



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 798**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06290862 .9**

96 Fecha de presentación : **29.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1862557**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

54

Título: **Detección múltiple en tiempo real de tres especies bacterianas responsables de enfermedades de transmisión sexual.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2011

73

Titular/es: **BIO-RAD PASTEUR**
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette, FR

72

Inventor/es: **Clarebout, Gervais**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 798 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

Detección múltiple en tiempo real de tres especies bacterianas responsables de enfermedades de transmisión sexual.

CAMPO TÉCNICO

5 El presente invento se refiere a la detección de tres especies bacterianas diferentes que son responsables de enfermedades de transmisión sexual, es decir, *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y *Mycoplasma genitalium* (MG).

Más particularmente, el presente invento se refiere a la detección de estas tres especies en una PCR en tiempo real, en una PCR múltiple o en una PCR múltiple en tiempo real.

10 FUNDAMENTO DEL INVENTO

La *Chlamydia trachomatis* (CT) es una especie de las clamidias, un grupo de bacterias forzosamente intracelulares. Causa enfermedades de transmisión sexual, tales como la clamidiasis y el linfogranuloma venéreo, así como el tracoma, una infección ocular que es causa frecuente de ceguera.

La *Neisseria gonorrhoeae* (NG) es una especie de bacteria Gram negativa, responsable de la gonorrea.

15 Son frecuentes las infecciones conjuntas por CT y NG.

El *Mycoplasma genitalium* (MG) es una bacteria parásita que vive en los tractos genital y respiratorio de los primates. Se piensa que el MG está implicado en la uretritis.

20 El diagnóstico tradicional de la presencia de CT y/o MG y/o NG implica el cultivo de muestras recogidas de los pacientes, tal como una muestra uretral, en medios de cultivo específicos para las especies. Dichos cultivos llevan mucho tiempo y son delicados. En el caso de CT, MG y NG, son los que llevan más tiempo y los más delicados porque el cultivo de CT y MG requiere un alto nivel de tecnicidad y porque NG es muy sensible a variaciones de temperatura y humedad.

Por lo tanto, se han desarrollado métodos diagnósticos basados en la multiplicación de ácido nucleico.

25 Por ejemplo, el kit AmpliCor™ asequible de Roche Diagnostic, aprobado por la FDA, permite la detección de CT o NG. Sin embargo, no es capaz de detectar MG.

30 En el Documento WO 98/11259, a nombre de Visible Genetics Inc., se describe un método para la multiplicación y detección conjuntas de CT, MG y NG. Este método implica la multiplicación de dianas de CT, MG y NG por cebadores de multiplicación. La detección de los amplicones producidos por dichos cebadores es llevada a cabo por marcación directa de los cebadores o por técnicas en gel de agarosa. Sin embargo, el método del Documento WO 98/11259 no implica el uso de sondas que se hibridan con amplicones (véanse las páginas 9-10 del Documento WO 98/11259). Por consiguiente, el método del Documento WO 98/11259 no es una técnica en tiempo real.

El presente invento permite la detección de CT, MG y NG en una multiplicación en tiempo real y proporciona cebadores así como sondas, preferiblemente sondas baliza ("beacon"), que se pueden utilizar conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo para detectar las tres especies bacterianas en una multiplicación en tiempo real.

35 Así, como característica ventajosa, el invento puede ser implementado en una PCR en tiempo real, en una PCR múltiple o en una PCR múltiple en tiempo real.

SUMARIO DEL INVENTO

40 El invento se refiere a la detección de tres especies bacterianas diferentes que son responsables de enfermedades de transmisión sexual, es decir, *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y *Mycoplasma genitalium* (MG).

Más particularmente, el invento se refiere a la detección de estas tres especies en una PCR en tiempo real, en una PCR múltiple o en una PCR múltiple en tiempo real.

45 La solicitud proporciona secuencias de moldes de referencia, que están especialmente adaptadas al diseño de cebadores y sondas, que se pueden utilizar conjuntamente en el mismo tubo para detectar CT y/o MG y/o NG, ventajosamente CT y MG y NG, mediante una multiplicación múltiple en tiempo real, y el invento proporciona un método para la producción de dichos cebadores y sondas a partir de dichas secuencias molde de referencia.

El invento también se refiere a estos cebadores y sondas, así como a composiciones farmacéuticas, a composiciones biológicas, a kits de detección y a kits diagnósticos, que comprenden al menos uno de los cebadores y/o sondas del invento.

En la Tabla 1, que está al final del Ejemplo 1 posterior, se enumeran secuencias ID. SEC. que son representativas de dichos polinucleótidos molde de referencia y de cebadores y sondas del invento.

El invento se refiere además a un procedimiento para la detección de CT, MG y NG, que implica el uso de al menos una pareja de cebadores y/o al menos una sonda del invento, así como a composiciones de multiplicación.

- 5 En opinión de los inventores, el invento proporciona la primera descripción de una detección de CT y MG y NG en una multiplicación múltiple en tiempo real.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la secuencia, que está disponible bajo el número de acceso J03321 (ID. SEC. nº 1), que es la secuencia del plásmido pCHL1 de CT.

- 10 La Figura 2 muestra la secuencia, que está disponible bajo el número de acceso X91704 (ID. SEC. nº 2), que es la secuencia de la región 5' del gen de la adhesina de MG.

La Figura 3 muestra la secuencia, que está disponible bajo el número de acceso M31431 (ID. SEC. nº 3), que es la secuencia del gen de la adhesina de MG.

- 15 La Figura 4 muestra la secuencia, que está disponible bajo el número de acceso AF042097 (ID. SEC. nº 4), que es la secuencia del gen *piE* de NG.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El invento se refiere a la detección de tres especies bacterianas de transmisión sexual; a saber: *Chlamydia trachomatis* (CT), *Mycoplasma genitalium* (MG) y *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

- 20 La solicitud proporciona secuencias molde de referencia de ácido nucleico que permiten la construcción y producción de cebadores y sondas que son adecuados para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real.

De esta manera, el invento proporciona cebadores de CT, pares de cebadores de CT, sondas de CT, cebadores de MG, pares de cebadores de MG, sondas de MG, cebadores de NG, pares de cebadores de NG y sondas de NG, que son adecuados para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real.

- 25 Los cebadores del invento pueden ser mezclados conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo para multiplicar CT y MG y NG en dicho mismo tubo.

Ventajosamente, el invento proporciona sondas que son adecuadas para la detección en tiempo real en dichas condiciones operativas múltiples.

- 30 Por consiguiente, los cebadores y sondas del invento se pueden mezclar conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo para multiplicar y detectar CT y MG y NG en tiempo real en dicho mismo tubo.

Por consiguiente, el invento permite la detección de CT y MG y NG en una sola etapa operativa (multiplicación + detección).

En opinión de los inventores, el invento es la primera descripción de una detección múltiple en tiempo real de las tres especies bacterianas (CT, MG, NG).

- 35 Además de detectar las tres especies bacterianas en la misma muestra, el invento presenta la ventaja de permitir comprobar la ausencia de inhibidores de Taq polimerasa mediante el uso de un Testigo Interno (IC; del inglés, Internal Control). Más adelante se describen con mayor detalle IC así como cebadores y sondas de IC.

Por lo tanto, el invento permite una multiplicación cuádruple (CT, MG, NG e IC).

- 40 El invento proporciona una detección de dichas tres especies bacterianas que es mucho más rápida que la de cualquier técnica del campo técnico previo, así como muy fiable ya que reduce en gran medida el riesgo de que haya muestras o cultivos contaminados para análisis.

Los medios del invento son además muy sensibles y reproducibles (véase más adelante el Ejemplo 4).

En la actualidad, no hay una detección sistémica de MG, mientras que se reconoce ahora que el MG es responsable de la uretritis no gonocócica y se asocia a menudo con cervicitis y endometritis.

- 45 El invento proporciona los primeros medios que permiten una detección sistémica de MG en un ensayo rutinario que permite la detección simultánea de CT y NG.

El invento permite por ello que el médico evite la prescripción de antibióticos inapropiados.

Más particularmente, el invento proporciona:

- sistemas de multiplicación de CT en tiempo real, en que cada sistema de multiplicación de CT en tiempo real comprende al menos dos cebadores de CT del invento y al menos una sonda para CT del invento,
- 5 – sistemas de multiplicación de MG en tiempo real, en que cada sistema de multiplicación de MG en tiempo real comprende al menos dos cebadores de MG del invento y al menos una sonda para MG del invento, y
- sistemas de multiplicación de NG en tiempo real, en que cada sistema de multiplicación de CT en tiempo real comprende al menos dos cebadores de NG y al menos una sonda para NG.

10 Aún más particularmente, el invento proporciona sistemas de multiplicación de CT en tiempo real, sistemas de multiplicación de MG en tiempo real y sistemas de multiplicación de NG en tiempo real, que permiten una detección de CT, MG y NG, respectivamente, que es específica de las especies bacterianas a las que se destina el sistema de multiplicación en tiempo real.

15 Ventajosamente, el invento proporciona sistemas de multiplicación de CT en tiempo real, sistemas de multiplicación de MG en tiempo real y sistemas de multiplicación de NG en tiempo real, que se pueden utilizar conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo sin pérdida significativa alguna de especificidad, incluso cuando se usan conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo:

- dicho sistema de multiplicación de CT en tiempo real del invento aún detecta específicamente CT sin reactividad cruzada significativa alguna con los sistemas de multiplicación de MG y NG en tiempo real ni con los amplicones que posiblemente pueden ser producidos por estos sistemas de MG y NG,
- 20 – dicho sistema de multiplicación de MG en tiempo real del invento aún detecta específicamente MG sin reactividad cruzada significativa alguna con los sistemas de multiplicación de CT y NG en tiempo real ni con los amplicones que posiblemente pueden ser producidos por estos sistemas de CT y NG, y
- dicho sistema de multiplicación de NG en tiempo real del invento aún detecta específicamente NG sin reactividad cruzada significativa alguna con los sistemas de multiplicación de CT y MG en tiempo real ni con los amplicones que posiblemente pueden ser producidos por estos sistemas de CT y MG.

25 En opinión de los inventores, ninguno de los sistemas de multiplicación en tiempo real del invento detecta DNA humano (sin hibridación cruzada).

30 La solicitud también se refiere a composiciones farmacéuticas, a composiciones biológicas, a kits de detección y a kits diagnósticos, que comprenden al menos uno de los cebadores y/o sondas del invento, preferiblemente al menos dos cebadores y al menos una sonda del invento, más preferiblemente al menos un sistema de multiplicación en tiempo real del invento, muy preferiblemente al menos un sistema de multiplicación de CT y al menos uno de MG y al menos uno de NG en tiempo real del invento.

El invento también se refiere a un procedimiento para la detección de al menos una *Chlamydia trachomatis* (CT) y/o al menos un *Mycoplasma genitalium* (MG) y/o al menos una *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

Dicha detección se lleva normalmente a cabo en una muestra.

35 Por "muestra que contiene material de ácido nucleico" se quiere significar cualquier muestra que contiene al menos un ácido nucleico, por ejemplo, una muestra biológica, tal como una muestra que ha sido recogida de un cultivo celular o de un animal o un ser humano, preferiblemente una muestra que ha sido recogida de un tejido o fluido del que se sospecha que contiene CT y/o MG y/o NG, tal como, por ejemplo, una muestra de cuello uterino, muy preferiblemente una muestra de orina (tal como una muestra de orina de primera micción).

40 Ventajosamente, el invento permite una detección fiable de CT y/o MG y/o NG en una muestra de orina.

Opcionalmente, dicha muestra puede haber sido adicionalmente tratada y/o purificada de acuerdo con cualquier técnica conocida por la persona experta, para mejorar la eficacia de la multiplicación y/o la precisión cualitativa y/o la precisión cuantitativa. De este modo, la muestra puede consistir exclusiva o esencialmente en ácido(s) nucleico(s), obtenido(s) por purificación o aislamiento o por síntesis química. Los medios son asequibles a la persona experta que quisiera aislar o purificar ácidos nucleicos, tal como DNA, a partir de una muestra biológica, por ejemplo, para aislar o purificar DNA a partir de legrados cervicales (por ejemplo, QIAamp-DNA Mini-Kit; Qiagen, Hilden, Alemania).

45 Dicha detección comprende la determinación de si se ha producido, o se produce, al menos un amplicón a partir de dicha muestra, o a partir de material de ácido nucleico de la misma, mediante multiplicación por medio de cebadores de multiplicación,

50 de modo que una determinación positiva indica que está(n) presente(s) al menos una CT y/o al menos un MG y/o al menos una NG en dicha muestra.

