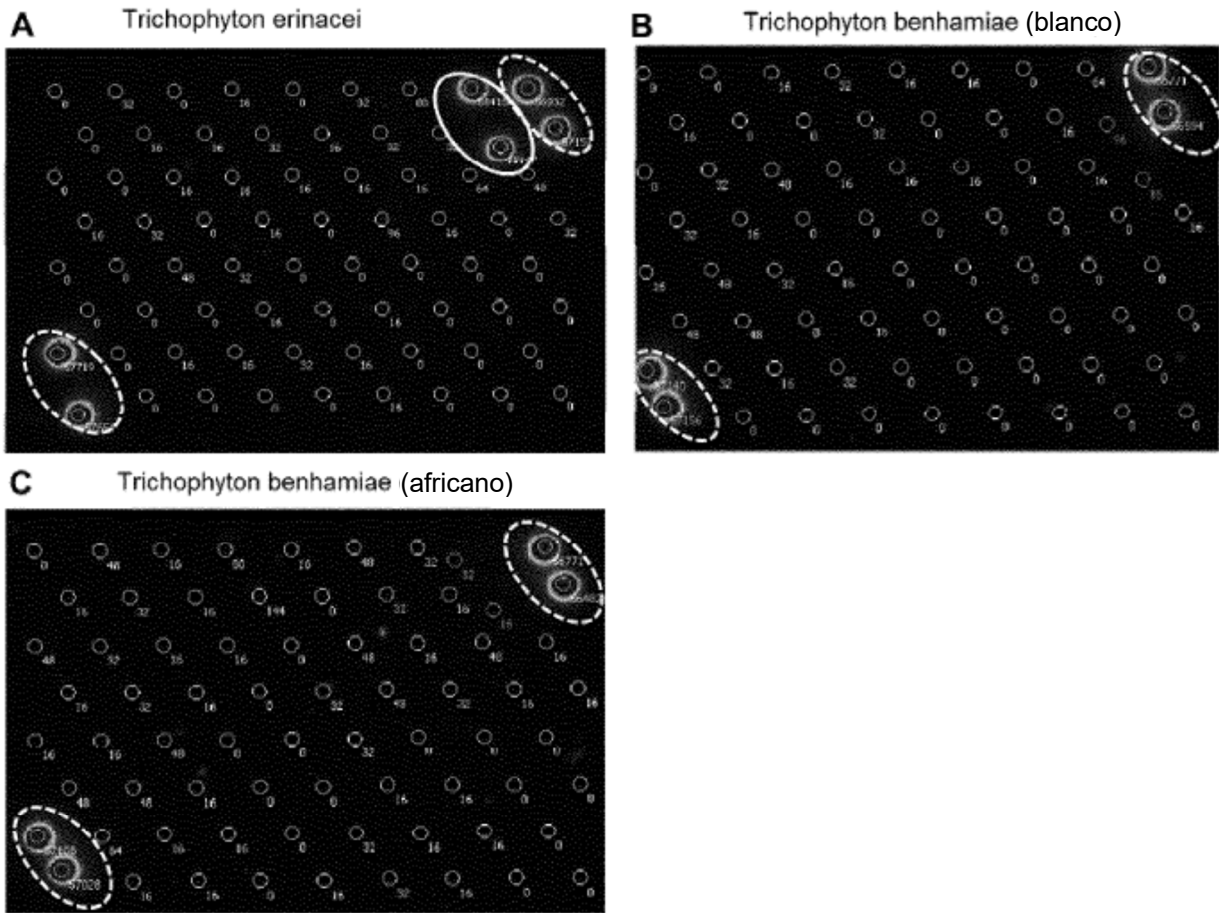
Fig. 2



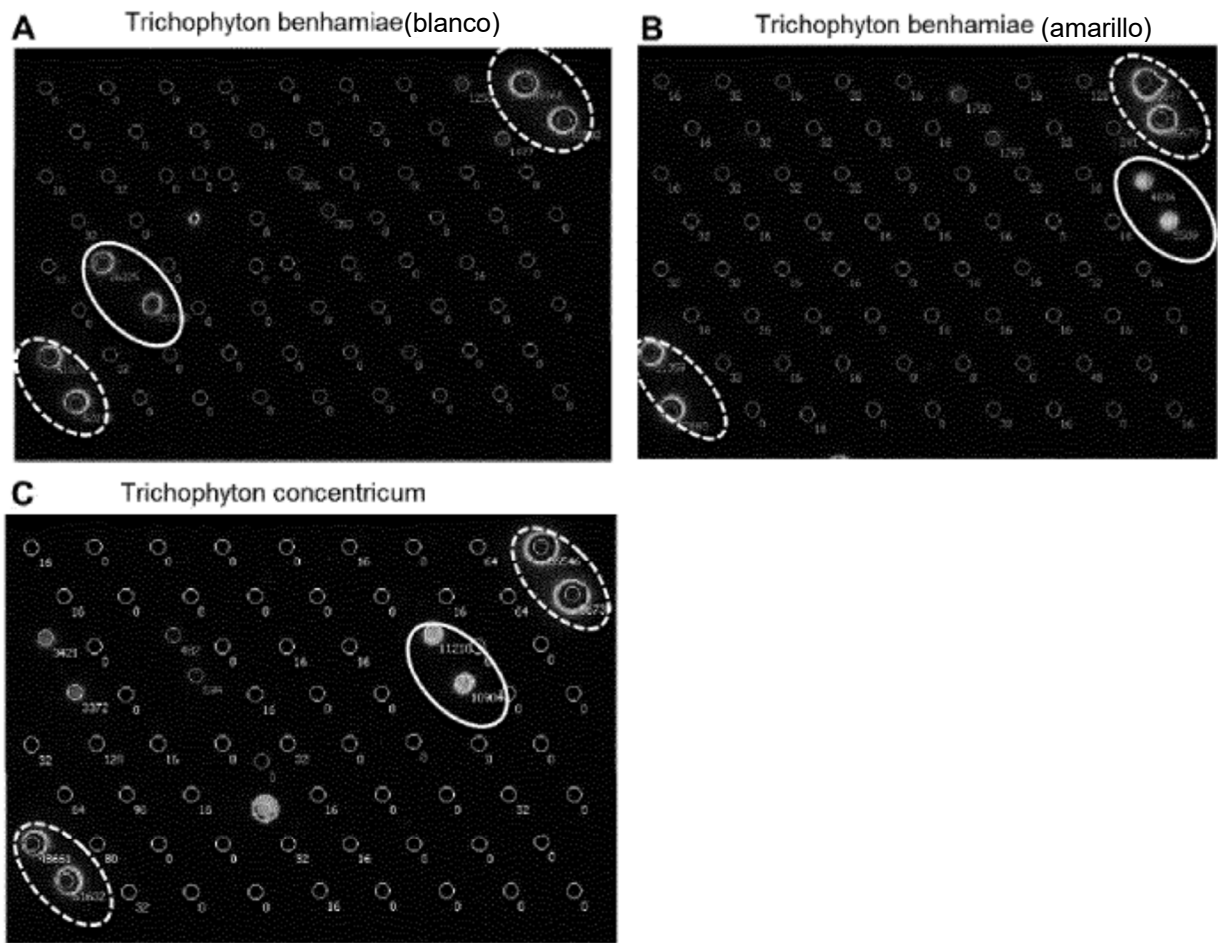
**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**