Dicha determinación puede ser llevada a cabo por medio de al menos una sonda, que está destinada a hibridarse con dicho al menos un amplicón.

El procedimiento de detección del invento puede así comprender:

- 5 – poner dicha muestra, o material de ácido nucleico de la misma, en contacto con al menos dos cebadores de multiplicación bajo unas condiciones adecuadas para la producción de al menos un amplicón por dichos cebadores (es decir, bajo unas condiciones que serían adecuadas para la producción, por dichos cebadores, de al menos un amplicón a partir de dicha al menos una CT y/o MG y/o NG que se va a detectar, si estuvieran presentes dichas CT y/o MG y/o NG en dicha muestra);
- 10 – determinar si se ha producido, o se produce, al menos un amplicón por dichos cebadores, por ejemplo, por medio de al menos una sonda de detección que se hibrida con el amplicón producido por dichos al menos dos cebadores, preferiblemente en una multiplicación en tiempo real que requiere al menos una sonda del invento.

En el procedimiento de la solicitud, dichos cebadores de multiplicación comprenden:

- al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a CT y que son adecuados para la detección de CT en una multiplicación múltiple en tiempo real,
- 15 y/o
- al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a MG y que son adecuados para la detección de MG en una multiplicación múltiple en tiempo real,
- y/o
- 20 – al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a NG y que son adecuados para la detección de NG en una multiplicación múltiple en tiempo real.

En el procedimiento del invento, dichos cebadores de multiplicación comprenden dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT y dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG y dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG.

En el procedimiento de la solicitud, dicha al menos una sonda comprende preferiblemente:

- 25 – al menos una sonda dirigida a CT, que es adecuada para la detección de CT en una multiplicación múltiple en tiempo real,
- y/o
- al menos una sonda dirigida a MG, que es adecuada para la detección de MG en una multiplicación múltiple en tiempo real,
- y/o
- 30 – al menos una sonda dirigida a NG, que es adecuada para la detección de NG en una multiplicación múltiple en tiempo real.

En el procedimiento del invento, dicha al menos una sonda comprende preferiblemente al menos una sonda dirigida a CT y al menos una sonda dirigida a MG y al menos una sonda dirigida a NG.

- 35 En tanto que las secuencias molde de referencia de la solicitud, los cebadores y las sondas del invento han sido optimizados con objeto de permitir la detección de CT, MG y NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, las realizaciones simples del mismo quedan por supuesto también abarcadas por la solicitud (por ejemplo, realizaciones simples en tiempo real o no en tiempo real que requieren una pareja de cebadores del invento).

- 40 Bastante similarmente, en tanto que el invento proporciona la característica especial de permitir una detección múltiple de CT, MG y NG en tiempo real, las implementaciones de los cebadores del invento sin una sonda del invento, o con al menos una sonda del invento pero no en tiempo real, quedan por supuesto también abarcadas por la presente solicitud.

Además, en tanto que los cebadores del invento han sido diseñados como parejas de cebadores, cada cebador queda individualmente abarcado como tal por la presente solicitud.

- 45 En la Tabla 1, que está al final del Ejemplo 1 posterior, se enumeran secuencias ID. SEC. que son representativas de polinucleótidos molde de referencia de la solicitud, y de cebadores y sondas del invento.

En la Tabla 1 se muestran por ello dos sistemas de multiplicación de CT en tiempo real, cinco sistemas de multiplicación de MG en tiempo real y un sistema de multiplicación en tiempo real del invento. Estos sistemas se pueden utilizar conjuntamente en el mismo tubo para detectar CT y MG y NG en una multiplicación múltiple en tiempo real.

Dichos al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a CT y que son adecuados para la detección de CT en una multiplicación múltiple en tiempo real, son oligonucleótidos cuyas secuencias son adecuadas para uso como cebadores directo e inverso, respectivamente, en la multiplicación de al menos una secuencia molde de referencia de CT, en que dicha al menos una secuencia molde de referencia de CT es un fragmento que consiste en las posiciones 5571-5760 (ID. SEC. nº 5) de la secuencia de CT de ID. SEC. nº 1 (plásmido pCHL1 de CT; J03321), o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a CT que permiten una detección múltiple de CT en tiempo real. Dichos al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a CT, consisten preferiblemente en 14-30 nucleótidos (cada uno independientemente del otro).

- 5
- 10 Dicha al menos una secuencia molde de referencia de CT es ventajosamente el fragmento que consiste en las posiciones 5580-5754 (ID. SEC. nº 6) de la secuencia de CT de ID. SEC. nº 1, o la secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento.

Dichos al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a MG y que son adecuados para la detección de MG en una multiplicación múltiple en tiempo real, son oligonucleótidos cuyas secuencias son adecuadas para uso como cebadores directo e inverso, respectivamente, en la multiplicación de al menos una secuencia molde de referencia de MG, en que dicha al menos una secuencia molde de referencia de MG es un fragmento que consiste en:

- 15
- 20
- las posiciones 1-270 (ID. SEC. nº 13) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 2 (región 5' del gen de la adhesina de MG; X91074), o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
 - las posiciones 1140-1290 (ID. SEC. nº 19) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3 (gen de la adhesina de MG; M31431), o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
 - 25 – las posiciones 1060-1250 (ID. SEC. nº 25) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
 - las posiciones 1520-1710 (ID. SEC. nº 31) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
 - 30 – las posiciones 1500-1710 (ID. SEC. nº 37) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real.

35 Dichos al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a MG, consisten preferiblemente en 14-30 nucleótidos (cada uno independientemente del otro).

Dicha al menos una secuencia molde de referencia de MG es ventajosamente:

- el fragmento que consiste en las posiciones 2-259 (ID. SEC. nº 14) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 2, o la secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento, o
- 40 – el fragmento que consiste en las posiciones 1144-1283 (ID. SEC. nº 20) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o la secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento, o
- el fragmento que consiste en las posiciones 1064-1249 (ID. SEC. nº 26) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o la secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento, o
- el fragmento que consiste en las posiciones 1527-1704 (ID. SEC. nº 32) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o la secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento, o
- 45 – el fragmento que consiste en las posiciones 1501-1704 (ID. SEC. nº 38) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o la secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento.

50 Dichas secuencias molde de referencia de MG comparten la característica técnica específica de ser referencias adecuadas para construir y producir cebadores dirigidos a MG, así como sondas específicas de MG, que se pueden utilizar conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo para detectar específicamente CT y/o MG y/o NG, ventajosamente CT y MG y NG, en tiempo real en dicho mismo tubo.

Dichos al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a NG y que son adecuados para la detección de NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, son oligonucleótidos cuyas secuencias son adecuadas para uso como cebadores directo e inverso, respectivamente, en la multiplicación de al menos una secuencia molde de refe-

- 5 rencia de NG, en que dicha al menos una secuencia molde de referencia de NG es un fragmento que consiste en las posiciones 101-380 (ID. SEC. nº 42) de la secuencia de NG de ID. SEC. nº 4 (gen *piE* de NG; AF042097), o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a NG que permiten una detección múltiple de NG en tiempo real.
- Dichos al menos dos cebadores, que están destinados a dirigirse a NG, consisten preferiblemente en 14-30 nucleótidos (cada uno independientemente del otro).
- 10 Dicha al menos una secuencia molde de referencia de NG es ventajosamente el fragmento que consiste en las posiciones 114-365 (ID. SEC. nº 43) de la secuencia de NG de ID. SEC. nº 4, o la secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento.
- Por "que consiste en 14-30 nucleótidos" se quiere significar "que consiste en 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos".
- Lo mismo se aplica *mutatis mutandis* a cualquier intervalo que se cite en la presente solicitud.
- Las longitudes nucleotídicas de los cebadores pueden ser elegidas independientemente una de otra.
- 15 Por "adecuados para uso como cebadores directo e inverso, respectivamente, en la multiplicación de" una secuencia molde de referencia "que consiste en" una secuencia o ID. SEC. indicada, se quiere significar aquí que estos cebadores directo e inverso no flanquean la secuencia molde de referencia sino que se hibridan en las posiciones terminales exactas que permiten que la secuencia que se va a multiplicar consista en la secuencia molde de referencia indicada.
- 20 Más preferiblemente, un cebador del invento consiste en 14-30 nucleótidos, la secuencia del cual tiene una identidad de al menos 80%, preferiblemente de al menos 85%, más preferiblemente de al menos 90%, aún más preferiblemente de al menos 92%, aún más preferiblemente de al menos 95%, muy preferiblemente de al menos 97%, con una secuencia de la misma longitud contenida en el extremo 3' terminal o en el extremo 5' terminal de su secuencia molde de referencia o el subfragmento conservativo de la misma, o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia o del subfragmento conservativo de la misma por todo lo largo de esta secuencia molde de referencia o la secuencia complementaria de la misma.
- 25 Por ejemplo, una pareja de cebadores del invento puede consistir en un cebador directo y un cebador inverso, cada uno de los cuales consiste independientemente en 14-30 nucleótidos,
- 30 en que la secuencia del cebador directo tiene una identidad de al menos 80%, preferiblemente de al menos 85%, más preferiblemente de al menos 90%, aún más preferiblemente de al menos 92%, aún más preferiblemente de al menos 95%, muy preferiblemente de al menos 97%, con una secuencia de la misma longitud contenida en el extremo 5' terminal de su secuencia molde de referencia o el subfragmento conservativo de la misma, y
- 35 en que la secuencia del cebador inverso tiene una identidad de al menos 80%, preferiblemente de al menos 85%, más preferiblemente de al menos 90%, aún más preferiblemente de al menos 92%, aún más preferiblemente de al menos 95%, muy preferiblemente de al menos 97%, con una secuencia de la misma longitud contenida en el extremo 5' terminal de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia o el subfragmento conservativo de la misma, por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia o la secuencia complementaria de la misma.
- 40 Un cebador del invento consiste preferiblemente en 14-28, más preferiblemente 15-28, aún más preferiblemente 16-27, aún más preferiblemente 16-26, muy preferiblemente 17-25, nucleótidos, tal como, por ejemplo, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos.
- Dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son preferiblemente un oligonucleótido de ID. SEC. nº 7 (cebador directo) o una variante conservativa del mismo, y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 12 (cebador inverso) o una variante conservativa del mismo.
- 45 Dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son preferiblemente:
- un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 (cebador directo) o una variante conservativa del mismo, y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18 (cebador inverso) o una variante conservativa del mismo, o son
 - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 21, 27, 33 y 39 o una variante conservativa del mismo, y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 24, 30 y 36 o una variante conservativa del mismo.
- 50 Dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG pueden ser, por ejemplo, al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 21 y 27 o una variante conservativa del mismo, y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 24, 30 y 36 o una variante conservativa

del mismo.

Dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son preferiblemente un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 o una variante conservativa del mismo, y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 24 y 36 o una variante conservativa del mismo.

- 5 Más preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 o una variante conservativa del mismo, y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 24 o una variante conservativa del mismo.

- Más preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 o una variante conservativa del mismo, y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 24, 30 y 36 o una variante conservativa del mismo. Muy preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 o una variante conservativa del mismo, y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 30 o una variante conservativa del mismo.

- 10 Dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son preferiblemente un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36 o una variante conservativa del mismo, y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 21, 27, 33 y 39 o una variante conservativa del mismo.

- 15 Muy preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 33 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, o son uno de ID. SEC. nº 39 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36.

Dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son preferiblemente un oligonucleótido de ID. SEC. nº 44 o una variante conservativa del mismo, y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 47 o una variante conservativa del mismo.

- 20 Más particularmente, las variantes conservativas de dichos cebadores comprenden aquellos cebadores variantes cuya secuencia tiene una identidad de al menos 80%, preferiblemente de al menos 85%, más preferiblemente de al menos 90%, aún más preferiblemente de al menos 92%, aún más preferiblemente de al menos 95%, muy preferiblemente de al menos 97%, con al menos una de las anteriormente mencionadas secuencias cebadoras ID. SEC.

- 25 Dicha al menos una sonda dirigida a CT o MG o NG, que es adecuada para la detección de CT o MG o NG, respectivamente, en una multiplicación múltiple en tiempo real, es un oligonucleótido cuya secuencia es adecuada para uso como una sonda para la detección de al menos un amplicón producido a partir de CT o MG o NG, respectivamente, por dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT o MG o NG.

Por lo tanto, la secuencia de dicha sonda dirigida a CT o MG o NG difiere necesariamente de la secuencia de los cebadores dirigidos a CT, MG y NG.

- 30 Ventajosamente, dicha al menos una sonda dirigida a CT es una sonda específica para CT que se hibrida con amplicones de CT sin hibridarse con amplicones de NG ni MG bajo condiciones de un rigor al menos moderado.

Ventajosamente, dicha al menos una sonda dirigida a MG es una sonda específica para MG que se hibrida con amplicones de MG sin hibridarse con amplicones de CT ni NG bajo condiciones de un rigor al menos moderado.

Ventajosamente, dicha al menos una sonda dirigida a NG es una sonda específica para NG que se hibrida con amplicones de NG sin hibridarse con amplicones de CT ni MG bajo condiciones de un rigor al menos moderado.

- 35 Dicha al menos una sonda específica para CT es preferiblemente un oligonucleótido de 15-60 nucleótidos que es suficientemente complementario de un fragmento del mismo tamaño de dicha secuencia molde de referencia de CT, o de un fragmento del mismo tamaño de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de CT por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, para hibridarse con dicha secuencia molde de referencia de CT o la secuencia complementaria de la misma bajo unas condiciones de un rigor al menos moderado, pero que no es suficientemente complementario de ningún fragmento del mismo tamaño de dicha secuencia molde de referencia de MG o NG, ni de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de MG o NG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia de MG o NG, para hibridarse con dicha secuencia molde de referencia de MG o NG o con la secuencia complementaria de la misma bajo las mismas condiciones de rigor.

- 45 Dicha al menos una sonda específica para MG es preferiblemente un oligonucleótido de 15-60 nucleótidos que es suficientemente complementario de un fragmento del mismo tamaño de dicha secuencia molde de referencia de MG, o de un fragmento del mismo tamaño de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de MG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, para hibridarse con dicha secuencia molde de referencia de MG o la secuencia complementaria de la misma bajo unas condiciones de un rigor al menos moderado, pero que no es suficientemente complementario de ningún fragmento del mismo tamaño de dicha secuencia molde de referencia de CT o NG, ni de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de CT o NG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia de CT o NG, para hibridarse con dicha secuencia molde de referencia de CT o NG o con la secuencia complementaria de la misma bajo las mismas condiciones de rigor.

5 Dicha al menos una sonda específica para NG es preferiblemente un oligonucleótido de 15-60 nucleótidos que es suficientemente complementario de un fragmento del mismo tamaño de dicha secuencia molde de referencia de NG, o de un fragmento del mismo tamaño de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de NG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, para hibridarse con dicha secuencia molde de referencia de NG o la secuencia complementaria de la misma bajo unas condiciones de un rigor al menos moderado, pero que no es suficientemente complementario de ningún fragmento del mismo tamaño de dicha secuencia molde de referencia de CT o MG, ni de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de CT o MG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia de CT o MG, para hibridarse con dicha secuencia molde de referencia de CT o MG o con la secuencia complementaria de la misma bajo las mismas condiciones de rigor.

Más preferiblemente, dicha al menos una sonda específica para CT es un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de CT, o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de CT por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

15 en que dicho fragmento no se hibrida con dichas secuencias molde de referencia de MG ni NG bajo unas condiciones de un rigor al menos moderado.

Más preferiblemente, dicha al menos una sonda específica para MG es un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de MG, o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de MG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

20 en que dicho fragmento no se hibrida con dichas secuencias molde de referencia de CT ni NG bajo unas condiciones de un rigor al menos moderado.

Más preferiblemente, dicha al menos una sonda específica para NG es un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de NG, o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de NG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

25 en que dicho fragmento no se hibrida con dichas secuencias molde de referencia de CT ni MG bajo unas condiciones de un rigor al menos moderado.

Con la expresión "condiciones de un rigor al menos moderado" se quiere significar condiciones de rigor moderado, elevado o muy elevado.

A las expresiones "rigor moderado", "rigor elevado" y "rigor muy elevado" se les da su significado ordinario en este campo.

30 El rigor se refiere a las condiciones de hibridación escogidas para optimizar la unión de secuencias polinucleotídicas con diferentes grados de complementariedad. El rigor se ve afectado por factores tales como la temperatura, las condiciones salinas, la presencia de disolventes orgánicos en las mezclas de hibridación, y las longitudes y composiciones de bases de las secuencias que se van a hibridar y el grado de apareamientos erróneos entre bases, y la combinación de parámetros es más importante que la medida absoluta de cualquier factor.

35 Las condiciones ilustrativas de un rigor moderado comprenden:

- hibridación con DNA unido a un filtro en SSC 5x, dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, sodium dodecyl sulfate) al 2%, 100 microgramos/ml de DNA de cadena sencilla, a 55-65 °C durante 8 horas, y lavado en SSC 0,2x y SDS al 0,2% a 50-55 °C durante treinta minutos.

Las condiciones ilustrativas de un rigor elevado comprenden:

- 40 – hibridación con DNA unido a un filtro en SSC 5x, dodecilsulfato sódico (SDS) al 2%, 100 microgramos/ml de DNA de cadena sencilla, a 55-65 °C durante 8 horas, y lavado en SSC 0,2x y SDS al 0,2% a 60-65 °C durante treinta minutos.

Las condiciones ilustrativas de un rigor muy elevado comprenden:

- 45 – hibridación con DNA unido a un filtro en SSC 5x, dodecilsulfato sódico (SDS) al 2%, 100 microgramos/ml de DNA de cadena sencilla, a 55-65 °C durante 8 horas, y lavado en SSC 0,1x y SDS al 0,1% a 60-65 °C durante treinta minutos.

Muy preferiblemente, dicha al menos una sonda específica para CT, que es adecuada para la detección de CT en una multiplicación múltiple en tiempo real, es preferiblemente:

- 50 i. un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de CT, o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de CT por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, o

ii. una variante conservativa del mismo, que procede de un fragmento de i. por delección y/o sustitución y/o adición de al menos un nucleótido pero que ha conservado la capacidad de ser una sonda específica para CT, en que dicho fragmento no se hibrida con dichas secuencias molde de referencia de NG ni MG, tal como, por ejemplo, una variante conservativa de un fragmento de i. cuya secuencia tiene al menos un 90% de identidad con un fragmento de i. por todo lo largo de dicho fragmento de i.

Muy preferiblemente, dicha al menos una sonda específica para MG, que es adecuada para la detección de MG en una multiplicación múltiple en tiempo real, es preferiblemente:

iii. un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de MG, o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de MG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, o

iv. una variante conservativa del mismo, que procede de un fragmento de iii. por delección y/o sustitución y/o adición de al menos un nucleótido pero que ha conservado la capacidad de ser una sonda específica para MG, en que dicho fragmento no se hibrida con dichas secuencias molde de referencia de CT ni NG, tal como, por ejemplo, una variante conservativa de un fragmento de iii. cuya secuencia tiene al menos un 90% de identidad con un fragmento de iii. por todo lo largo de dicho fragmento de iii.

Muy preferiblemente, dicha al menos una sonda específica para NG, que es adecuada para la detección de NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, es preferiblemente:

v. un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de NG, o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de NG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, o

vi. una variante conservativa del mismo, que procede de un fragmento de v. por delección y/o sustitución y/o adición de al menos un nucleótido pero que ha conservado la capacidad de ser una sonda específica para NG, en que dicho fragmento no se hibrida con dichas secuencias molde de referencia de CT ni MG, tal como, por ejemplo, una variante conservativa de un fragmento de v. cuya secuencia tiene al menos un 90% de identidad con un fragmento de v. por todo lo largo de dicho fragmento de v. (alineamiento global, al que también se hace referencia como alineamiento "de agujas").

Dicho porcentaje de identidad es preferiblemente de al menos 91%, más preferiblemente de al menos 92%, aún más preferiblemente de al menos 93%, aún más preferiblemente de al menos 94%, muy preferiblemente que al menos 95%, por ejemplo, 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

Una sonda del invento comprende al menos 15 nucleótidos. Por ejemplo, consiste en 15-60 nucleótidos. Una sonda del invento consiste preferiblemente en 15-50, más preferiblemente 15-40, aún más preferiblemente 15-30, aún más preferiblemente 16-30, aún más preferiblemente 18-30, muy preferiblemente 19-30, aún mucho más preferiblemente 21-29, aún mucho más preferiblemente 22-27, nucleótidos, por ejemplo, 22, 23, 24, 25, 26 ó 27 nucleótidos.

Dicha al menos una sonda específica para CT es preferiblemente de ID. SEC. nº 8 ó 10 (sondas para CT: SCT 175b y 175c), o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC., por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.

Dicha al menos una sonda específica para MG es preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 16, 22, 28, 34 y 40 (sondas para MG: SF-MG 258c, MGBR 140c, MGBR 186j, MGBR 178q, MGBR 204u), o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC., por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.

Dicha al menos una sonda específica para NG es de ID. SEC. nº 45 (sonda pilEc para NG), o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC., por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.

Se puede enlazar una sonda del invento con al menos una etiqueta de detección, y/o al menos un brazo nucleotídico que no esté relacionado con CT, MG ni NG y que esté destinado a llevar un agente sofocador o un agente informador (por ejemplo, un fluoróforo).

En la técnica se conocen diversos formatos (tipos) de sondas, incluyendo sondas Taqman™ (sondas de hidrólisis), balizas moleculares TM (sondas baliza o sondas baliza moleculares) y sondas Scorpion™.

Por ejemplo, se puede enlazar a al menos un brazo de la baliza o a al menos un brazo de Scorpion™, preferiblemente a al menos uno de dichos brazos en 5' y/o 3', muy preferiblemente a dos de dichos brazos en 5' y en 3', respectivamente.

Uno de los formatos preferidos es el formato de baliza.

La estructura de las balizas moleculares es la siguiente. Una secuencia nucleotídica corta (llamada brazo de baliza) que no está relacionada con la secuencia diana está así covalentemente enlazada a ambos extremos de la sonda.

Un brazo no relacionado corto está así enlazado en 5' de la sonda y está marcado con un grupo fluorescente (es decir, un colorante fluorescente o un marcador fluorescente). Otro brazo, pero igualmente no relacionado, está enlazado con el extremo 3' de la sonda y está marcado con un grupo sofocador de la fluorescencia. De esta manera, las balizas moleculares tienen un fluoróforo y un agente sofocador en extremos opuestos. El brazo corto 5' es totalmente complementario de aquél en 3' para que se puedan hibridar entre sí y, de este modo, puedan adoptar una estructura en horquilla cuando no están hibridados con la diana en disolución. En esta conformación en horquilla, el agente sofocador y el colorante fluorescente están lo suficientemente próximos entre sí para permitir una sofocación eficaz del fluoróforo. Sin embargo, cuando la sonda se encuentra con una molécula diana, la hibridación se ve favorecida con respecto a la conformación en horquilla cuando se eligen adecuadamente los valores de T_m del brazo de la baliza y de T_m de la sonda (teóricamente: T_m de la sonda > T_m del brazo de la baliza > T_m del cebador, en que T_m es la temperatura de fusión de interés). El fluoróforo y el agente sofocador se alejan uno de otro y el fluoróforo puede emitir entonces fluorescencia cuando es iluminado por una excitación lumínica adecuada. Conforme transcurre la PCR, se acumula el producto de multiplicación, y la cantidad de fluorescencia en cualquier ciclo dado depende de la cantidad de producto de multiplicación presente en ese momento (véanse, por ejemplo, Sanjay Tyagi y Fred Russell Kramer, *Nature Biotechnology* 1996, volumen 14, páginas 303-308; *Nature Biotechnology* 1998, volumen 16, páginas 49-53).

(Observación: también es posible enlazar el fluoróforo al extremo 3' mientras se fija el agente sofocador al extremo 5').

Esquemáticamente, dicha sonda puede tener las fórmulas siguientes (formato de baliza molecular):

5' fluoróforo-(brazo 1)-sonda-(brazo 2)-agente sofocador 3'

5' agente sofocador-(brazo 1)-sonda-(brazo 2)-fluoróforo 3'

en que brazo 1 y brazo 2 pueden ser cualesquier secuencias nucleotídicas cortas, por ejemplo, en el intervalo de 3-10 nucleótidos, preferiblemente 5, 6 ó 7 nucleótidos, que permiten la formación de la estructura en horquilla bajo las condiciones de rigor adecuadas; es decir, el brazo 1 y el brazo 2 son totalmente complementarios para que se hibriden bajo las condiciones de rigor deseadas (las condiciones de rigor estándares para PCR incluyen, por ejemplo, una temperatura de hibridación de 55 a 65 °C y una concentración de Mg de 4 a 8 mM). Sin embargo, el brazo 1 y el brazo 2 no están relacionados con la secuencia diana de la sonda, es decir, la conformación en horquilla que resulta de la hibridación entre el brazo 1 y el brazo 2 es esencialmente la única estructura secundaria posible para la sonda cuando no está hibridada. La persona experta sabrá cómo elegir dichos brazos para una sonda dada.

Más adelante, en el Ejemplo 1 se proporcionan brazos de baliza ilustrativos.

Por "fluoróforo" se entiende aquí cualquier marcador/colorante fluorescente conocido en la técnica. Los ejemplos de dichos marcadores fluorescentes adecuados incluyen Fam, Hex, Tet, Joe, Rox, Tamra, Max, Edans, colorantes Cy tales como Cy5, fluoresceína, cumarina, eosina, rodamina, Bodipy, Alexa, Cascade Blue, Yakima Yellow, Lucifer Yellow y Texas Red (todos los cuales son marcas comerciales), y la familia de colorantes ATTO.

Por "agente sofocador" entendemos aquí cualquier agente sofocador conocido en la técnica. Los ejemplos de dichos agente sofocadores incluyen Dabcyl, Dark Quencher, Eclipse Dark Quencher, ElleQuencher, Tamra, BHQ y QSY (todos los cuales son marcas comerciales).

La persona experta sabrá qué combinaciones de colorante/agente sofocador son adecuadas cuando se diseña una sonda.

En una realización preferida de acuerdo con el invento, se pueden elegir las propiedades espectrales de dichas sondas para que no interfieran entre sí. En particular, cuando se usan sondas en modo múltiple, cada sonda individual puede tener su propio fluoróforo que espectralmente es significativamente diferente del de las otras; es decir, los espectros de absorción/emisión son esencialmente no solapantes. Esto permite ventajosamente la detección múltiple de bajo ruido para todas las sondas individuales, lo que asegura que las señales individuales no interfieren entre sí en la detección.

Los ejemplos de colorantes que se pueden utilizar juntos en modo múltiple incluyen Fam con Tamra, y Fam con Tamra con Texas Red.

La elección de los colorantes apropiados que se van a utilizar juntos puede depender también del filtro contenido en el aparato de multiplicación.

Dicha al menos una sonda específica para CT es muy preferiblemente de ID. SEC. n° 9 u 11 (sondas para CT: SCT 175b y 175c con brazos de baliza), o la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC., por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.

Dicha al menos una sonda específica para MG es muy preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 17, 23, 29, 35 y 41 (sondas para MG: SF-MG 258c, MGBR 140c, MGBR 186j, MGBR 178q,

MGBR 204u con brazos de baliza), o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC., por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.

5 Dicha al menos una sonda específica para NG es muy preferiblemente de ID. SEC. nº 46 (sonda pilEc para NG con brazos de baliza), o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC., por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.

10 Dicha al menos una sonda específica para CT o MG o NG puede ser también un oligonucleótido, que es una variante conservativa de dicha sonda ID. SEC., como se describió anteriormente, es decir, que procede de dicha secuencia ID. SEC. por delección y/o sustitución y/o adición de al menos un nucleótido pero que ha conservado la capacidad de ser una sonda específica para CT o MG o NG, tal como, por ejemplo, una variante conservativa de dicha secuencia ID. SEC. cuya secuencia tiene una identidad de al menos 90% con dicha secuencia ID. SEC. por todo lo largo de dicha secuencia ID. SEC. (alineamiento global, al que también se hace referencia como alineamiento "de agujas").

15 Una de las características técnicas especiales compartidas por dichas secuencias molde de referencia de CT, MG y NG es que son secuencias molde de referencia que son adecuadas para construir y producir cebadores dirigidos a CT, MG y NG, así como sondas específicas para CT, MG y NG, que se pueden usar conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo para detectar específicamente al menos una CT y/o al menos un MG y/o al menos una NG, ventajosamente al menos una CT y al menos un MG y al menos una NG, en tiempo real en dicho mismo tubo.

Preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 7 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 12, y dicha al menos una sonda específica para CT es seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 8, 9, 10 y 11.

20 Preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 16 ó 17, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC.

25 Preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 24, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 22 ó 23, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC.

30 Preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 30, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 28 ó 29, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC.

35 Preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 33 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 34 ó 35, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC.

Preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 39 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 40 ó 41, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC.

40 Preferiblemente, dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 44 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 47, y dicha al menos una sonda específica para NG es de ID. SEC. nº 45 ó 46, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC.

45 Ventajosamente, de acuerdo con el invento, dichos cebadores de multiplicación pueden comprender al menos dos cebadores dirigidos a CT, y al menos dos cebadores dirigidos a MG, y al menos dos cebadores dirigidos a NG.

Preferiblemente:

- dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 7 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 12, y
- 50 – dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18; o un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 24; o un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 30; o un oligonucleótido de ID. SEC. nº 33 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36; o un oligonucleótido de ID. SEC. nº 39 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y
- dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 44 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 47.

Ventajosamente, de acuerdo con el invento, dicha al menos una sonda puede comprender al menos una sonda específica para CT y al menos una sonda específica para MG y al menos una sonda específica para NG.

Preferiblemente:

- 5 – dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 7 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 12, y dicha al menos una sonda específica para CT es de ID. SEC. nº 8, 9, 10 u 11, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC., y
- 10 – dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 44 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 47, y dicha al menos una sonda específica para NG es de ID. SEC. nº 45 ó 46, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC., y
- dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG y dicha al menos una sonda específica para MG son como viene a continuación:
 - 15 – dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 16 ó 17, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC., o
 - 20 – dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 24, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 22 ó 23, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC., o
 - 25 – dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 30, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 28 ó 29, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC., o
 - dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 33 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 34 ó 35, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC., o
 - 30 – dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 39 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 40 ó 41, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por toda la longitud de esta secuencia ID. SEC.

35 De acuerdo con una realización ventajosa del invento, la detección de CT y/o MG y/o NG puede realizarse en una multiplicación múltiple en tiempo real.

Por supuesto, los cebadores y sondas del invento son también adecuados para otros protocolos, incluyendo protocolos simples, protocolos múltiples, protocolos de punto final, protocolos cualitativos, protocolos cuantitativos, combinaciones de los mismos, y similares.

40 Dicha multiplicación puede ser cualquier multiplicación de ácido nucleico que la persona experta encuentre apropiada, tal como, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction) o una técnica de multiplicación isotérmica, tal como, por ejemplo, una multiplicación mediada por transcripción (TMA; del inglés, transcription mediated amplification), una multiplicación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA; del inglés, nucleic acid sequences based amplification), una replicación de secuencias automantenida (3SR) o una multiplicación por desplazamiento de cadenas.

45 Dicha multiplicación es preferiblemente PCR.

En una realización preferida, los cebadores de acuerdo con el invento se utilizan en una concentración final en el intervalo de 20-2000 nM. Típicamente, dichos cebadores se pueden utilizar en una concentración final en el intervalo de 20-1300 nM, preferiblemente de 20-1250 nM, más preferiblemente de 25-1250 nM, por ejemplo, de aproximadamente 25, 125, 250, 500, 850 ó 1250 nM.

50 Se puede optimizar la concentración de sonda en una reacción PCR, variando típicamente la concentración final de 50 nM a 1000 nM. En una realización preferida, cada sonda de acuerdo con el invento se utiliza en una concentración final en el intervalo de 75-300 nM, preferiblemente 75-250 nM, más preferiblemente 100-250 nM, aún más preferiblemente 150-200 nM, por ejemplo, de aproximadamente 150 nM o aproximadamente 200 nM.

- 5 Las condiciones de multiplicación apropiadas son conocidas por los expertos en la técnica. Incluyen condiciones de temperatura, en particular las condiciones de los ciclos térmicos, tales como, por ejemplo, la temperatura, duración, número y velocidad de calentamiento de los ciclos. En una realización preferida, dichas condiciones de temperatura incluyen condiciones adecuadas para una PCR. En otra realización preferida, dichas condiciones incluyen condiciones adecuadas para una Q-PCR.
- De acuerdo con el invento, también se puede implementar un testigo interno (IC) que no está relacionado con CT ni/o MG ni/o NG, tal como el IC de ID. SEC. n° 48.
- 10 Un pareja de cebadores apropiada para la multiplicación de dicho IC comprende la pareja de cebadores de ID. SEC. números 49 y 52. Una sonda para IC apropiada comprende la sonda de ID. SEC. n° 50 (ID. SEC. n° 51 en formato de baliza).
- Estos IC, cebadores de IC y sondas para IC quedan también individualmente abarcados como tales por la solicitud.
- También se puede implementar una pareja de cebadores de rRNA 16S, tal como, por ejemplo, la pareja de cebadores de ID. SEC. números 53 y 54. Este sistema se utiliza con objeto de detectar la presencia de DNA bacteriano en la muestra.
- 15 La solicitud también describe un amplicón obtenible por implementación del procedimiento del invento sobre una muestra que contiene CT y/o MG y/o NG.
- El invento se refiere a cualquier composición de multiplicación, obtenible por implementación del procedimiento del invento sobre una muestra que contiene CT y/o MG y/o NG y que comprende además:
- 20 – dichos cebadores dirigidos a CT, cebadores dirigidos a MG y cebadores dirigidos a NG como se definen en el procedimiento del invento; o
- un sistema de cebadores del invento que comprende tres parejas de oligonucleótidos, en que
- para cada una de dichas tres parejas de oligonucleótidos:
 - cada oligonucleótido es de 14-30 nucleótidos, y
 - teniendo la secuencia de un oligonucleótido de dicha pareja una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de una secuencia molde de referencia, y teniendo la secuencia del otro oligonucleótido de dicha pareja una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,
 - y en que dicha secuencia molde de referencia es:
 - para una de dichas tres parejas: la ID. SEC. n° 6;
 - para otra de dichas tres parejas: la ID. SEC. n° 14 o la ID. SEC. n° 20 o la ID. SEC. n° 26 o la ID. SEC. n° 32 o la ID. SEC. n° 38;
 - para la última de dichas tres parejas: la ID. SEC. n° 43.
- 25
- 30
- 35 La solicitud también describe los cebadores y sondas como tales, es decir, como productos oligonucleotídicos individuales.
- De acuerdo con la solicitud y el invento, todos los oligonucleótidos proporcionados pueden ser mantenidos separadamente o parcialmente mezclados o totalmente mezclados.
- Dichos oligonucleótidos pueden ser proporcionados bajo forma seca o solubilizados en un disolvente adecuado, según estime la persona experta. Los disolventes adecuados incluyen TE, agua de calidad para PCR, y similares.
- 40 La solicitud describe además todo producto que aquí se describe, y, más particularmente, todo polinucleótido molde de referencia, todo cebador y toda sonda, como un producto individual.
- La solicitud también describe toda posible combinación que se puede hacer de al menos dos productos del invento, preferiblemente de al menos tres productos del invento, tal como, por ejemplo, de al menos dos cebadores del invento y al menos una sonda del invento.
- 45 La solicitud describe así un polinucleótido adecuado para uso como una secuencia molde de referencia en el diseño de cebadores y sondas que se pueden utilizar en el mismo tubo para la detección de CT y MG y NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, en que dicho polinucleótido es seleccionado entre:

- para el diseño de cebadores y sondas para CT: un fragmento que consiste en las posiciones 5571-5760 (ID. SEC. nº 5) de la secuencia de CT de ID. SEC. nº 1 (plásmido pCHL1 de CT; J03321), o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a CT que permiten una detección múltiple de CT en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento,
- para el diseño de cebadores y sondas para MG: un fragmento que consiste en:
 - las posiciones 1-270 (ID. SEC. nº 13) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 2 (región 5' del gen de la adhesina de MG; X91074), o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento,
 - las posiciones 1140-1290 (ID. SEC. nº 19) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3 (gen de la adhesina de MG; M31431), o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento,
 - las posiciones 1060-1250 (ID. SEC. nº 25) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento,
 - las posiciones 1520-1710 (ID. SEC. nº 31) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento,
 - las posiciones 1500-1710 (ID. SEC. nº 37) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento,
- para el diseño de cebadores y sondas para NG: un fragmento que consiste en las posiciones 101-380 (ID. SEC. nº 42) de la secuencia de NG de ID. SEC. nº 4 (gen *pilE* de NG; AF042097), o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a NG que permiten una detección múltiple de NG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento.

Preferiblemente, dicho polinucleótido molde de referencia es:

- para el diseño de cebadores y sondas para CT: el fragmento que consiste en las posiciones 5580-5754 (ID. SEC. nº 6) de la secuencia de CT de ID. SEC. nº 1, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento,
- para el diseño de cebadores y sondas para MG:
 - el fragmento que consiste en las posiciones 2-259 (ID. SEC. nº 14) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 2, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento, o
 - el fragmento que consiste en las posiciones 1144-1283 (ID. SEC. nº 20) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento, o
 - el fragmento que consiste en las posiciones 1064-1249 (ID. SEC. nº 26) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento, o
 - el fragmento que consiste en las posiciones 1527-1704 (ID. SEC. nº 32) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo

largo de dicho fragmento, o

– el fragmento que consiste en las posiciones 1501-1704 (ID. SEC. nº 38) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento, o

- 5 – para el diseño de cebadores y sondas para NG: el fragmento que consiste en las posiciones 114-365 (ID. SEC. nº 43) de la secuencia de NG de ID. SEC. nº 4, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento por todo lo largo de dicho fragmento.

10 El invento se refiere a un método para la producción de cebadores y sondas que se pueden utilizar en el mismo tubo para la detección de CT y MG y NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que comprende producir al menos una pareja de cebadores y al menos una sonda, en que un oligonucleótido de dicha pareja de cebadores es de 14-30 nucleótidos, cuya secuencia tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de una secuencia molde de referencia, y el otro oligonucleótido de dicha pareja de cebadores es de 14-30 nucleótidos, cuya secuencia tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

15 en que dicha sonda es:

- i. un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, o
- 20 ii. una variante conservativa de un fragmento como el definido en i., teniendo la secuencia de dicha variante conservativa una identidad de al menos 90% con la secuencia de dicho fragmento de i. por todo lo largo de dicho fragmento de i.,

estando dicha sonda opcionalmente enlazada con al menos una etiqueta de detección y/o al menos un brazo de baliza,

25 en que dicha secuencia molde de referencia es una secuencia molde de referencia de la solicitud.

El invento también se refiere a un cebador, que está especialmente adaptado para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que es:

30 un oligonucleótido de 14-30 nucleótidos cuya secuencia tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de una secuencia molde de referencia o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

en que dicha secuencia molde de referencia es:

- la ID. SEC. nº 6; o
- la ID. SEC. nº 14 o la ID. SEC. nº 20 o la ID. SEC. nº 26 o la ID. SEC. nº 32 o la ID. SEC. nº 38; o
- 35 – la ID. SEC. nº 43.

El invento también se refiere a un cebador que está especialmente adaptado para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que es:

- un cebador dirigido a CT, seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 7 y 12, o
- 40 – un cebador dirigido a MG, seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 y 39, o
- un cebador dirigido a NG, seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 44 y 47, o
- una variante conservativa de dichos cebadores, como aquí se define.

El invento también se refiere a un sistema de cebadores que está especialmente adaptado para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que comprende:

- 45 al menos una pareja de oligonucleótidos, cada uno de ellos de 14-30 nucleótidos,
- teniendo la secuencia de un oligonucleótido de dicha pareja una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de una secuencia molde de referencia, y

teniendo la secuencia del otro oligonucleótido de dicha pareja una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

en que dicha secuencia molde de referencia es:

- 5
- la ID. SEC. nº 6; o
 - la ID. SEC. nº 14 o la ID. SEC. nº 20 o la ID. SEC. nº 26 o la ID. SEC. nº 32 o la ID. SEC. nº 38; o
 - la ID. SEC. nº 43.

El invento también se refiere a un sistema de cebadores que está especialmente adaptado para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que comprende al menos dos cebadores dirigidos a CT y/o al menos dos cebadores dirigidos a MG y/o al menos dos cebadores dirigidos a NG, de modo que:

- 10
- al menos una pareja de cebadores dirigidos a CT de ID. SEC. nº 7 e ID. SEC. nº 12, y/o
 - al menos una pareja de cebadores dirigidos a MG, seleccionada de entre las parejas siguientes: las ID. SEC. números 15 y 18; las ID. SEC. números 21 y 24; las ID. SEC. números 27 y 30; las ID. SEC. números 33 y 36; y las ID. SEC. números 39 y 36, y/o
- 15
- al menos una pareja de cebadores dirigidos a NG de ID. SEC. números 44 y 47.

El invento también se refiere a un sistema de cebadores que comprende tres de dichas parejas de oligonucleótidos, y en que dicha secuencia molde de referencia es:

- para una de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 6;
- 20
- para otra de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 14 o la ID. SEC. nº 20 o la ID. SEC. nº 26 o la ID. SEC. nº 32 o la ID. SEC. nº 38;
 - para la última de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 43.

El invento también se refiere a una sonda, que está especialmente adaptada para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que es:

- 25
- una sonda específica para CT de ID. SEC. nº 8 ó 10, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o
 - una sonda específica para MG de ID. SEC. nº 16, 22, 28, 34 ó 40, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o
 - una sonda específica para NG de ID. SEC. nº 45, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o
- 30
- una variante conservativa de dichas sondas, como aquí se define,

estando dicha sonda opcionalmente enlazada con al menos una etiqueta de detección y/o al menos un brazo de baliza.

El invento también se refiere a una sonda de baliza que está especialmente adaptada para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que es:

- 35
- una sonda específica para CT de ID. SEC. nº 9 ó 11, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o
 - una sonda específica para MG de ID. SEC. nº 17, 23, 29, 35 ó 41, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o
- 40
- una sonda específica para NG de ID. SEC. nº 45 ó 46, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o
 - una variante conservativa de dichas sondas.

La solicitud también describe un sistema de cebadores y sondas que está especialmente adaptado para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que comprende al menos un cebador de la solicitud y al menos una sonda de la solicitud, preferiblemente al menos un sistema de cebadores de la solicitud y al menos un sistema de sondas de la solicitud.

- 45

El invento también se refiere a un sistema de cebadores y sondas que está especialmente adaptado para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que comprende al menos un cebador del invento y al menos una sonda del invento, preferiblemente al menos un sistema de cebadores del invento y al menos una sonda del invento.

- 5 La solicitud también describe un amplicón, obtenible por multiplicación de al menos un ácido nucleico de CT y/o MG y/o NG por medio de al menos un sistema de cebadores del invento.

La solicitud también describe una composición de multiplicación, que comprende al menos un amplicón de acuerdo con el invento.

- 10 El invento también se refiere a cualquier composición de multiplicación obtenible por multiplicación de al menos un ácido nucleico de CT y/o MG y/o NG por medio de al menos un sistema de cebadores del invento, y que comprende además:

- dichos cebadores dirigidos a CT, cebadores dirigidos a MG y cebadores dirigidos a NG como se definen en el procedimiento del invento; o
- un sistema de cebadores del invento que comprende tres parejas de oligonucleótidos, en que

- 15
- para cada una de dichas tres parejas de oligonucleótidos:
 - cada oligonucleótido es de 14-30 nucleótidos, y
 - teniendo la secuencia de un oligonucleótido de dicha pareja una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de una secuencia molde de referencia, y teniendo la secuencia del otro oligonucleótido de dicha pareja una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,
 - y en que dicha secuencia molde de referencia es:
 - para una de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 6;
 - para otra de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 14 o la ID. SEC. nº 20 o la ID. SEC. nº 26 o la ID. SEC. nº 32 o la ID. SEC. nº 38;
 - para la última de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 43.
- 20
- 25

El invento también se refiere a un kit para el diagnóstico de una infección por CT y/o MG y/o NG, que comprende:

- al menos un sistema de cebadores del invento, y/o
- 30 – al menos una sonda del invento, y
- opcionalmente, instrucciones para el uso de los mismos y/o nucleótidos.

En el kit de acuerdo con el invento, los oligonucleótidos (cebadores, sondas) pueden ser mantenidos separadamente, o parcialmente mezclados o totalmente mezclados.

- 35 Dichos oligonucleótidos pueden ser proporcionados bajo forma seca o solubilizados en un disolvente adecuado, según estime la persona experta. Los disolventes adecuados incluyen TE, agua de calidad para PCR, y similares.

En una realización preferida, el kit de acuerdo con el invento también puede contener más reactivos adecuados para una operación de PCR.

- 40 Dichos reactivos son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen agua, como agua exenta de nucleasas, agua exenta de RNAsas, agua exenta de DNAsas o agua de calidad para PCR; sales, como magnesio y potasio; tampones, tales como Tris; enzimas, incluyendo polimerasas, tales como Taq, Vent y Pfu (todas ellas marcas comerciales), polimerasa activable, y similares; nucleótidos, como desoxinucleótidos, didesoxinucleótidos, dNTPs, dATP, dTTP, dCTP, dGTP y dUTP; otros reactivos, como DTT y/o inhibidores de RNAsas; y polinucleótidos, como poliT y polidT, y otros oligonucleótidos, tales como, por ejemplo, cebadores.

- 45 En otra realización preferida, el kit de acuerdo con el invento comprende testigos para PCR. Dichos testigos son conocidos en la técnica e incluyen testigos cualitativos, testigos positivos, testigos negativos, testigos internos, testigos cuantitativos y testigos cuantitativos internos, así como intervalos de calibración. El testigo interno para dicha operación de PCR puede ser un molde que no esté relacionado con el molde diana en la operación de PCR. Dichos testigos pueden comprender también cebadores testigo y/o sondas testigo. Por ejemplo, en el caso de la detección de HPV, es posible usar como testigo interno un polinucleótido elegido de un gen cuya presencia está excluida en

una muestra que procede de un cuerpo humano (por ejemplo, un gen vegetal) y cuyo tamaño y contenido de GC son equivalentes a los de la secuencia diana.

Los testigos internos ilustrativos comprenden el IC de ID. SEC. n° 48. De este modo, los cebadores de IC apropiados comprenden el cebador de ID. SEC. n° 49 y el cebador de ID. SEC. n° 50, que forman conjuntamente una pareja de cebadores capaz de multiplicar dicho IC de ID. SEC. n° 48. Las sondas para IC apropiadas comprenden la sonda de ID. SEC. n° 50 (o de ID. SEC. n° 51, en formato de baliza).

- 5
- En una realización preferida, el kit de acuerdo con el invento contiene medios para extraer y/o purificar ácido nucleico procedente de una muestra biológica, por ejemplo, de orina. Dichos medios son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 10
- En una realización preferida, el kit de acuerdo con el invento contiene instrucciones para su uso. Dichas instrucciones pueden ser ventajosamente un folleto, una tarjeta o similar. Dichas instrucciones pueden estar también presentes bajo dos formas: una detallada, que recoge información exhaustiva acerca del kit y su uso, posiblemente incluyendo también datos bibliográficos; y una forma de guía rápida o un memorando, por ejemplo, en forma de tarjeta, que recoge la información esencial necesaria para el uso del kit.
- 15
- El invento también se refiere a todas las aplicaciones médicas, biológicas y farmacéuticas del procedimiento de detección del invento, y/o de los cebadores y/o sondas del invento.

De este modo, el invento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico o pronóstico de una infección por CT y/o MG y/o NG, que comprende detectar CT y/o MG y/o NG con al menos un cebador del invento.

- 20
- La solicitud también describe un procedimiento para comprobar la eficacia de un tratamiento o fármaco anti-CT y/o anti-MG y/o anti-NG, o de un candidato a tratamiento o fármaco anti-CT y/o anti-MG y/o anti-NG, que comprende determinar, mediante el método de detección del invento, si dicho tratamiento, fármaco, candidato a tratamiento o candidato a fármaco provoca la no reaparición, no persistencia, desaparición, o disminución de la presencia de al menos uno de CT y/o MG y/o NG, de modo que una determinación positiva indica que dicho tratamiento, fármaco, candidato a tratamiento o candidato a fármaco es eficaz.

- 25
- La solicitud también describe un método para producir un fármaco anti-CT y/o anti-MG y/o anti-NG, que comprende:

proporcionar al menos un candidato a fármaco anti-CT y/o anti-MG y/o anti-NG,

administrar dicho al menos un candidato a fármaco anti-CT y/o anti-MG y/o anti-NG a un cultivo celular o a un animal no humano, en que dicho cultivo celular o dicho animal es o comprende al menos un CT y/o MG y/o NG, y

- 30
- determinar, mediante el método de detección del invento, si dicho candidato a fármaco anti-CT y/o anti-MG y/o anti-NG provoca la regresión o desaparición de dicho al menos un CT y/o MG y/o NG,
- de modo que una determinación positiva indica que dicho candidato a fármaco es un fármaco eficaz para CT y/o MG y/o NG.

- 35
- En la presente solicitud, los valores de inicio y fin de cualquier intervalo descrito han de entenderse como comprendidos dentro de dicho intervalo; por ejemplo, una expresión tal como "posiciones X a Y de una secuencia" describe una secuencia que se extiende del nucleótido de la posición X al nucleótido de la posición Y, en que tanto el nucleótido de la posición X como el nucleótido de la posición Y son parte de dicha secuencia.

- 40
- La expresión "que comprende", que es sinónima de "que incluye" y "que contiene", está abierta y no excluye un(os) elemento(s), ingrediente(s) u operación(es) de método adicional(es) no enumerado(s), mientras que la expresión "que consiste" es una expresión cerrada que excluye todo elemento, operación o ingrediente adicional que no haya sido explícitamente enumerado.

La expresión "que consiste esencialmente en" es una expresión parcialmente abierta que no excluye un(os) elemento(s), operación(es) o ingrediente(s) adicional(es) no enumerado(s) con tal de que este(os) elemento(s), operación(es) o ingrediente(s) adicional(es) no afecte(n) materialmente a las propiedades básicas y nuevas del invento.

- 45
- La expresión "que comprende" [o "comprende(n)"] incluye por lo tanto la expresión "que consiste en" ["consiste(n) en"] así como la expresión "que consiste esencialmente en" ["consiste(n) esencialmente en"]. En consecuencia, en la presente solicitud, con la expresión "que comprende" [o "comprende(n)"] se quiere significar más particularmente que abarca la expresión "que consiste en" ["consiste(n) en"] y la expresión "que consiste esencialmente en" ["consiste(n) esencialmente en"].

- 50
- En la presente solicitud, la expresión "al menos x" relativa a un conjunto o grupo de n elementos (en que x es diferente de cero y n es un número que es superior a x) abarca explícitamente cada valor que está comprendido entre x y n. Por ejemplo, la expresión "al menos uno" relativa a un grupo o conjunto de seis elementos abarca explícitamente uno, dos, tres, cuatro, cinco y seis de dichos elementos, así como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, y

al menos cinco de dichos elementos.

Cada una de las descripciones relevantes de todas las referencias aquí citadas se incorpora específicamente por referencia. Los ejemplos siguientes se proponen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLO 1: Diseño de los cebadores y sondas

5 1.1. Selección de cebadores y sonda para *C. trachomatis* (CT)

Como fuente de dianas de CT apropiadas, los inventores seleccionaron el plásmido críptico, que está presente en todos los serotipos de *C. trachomatis*. Este plásmido está contenido en 7-10 copias por genoma.

En Genbank están disponibles cuatro secuencias diferentes de este plásmido:

- plásmido pCHL1, cepa GO/86 de serotipo D (acceso J03321; 7502 bp),
- 10 – plásmido pCTT1 (acceso M19487; 7496 bp), de serotipo B,
- plásmido pLGV440 (acceso X06707; 7501 bp), de serotipo L1,
- plásmido CTPLAS75 (acceso X07547.1; 7499 bp), de serotipo L2.

Hay menos de 1% de variación entre estas cuatro secuencias (Comanducci et al., 1990, Plasmid 23: 149-154).

15 La secuencia del plásmido pCHL1, que es asequible bajo el número de acceso J03321, se muestra en la Figura 1 adjunta (ID. SEC. nº 1; 7502 nt).

Una secuencia diana de CT seleccionada está situada en el ORF5 de pCHL1. Dentro de la secuencia del ORF5 de pCHL1 los inventores han seleccionado una subsecuencia de ID. SEC. nº 5.

Subsecuencia de CT seleccionada dentro de pCHL1 de ID. SEC. nº 1

```

5571                                     cttaaagtta
5581 tttctgaatg agtactgcgc tcctttttat ga (catctgca taatagacac tcca[ccta)gc
5641 ctaggagggt taacgaaaga algcttttggt gcaggagaca aattaattgc ttgtttaact
20
5701 ccagaacctt tttctattct agggttacaa aagatcgtg aattcttaag ttcggtcgga

```

ID. SEC. nº 5

25 En esta subsecuencia de CT de ID. SEC. nº 5, los inventores han seleccionado una secuencia diana de CT (ID. SEC. nº 6). A los cebadores directo e inverso se hace referencia como U-PC 5580 y L-PC 5754, respectivamente. Se demostró que dos sondas fluorescentes marcadas con FAM (SCT175b y SCT175c) resultaban exitosas en cuanto a la detección del amplicón. Las secuencias de estos cebadores y sondas de CT se muestran en la anterior subsecuencia de CT de ID. SEC. nº 5 (de 5' a 3'):

- la secuencia de un cebador directo de CT (U-PC 5580; caracteres subrayados y negrillos),
- las respectivas secuencias de dos sondas para CT (sonda SCT 175b en caracteres subrayados y negrillos entre paréntesis; sonda SCT175c en caracteres subrayados y negrillos entre corchetes), y
- 30 – la secuencia diana de un cebador inverso de CT (L-PC 5754; en caracteres subrayados y negrillos).

Por lo tanto, la secuencia diana de CT seleccionada es:

Secuencia diana de CT (175 nt): posiciones 5580 a 5754 de la ID. SEC. nº 1

```

5580                                     a
5581 tttctgaatg agtactgcgc tcctttttat gacatctgca taatagacac tccacctagc
5641 ctaggagggt taacgaaaga agcttttggt gcaggagaca aattaattgc ttgtttaact
5701 ccagaacctt tttctattct agggttacaa aagatcgtg aattcttaag ttcg

```

ID. SEC. nº 6

Cebador directo U-PC 5580 de CT (20 nt): posiciones 5580 a 5599 de la ID. SEC. nº 1

ATT TCT GAA TGA GTA CTG CG **ID. SEC. nº 7**

Sonda SCT 175b para CT (26 nt): posiciones 5613 a 5638 de la ID. SEC. nº 1

CAT CTG CAT AAT AGA CAC TCC ACC TA **ID. SEC. nº 8**

5 brazos del beacon®: CGC GC en 5'; GC GCG en 3'

sonda en formato de beacon®:

CGC GCC ATC TGC ATA ATA GAC ACT CCA CCT AGC GCG **(ID. SEC. nº 9)**

colorante/agente sofocador: FAM en 5'; Dabcyl en 3'.

Sonda SCT 175c para CT (27 nt): posiciones 5635 a 5661 de la ID. SEC. nº 1

10 CCT AGC CTA GGA GGG TTA ACG AAA GAA **ID. SEC. nº 10**

brazos del beacon®: ACG CGC en 5'; GCG CGT en 3'

sonda en formato de beacon®:

ACG CGC CCT AGC CTA GGA GGG TTA ACG AAA GAA GCG CGT **(ID. SEC. nº 11)**

colorante/agente sofocador: FAM en 5'; Dabcyl en 3'.

15 Cebador inverso L-PC 5754 de CT (22 nt): complementario de las posiciones 5733 a 5754 de la ID. SEC. nº 1

CGA ACT TAA GAA TTC ACG TAT C **ID. SEC. nº 12**

1.2. Selección de cebadores y sonda para *Mycoplasma genitalium* (MG)

La secuencia diana de MG es seleccionada dentro del gen que codifica la proteína adhesina MgPa (principal proteína superficial). A este gen se hace referencia como gen de la adhesina o gen Pa o gen MgPa.

20 Está presente en una copia por genoma de bacteria y ha sido completamente secuenciado para la cepa G-37 de referencia (acceso M31431).

También se ha secuenciado una región 5' de este gen para otras cuatro cepas de MG; estas secuencias son asequibles de GenBank:

– acceso X91074, cepa M2341;

25 – acceso X91073, cepa M2321;

– acceso X91071, cepa 2288;

– acceso X91072, cepa 2300.

La secuencia de la región 5' del gen de la adhesina de la cepa M2341, que es asequible bajo el número de acceso X91074, se muestra en la Figura 2 adjunta (ID. SEC. nº 2).

30 La secuencia del gen de la adhesina de la cepa G-37, que es asequible bajo el acceso M31431, se muestra en la Figura 3 adjunta (ID. SEC. nº 3).

1.2.1. Diseño sobre la porción 5' del gen de la adhesina de MG, que tiene el número de acceso X91074 (ID. SEC. nº 2)

Una secuencia diana de MG seleccionada está situada dentro de la siguiente subsecuencia del gen Pa:

35 Subsecuencia de MG seleccionada dentro de la secuencia de MgPa de ID. SEC. nº 2

1 **aggatcattt ggattagtaa gaagccaaaa tgacaactta aatatttcaa gtgttacaaa
61 gaatgttngt gatgataatc tcaagtatct caatgctgtt gagaaatacc ttgatggta
121 gcaaaacttt gcaatcagaa ggtatgataa caacggtaga gctttatag atattaactt
181 agcaaaaatg gaaaaccct caacggtgca aaggggttta aatggcgagc ctatcttga
241 tccttttaa ggctttggt taactgtaa ID. SEC. nº 13**

5 Se ha seleccionado una secuencia diana de MG (ID. SEC. nº 14) dentro de esta subsecuencia de MG de ID. SEC. nº 13. En caracteres subrayados y negrillos se muestran la secuencia de un cebador directo de MG (U-MG 1320), la secuencia de una sonda para MG (SF-MG 258c) y la secuencia diana de un cebador inverso de MG (L-MG 1578) dentro de la anterior subsecuencia de MG de ID. SEC. nº 13 (de 5' a 3', respectivamente).

Por lo tanto, la secuencia diana de MG seleccionada es:

Secuencia diana de MG (258 nt): posiciones 2 a 259 de la ID. SEC. nº 2

**ggatcattt ggattagtaa gaagccaaaa tgacaactta aatatttcaa gtgttacaaa
gaatgttngt gatgataatc tcaagtatct caatgctgtt gagaaatacc ttgatggta
gcaaaacttt gcaatcagaa ggtatgataa caacggtaga gctttatag atattaactt
agcaaaaatg gaaaaccct caacggtgca aaggggttta aatggcgagc ctatcttga
tccttttaa ggctttggt ID. SEC. nº 14**

Cebador directo de MG (U-MG 1320; 24 nt): posiciones 2 a 25 de la ID. SEC. nº 2

10 GGA TCA TTT GGA TTA GTA AGA AGC ID. SEC. nº 15

Sonda para MG (SF-MG 258c; 27 nt): posiciones 136 a 162 de la ID. SEC. nº 2

CAG AAG GTA TGA TAA CAA CGG TAG AGC ID. SEC. nº 16

brazos del beacon®: TGC GCA en 5'; TGC GCA en 3'

sonda en formato de beacon®:

15 TGC GCA CAG AAG GTA TGA TAA CAA CGG TAG AGC TGC GCA (ID. SEC. nº 17)

colorante/agente sofocador: Tamra en 5'; Dabcyl en 3'.

Cebador inverso de MG (L-MG 1578; 23 nt): complementario de las posiciones 237 a 259 de la ID. SEC. nº 2

ACC AAA GCC TTT AAA AGG ATC AA ID. SEC. nº 18

1.2.2. Diseño sobre el gen de la adhesina de MG, que tiene el número de acceso M31431 (ID. SEC. nº 3)

20 Los inventores han seleccionado otras cuatro dianas de MG. Estas otras cuatro dianas de MG están también situadas dentro del gen de la adhesina de MG, más particularmente dentro de la región 5' de este gen. Se definen con respecto a la secuencia del gen de la adhesina, que está disponible bajo el número de acceso M31431 (ID. SEC. nº 3, mostrada en la Figura 3).

Estas otras cuatro secuencias diana de MG están situadas dentro de las siguientes subsecuencias de MG:

- 25 – posiciones 1140-1290 de la ID. SEC. nº 3 (subsecuencia de ID. SEC. nº 19);
– posiciones 1060-1250 de la ID. SEC. nº 3 (subsecuencia de ID. SEC. nº 25);
– posiciones 1520-1710 de la ID. SEC. nº 3 (subsecuencia de ID. SEC. nº 31);
– posiciones 1500-1710 de la ID. SEC. nº 3 (subsecuencia de ID. SEC. nº 37).
– posiciones 1140-1290 de la ID. SEC. nº 3 (subsecuencia de ID. SEC. nº 19);

1140 a acaggtgtag gtggttattt tctctttaac caaaataagc aacgtagtag cgtgagcaac
 1201 ttgcttacc aaccaagca gttaagtgtt aaacaccaac aagcagttga tgaaacctta
 1261 accccttga cttgaacaa taacaacttc **ID. SEC. nº 19**

– posiciones 1060-1250 de la ID. SEC. nº 3 (subsecuencia de **ID. SEC. nº 25**):

1060 g tttgtatgca ccaaccaag
 1081 aaaagactgg ctaagaagtc ttgagccttt ctaaccgctg cacttacct tggggttata
 1141 acaggtgtag gtggttattt tctctttaac caaaataagc aacgtagtag cgtgagcaac
 1201 ttgcttacc aaccaagca gttaagtgtt aaacaccaac aagcagttga

ID. SEC. nº 25

5 – posiciones 1520-1710 de la ID. SEC. nº 3 (subsecuencia de **ID. SEC. nº 31**):

1520 c aacggtgcaa aggggtttaa atggcgagcc tatctttgat
 1561 ccttttaaag gctttggttt aactggtaat gccctactg attggaatga gatcaaaggt
 1621 aaagttccag tagaagtagt tcaatcccc cattccccca acctctattt tgtgttacta
 1681 gtgcctaagg tggcattaga gtatcacaac **ID. SEC. nº 31**

– posiciones 1500-1710 de la ID. SEC. nº 3 (subsecuencia de **ID. SEC. nº 37**):

1500 a gcaaaaatgg aaaaccctc aacggtgcaa aggggtttaa atggcgagcc tatctttgat
 1561 ccttttaaag gctttggttt aactggtaat gccctactg attggaatga gatcaaaggt
 1621 aaagttccag tagaagtagt tcaatcccc cattccccca acctctattt tgtgttacta
 1681 gtgcctaagg tggcattaga gtatcacaac **ID. SEC. nº 37**

10 **1.2.2.1. Pareja de cebadores (U-MG 1144/L-MG 1283), amplicón de 140 bp**

Secuencia diana de MG (140 bp): posiciones 1144 a 1283 de la ID. SEC. nº 3

1144 ggtgtag gtggttattt tctctttaac caaaataagc aacgtagtag cgtgagcaac
 1201 ttgcttacc aaccaagca gttaagtgtt aaacaccaac aagcagttga tgaaacctta
 1261 acccttga cttgaacaa taa **ID. SEC. nº 20**

En caracteres negrilla y subrayados, se muestran (de 5' a 3') las secuencias del cebador directo de MG (U-MG1144), de la diana de la sonda para MG (MGBR 140c), y de la diana para el cebador inverso de MG (L-MG1283).

15 Cebador directo de MG (U-MG 1144; 21 nt): posiciones 1144 a 1164 de la ID. SEC. nº 3

GGT GTA GGT GGT TAT TTT CTC **ID. SEC. nº 21**

Sonda para MG (MGBR 140c Tamra/DabcyI; 25 nt): posiciones 1208 a 1232 de la ID. SEC. nº 3

ACC AAC CCA AGC AGT TAA GTG TTA A **ID. SEC. nº 22**

brazos del beacon[®]: **CGCGTT** en 5'; **A ACG CG** en 3'

20 sonda en formato de beacon[®]:

CGCGTT AC CAA CCC AAG CAG TTA AGT GTT AA **A ACG CG** (**ID. SEC. nº 23**)

colorante/agente sofocador: Tamra en 5'; DabcyI en 3'.

Cebador inverso de MG (L-MG 1283; 22 nt): complementario de las posiciones 1262 a 1283 de la ID. SEC. nº 3

TTA TTG TTT CAA GTC CAA GGG G **ID. SEC. nº 24**

1.2.2.2. Pareja de cebadores (U-MG 1087/L-MG 1249), amplicón de 186 bp

Secuencia diana de MG (186 bp): posiciones 1064 a 1249 de la ID. SEC. nº 3

1064 gt atgca ccaaccaaag
 1081 aaaagactgg ctaagaagtc ttgagccttt ctaaccgctg cacttacct tggggttata
 1141 acaggtgtag gtggttattt tctctttaac caaataaagc aacgtagtag cgtgagcaac
 1201 tttgcttacc aaccaagca gttaagtgtt aaacaccaac aagcagttg

ID. SEC. nº 26

- 5 En caracteres negrillos y subrayados, se muestran (de 5' a 3') las secuencias del cebador directo de MG (U-MG1087), de la diana de la sonda para MG (MGBR 186j Tamra/DabcyI), y de la diana para el cebador inverso de MG (L-MG1249).

Cebador directo de MG (U-MG 1087; 24 nt): posiciones 1064 a 1087 de la ID. SEC. nº 3

GTATGCACCAACCAAAGAAAAGAC ID. SEC. nº 27

- 10 Sonda para MG (MGBR 186j Tamra/DabcyI; 28 nt): posiciones 1142 a 1168 de la ID. SEC. nº 3

CAG GTG TAG GTG GTT ATT TTC TCT TTA ID. SEC. nº 28

brazos del beacon®: CGC GTT en 5'; AAC GCG en 3'

sonda en formato de beacon®:

CGC GTT CAG GTG TAG GTG GTT ATT TTC TCT TTA AAC GCG (ID. SEC. nº 29)

- 15 colorante/agente sofocador: Tamra en 5'; DabcyI en 3'.

Cebador inverso de MG (L-MG 1249; 24 nt): complementario de las posiciones 1226 a 1249 de la ID. SEC. nº 3

CAA CTG CTT GTT GGT GTT TAA CAC ID. SEC. nº 30

1.2.2.3. Pareja de cebadores (U-MG 1527/L-MG 1704), amplicón de 177 bp

Secuencia diana de MG (178 bp): posiciones 1527 a 1704 de la ID. SEC. nº 3

1527 gcaa aggggtttaa atggcgagcc tatctttgat
 1561 ccttttaaag gctttggttt aactggtaat gccctactg attggaatga gatcaaaggt
 1621 aaagttccag tagaagtagt tcaatccccc cattccccc acctctattt tgtgttacta
 20 1681 gtgcctaagg tggcattaga gtat ID. SEC. nº 32

- En caracteres negrillos y subrayados, se muestran (de 5' a 3') las secuencias del cebador directo de MG (U-MG1527), de la diana de la sonda para MG (MGBR 178q Tamra/DabcyI), y de la diana para el cebador inverso de MG (L-MG1704).

Cebador directo de MG (U-MG 1527; 24 nt): posiciones 1527 a 1550 de la ID. SEC. nº 3

- 25 GCA AAG GGG TTT AAA TGG CGA GCC ID. SEC. nº 33

Sonda para MG (MGBR 178q Tamra/DabcyI; 26 nt): posiciones 1607 a 1630 de la ID. SEC. nº 3

ATG AGA TCA AAG GTA AAG TTC CAG TA ID. SEC. nº 34

brazos del beacon®: AGC GTC en 5'; GAC GCT en 3'

sonda en formato de beacon®:

- 30 AGC GTC ATG AGA TCA AAG GTA AAG TTC CAG TA GAC GCT (ID. SEC. nº 35)

colorante/agente sofocador: Tamra en 5'; DabcyI en 3'.

Cebador inverso de MG (L-MG 1704; 24 nt): complementario de las posiciones 1681 a 1704 de la ID. SEC. nº 3

ATA CTC CAA TAC CAC CTT AGG CAC

ID. SEC. nº 36

1.2.2.4. Pareja de cebadores (U-MG 1501/L-MG 1704), amplicón de 203 bp

Secuencia diana de MG (203 bp): posiciones 1501 a 1704 de la ID. SEC. nº 3

1501 gcaaaaatgg aaaaccctc aacggtgcaa aggggtttaa atggcgagcc tatctttgat
 1561 ccttttaaag gctttggtt aactgtaat gccctactg attggaatga gatcaaaggt
 1621 aaagttccag tagaagtagt tcaatcccc cattccccca acctctattt tgtgttacta
 1681 gtgcctaagg tggcattaga gtat ID. SEC. nº 38

- 5 En caracteres negrilla y subrayados, se muestran (de 5' a 3') las secuencias del cebador directo de MG (U-MG 1501), de la diana de la sonda para MG (MGBR 178q Tamra/DabcyI), y de la diana para el cebador inverso de MG (L-MG 1704).

Cebador directo de MG (U-MG 1501; 25 nt): posiciones 1501 a 1525 de la ID. SEC. nº 3

GCA AAA ATG GAA AAC CCC TCA ACG G

ID. SEC. nº 39

- 10 Sonda para MG (MGBR 204u Tamra/DabcyI; 27 nt): posiciones 1600 a 1626 de la ID. SEC. nº 3

GAT TGG AAT GAG ATC AAA GGT AAA GTT

ID. SEC. nº 40

brazos del beacon®: CGC CCT en 5'; AGG GCG en 3'

sonda en formato de beacon®:

CGC CCT GAT TGG AAT GAG ATC AAA GGT AAA GTT AGG GCG (ID. SEC. nº 41)

- 15 colorante/agente sofocador: Tamra en 5'; DabcyI en 3'.

Cebador inverso de MG (L-MG 1704; 24 nt): complementario de las posiciones 1681 a 1704 de la ID. SEC. nº 3

ATA CTC CAA TAC CAC CTT AGG CAC

ID. SEC. nº 36

1.3. Selección de cebadores y sonda para *Neisseria gonorrhoeae* (NG)

- 20 Es difícil llevar a cabo la selección de una diana nucleotídica apropiada para NG. El genoma de NG es realmente muy homólogo al de *N. meningitidis* (aproximadamente en un 98%) y es homólogo al genoma de especies comensales tales como *N. cinerea*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. mucosa*.

Nosotros seleccionamos el gen *pilE* para detectar NG. El gen *pilE* codifica pili de tipo IV. Está presente en toda NG patógena y está ausente en las NG no patógenas (cepas de NG a menudo sueltan este gen cuando se desarrollan *in vitro*).

- 25 El gen *pilE* está presente en un número de copias variable y está a menudo sometido a variaciones nucleotídicas. El gen *pilE* también está presente en *N. lactamica* y *N. cinerea* y puede también estar presente en algunos otros géneros bacterianos, tales como *Pseudomonas*, *Bacteroides* y *Bacillus*.

Se ha seleccionado una pareja de cebadores (U-*pilE* 159/L-*pilE* 406). El amplicón obtenido es de 252 bp. Se ha seleccionado una sonda fluorescente (ATTO 647N/DabcyI) para hibridar con el amplicón.

- 30 La secuencia del gen *pilE*, que es accesible bajo el número de acceso AF042097, se muestra en la Figura 4 adjunta (ID. SEC. nº 4).

Subsecuencia de NG seleccionada dentro de *pilE* de ID. SEC. nº 4 (posiciones 101-380)

101 gtcaaaaatc agccgtcacc
 121 gagtattacc tgaatcacgg caaatggccg gaaaacaaca cttctgccgg cgtggcatcc
 181 tccccaccg acatcaaagg caaatatggt aaagaggttg aagttaaaaa cggcgctggt
 241 accgccacaa tggcctcaag caacgtaaac aatgaaatca aaggcaaaaa actctccctg
 301 tgggccaggc gtgaaaacgg ttcggtaaaa tggttctgcg gacagccggt tacgcgcacc
 361 gacgacgaca ccggtgcccga ID. SEC. nº 42

En caracteres subrayados se muestran (de 5' a 3') las secuencias del cebador directo de NG (U-pilE 159), de la diana de la sonda para NG (pilEc), y de la diana del cebador inverso de NG (L-pilE 406).

Secuencia diana de NG (252 nt): posiciones 114 a 365 de la ID. SEC. nº 4

cgtcacc

gagtattacc tgaatcacgg caaatggccg gaaaacaaca cttctgccgg cgtggcatcc
 tccccaccg acatcaaagg caaatatggt aaagaggttg aagttaaaaa cggcgtcgtt
 accgccaaa tggcctcaag caacgtaaac aatgaaatca aaggcaaaaa actctccctg
tgggccaggc gtgaaaacgg ttcggtaaaa tggttctgcg gacagccggt tacgcgcacc
gacga ID. SEC. nº 43

5 Cebador directo de NG (U-pilE 159; 19 nt): posiciones 114 a 132 de la ID. SEC. nº 4

CGT CAC CGA GTA TTA CCT G ID. SEC. nº 44

Sonda para NG (pilEc; 22 nt): complementario de las posiciones 285 a 306 de la ID. SEC. nº 4

GGC CCA CAG GGA GAG TTT TTT G ID. SEC. nº 45

brazos del beacon®: ACT GCG en 5'; CGC AGT en 3'

10 sonda en formato de beacon®:

ACT GCG GGC CCA CAG GGA GAG TTT TTT G CGC AGT (ID. SEC. nº 46)

colorante/agente sofocador: Atto 647 N en 5'; DabcyI en 3'.

Cebador inverso de NG (L-pilE 406; 17 nt): complementario de las posiciones 349 a 365 de la ID. SEC. nº 4

TCG TCG GTG CGC GTA AC ID. SEC. nº 47

15 **1.4. Testigo interno (IC)**

El testigo interno (IC) consiste en una secuencia aleatoria de cadena sencilla.

El IC comprende una secuencia que no está relacionada con CT, MG ni NG y que preferiblemente tampoco está relacionada con ácidos nucleicos humanos. El IC comprende además una secuencia situada en 5' de esta secuencia no relacionada y una secuencia situada en 3' de esta secuencia no relacionada, en que una de dichas secuencias situadas en 5' y 3' tiene la secuencia de un cebador de una pareja de cebadores, y la otra de dichas secuencias situadas en 5' y 3' es la secuencia complementaria del otro cebador de la misma pareja de cebadores, de modo que dicha pareja de cebadores se puede hibridar con dicho IC en dichas posiciones y siguiendo una orientación tal que esta pareja de cebadores puede actuar como una pareja de cebadores directo e inverso de multiplicación sobre dicho IC. Por ejemplo, dicha secuencia situada en 5' es idéntica al cebador directo de una pareja de cebadores, y dicha secuencia situada en 3' es complementaria del cebador inverso de dicha pareja de cebadores.

Esta pareja de cebadores puede ser una pareja de cebadores que se utilice para la detección de CT, MG o NG, o puede ser una pareja de cebadores diferente, que ha de ser luego añadida específicamente a la mezcla de PCR cuando se implemente una PCR múltiple.

30 En el presente ejemplo, el IC es de 92 bases y comprende secuencias situadas en 5' y 3' que se hibridan con una pareja de cebadores (pareja de cebadores IS 368 e IS 569) que es diferente de las parejas de cebadores de CT, MG y NG.

Secuencia del Testigo Interno (92 nt)

ATTGGATCCCAGCACGCTAATTACCCAGTATCAGATGACGTGGCAGCCATGAGAGTGGACAGTCGTCCTTCAA
GGAGCACATCAGCGGATC

35 ID. SEC. nº 48

En caracteres subrayados se muestran (de 5' a 3') las secuencias del cebador directo de IC (IS 368), de la diana de la sonda para IC, y de la diana del cebador inverso (IS 569).

Cebador directo de IC (IS 368; 17 nt)

CAGCACGCTAATTACCC ID. SEC. nº 49

Sonda para IC (SIMB ATTO 590; 23 nt)

CCC ACT CTC ATG GCT GCC ACG TC

ID. SEC. nº 50

brazos del beacon®: CAGGCG en 5'; CGCCTG en 3'

sonda en formato de beacon®:

5 CAGGCG CCC ACT CTC ATG GCT GCC ACG TC CGCCTG (**ID. SEC. nº 51**)

colorante/agente sofocador: ATTO 590 en 5'; Dabcyl en 3'.

Cebador inverso de IC (IS 569; 17 nt)

GCTGATGTGCTCCTTGA

ID. SEC. nº 52

1.5. rRNA 16S

10 También se multiplica un fragmento del rRNA 16S que está presente en todos los microorganismos. Se han utilizado los siguientes cebadores de rRNA 16S:

S1-F: AGT TTG ATC ATG GCT CAG

ID. SEC. nº 53

S1-R: GTA TTA CCG CGG CTG CT

ID. SEC. nº 54

1.6. Secuencias e ID. SEC. nº

15 Tabla 1: Secuencias ID. SEC. nº

ID. SEC. nº		
Secuencias de referencia de CT, MG y NG		
1	Plásmido pCHL1 de CT	Número de acceso J03321
2	Región 5' del gen de la adhesina de MG	Número de acceso X91074
3	Gen de la adhesina de MG	Número de acceso M31431
4	Gen <i>piE</i> de NG	Número de acceso AF042097
Sistemas de multiplicación de CT en tiempo real del invento (sistemas nº 1 y nº 2 de CT)		
5	Subsecuencia de CT seleccionada	5571-5760 de la ID. SEC. nº 1
6	Diana de CT (175 nt)	5580-5754 de la ID. SEC. nº 1
7	Cebador directo U-PC 5580 de CT	5580-5599 de la ID. SEC. nº 1
8	Sonda SCT 175b para CT	5613-5638 de la ID. SEC. nº 1
9	Sonda SCT 175b para CT en formato de baliza	
12	Cebador inverso L-PC 5754 de CT	5733-5754 de la ID. SEC. nº 1
5	Subsecuencia de CT seleccionada	5571-5760 de la ID. SEC. nº 1
6	Diana de CT (175 nt)	5580-5754 de la ID. SEC. nº 1
7	Cebador directo U-PC 5580 de CT	5580-5599 de la ID. SEC. nº 1
10	Sonda SCT 175c para CT	5635-5661 de la ID. SEC. nº 1
11	Sonda SCT 175c para CT en formato de baliza	
12	Cebador inverso L-PC 5754 de CT	5733-5754 de la ID. SEC. nº 1

Sistemas de multiplicación de MG en tiempo real del invento (sistemas nº 1, nº 2, nº 3, nº 4 y nº 5 de MG)		
13	Subsecuencia de MG seleccionada	1-270 de la ID. SEC. nº 2
14	Diana de MG (258 nt)	2-259 de la ID. SEC. nº 2
<u>15</u>	Cebador directo U-MG 1320 de MG	2-25 de la ID. SEC. nº 2
16	Sonda SF-MG 258c para MG	136-162 de la ID. SEC. nº 2
17	Sonda SF-MG 258c para MG en formato de baliza	
<u>18</u>	Cebador inverso L-MG 1578 de MG	237-259 de la ID. SEC. nº 2
19	Subsecuencia de MG seleccionada	1140-1290 de la ID. SEC. nº 3
20	Diana de MG (140 nt)	1144-1283 de la ID. SEC. nº 3
<u>21</u>	Cebador directo U-MG 1144 de MG	1144-1164 de la ID. SEC. nº 3
22	Sonda MGBR 140c para MG	1208-1232 de la ID. SEC. nº 3
23	Sonda MGBR 140c para MG en formato de baliza	
<u>24</u>	Cebador inverso L-MG 1283 de MG	1262-1283 de la ID. SEC. nº 3
25	Subsecuencia de MG seleccionada	1060-1250 de la ID. SEC. nº 3
26	Diana de MG (186 nt)	1064-1249 de la ID. SEC. nº 3
<u>27</u>	Cebador directo U-MG 1087 de MG	1064-1087 de la ID. SEC. nº 3
28	Sonda MGBR 186j para MG	1142-1168 de la ID. SEC. nº 3
29	Sonda MGBR 186j para MG en formato de baliza	
<u>30</u>	Cebador inverso L-MG 1249 de MG	1226-1249 de la ID. SEC. nº 3
31	Subsecuencia de MG seleccionada	1520-1710 de la ID. SEC. nº 3
32	Diana de MG (178nt)	1527-1704 de la ID. SEC. nº 3
<u>33</u>	Cebador directo U-MG 1527 de MG	1527-1550 de la ID. SEC. nº 3
34	Sonda MGBR 178q para MG	1607-1630 de la ID. SEC. nº 3
35	Sonda MGBR 178q para MG en formato de baliza	
<u>36</u>	Cebador inverso L-MG 1704 de MG	1681-1704 de la ID. SEC. nº 3
37	Subsecuencia de MG seleccionada	1500-1710 de la ID. SEC. nº 3
38	Diana de MG (204 nt)	1501-1704 de la ID. SEC. nº 3
<u>39</u>	Cebador directo U-MG 1501 de MG	1501-1525 de la ID. SEC. nº 3
40	Sonda MGBR 204u para MG	1600-1626 de la ID. SEC. nº 3
41	Sonda para MG en formato de baliza	
<u>36</u>	Cebador inverso L-MG 1704 de MG	1681-1704 de la ID. SEC. nº 3

Sistemas de multiplicación de NG en tiempo real del invento		
42	Subsecuencia de NG seleccionada	101-380 de la ID. SEC. nº 4
43	Diana de NG (252 nt)	114-365 de la ID. SEC. nº 4
<u>44</u>	Cebador directo U-pilE 159 de NG	114-132 de la ID. SEC. nº 4
45	Sonda pilEc para NG	285-306 de la ID. SEC. nº 4
46	Sonda para NG en formato de baliza	
<u>47</u>	Cebador inverso L-pilE 406 de NG	349-365 de la ID. SEC. nº 4
Testigo Interno (IC)		
48	Secuencia de IC (92 nt)	No relacionados con CT, MG ni NG
<u>49</u>	Cebador directo IS 368 de IC	
50	Sonda para IC	
51	Sonda para IC en formato de baliza	
<u>52</u>	Cebador inverso IS 569 de IC	
rRNA 16S		
<u>53</u>	Cebador directo S1-F de rRNA 16S	Fragmento de rRNA 16S
<u>54</u>	Cebador inverso S1-R de rRNA 16S	Fragmento de rRNA 16S
55	Cebador MgPa-1 de MG	
56	Cebador MgPa-3 de MG	
57	Sonda MgPa-2 para transferencia Southern de MG	

2. EJEMPLO 2: Especificidad y sensibilidad de sistemas de multiplicación de CT, MG y NG en tiempo real del invento

- especificidad en una PCR simple en tiempo real (sistema de multiplicación de CT o MG o NG en tiempo real sobre un conjunto de cepas bacterianas),
- 5 – sensibilidad de estos sistemas en una PCR múltiple en tiempo real (sistemas de CT+MG+NG+IC juntos en la misma mezcla, sobre una mezcla de DNAs de CT, MG y NG en una cantidad predeterminada).

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Descripción del método de extracción

- 10 Se lleva a cabo una lisis en presencia de detergentes y de glóbulos de Chelex™ X-100 (es decir, una resina que se une a iones divalentes y que es además un agente caotrópico).

Composición del tampón de lisis

8% de resina Chelex™ X-100 (Bio-Rad; referencia 142-1253), NP-40 (Sigma; referencia Igepal I-3021) al 0,5%, Tween 20 (VWR; referencia 28829296) al 0,5% en tampón de Tris 10 mM (Sigma; referencia T-6791), EDTA 1 mM (Sigma; referencia E-1644), pH de 8,3.

15 Método

- se recoge 1 ml de muestra (muestra de orina o de medio de transporte), se centrifuga durante 10 minutos a 8000 rpm y se desecha todo el sobrenadante;
- se añaden 400 µl de tampón de lisis al sedimento de centrifugación;

- se añaden 10 µl de testigo interno líquido;
- se remueve durante 30 segundos con formación de remolinos;
- incubación durante 10 minutos a 95 °C;
- centrifugación durante 5 minutos a 8000 rpm;

5 – PCR sobre 10 µl del sobrenadante.

El testigo interno (IC) se añade en la operación de extracción.

La disolución de IC es de $9,6 \cdot 10^4$ copias de IC por 10 µl, para obtener $2,4 \cdot 10^3$ copias por ensayo de PCR después de la extracción.

Se obtiene el testigo negativo recogiendo 400 µl de tampón de lisis a los que se añade el IC.

10 2.1.2. Condiciones de la PCR

* Reaccionantes:

Taq polimerasa Hot Start de Qiagen (5 U/µl; referencia 203205), que contiene el tampón de PCR

dNTP: Promega, referencia U151 (4X 25 mM)

MgCl₂: Sigma, referencia M-2670

15 PVP10: Sigma, referencia PVP-10

Glicerol: VWR, referencia 24388295

* Termociclador: iQ1 (Bio-Rad).

2.1.3. Multiplicación de un fragmento del gen que codifica rRNA 16S

20 Los productos multiplicados por los cebadores de rRNA 16S (S1-F y S1-R) son visualizados mediante una tinción Bet después de una migración electroforética en un gel de acrilamida al 7,5%.

2.1.4. PCR simple en tiempo real para *Chlamydia trachomatis*

* Composición de la mezcla:

25 En una mezcla 1X para PCR, se añaden: 0,2 µM de la sonda SCT 175b (ID. SEC. nº 9), 0,5 µM de cada uno de los cebadores de CT (U-PC 5580 - ID. SEC. nº 7, y L-PC 5754 - ID. SEC. nº 12), glicerol al 5%, PVP 10 al 0,3%, 2 U de Taq polimerasa, dNTP 1 mM y 6 mM final de MgCl₂.

Se añaden 10 µl de DNA a esta mezcla.

* Termociclación:

Primer ciclo: 15 segundos a 95 °C

Segundo ciclo: 30 segundos a 95 °C

30 Tercer ciclo: 45 segundos a 56 °C

Cuarto ciclo: 30 segundos a 72 °C

Se repite 50 veces del ciclo 2 al ciclo 4.

2.1.5. PCR simple en tiempo real para *Mycoplasma genitalium*

* Composición de la mezcla:

35 En una mezcla 1X para PCR, se añaden: 0,2 µM de la sonda para MG (SF-MG 258c - ID. SEC. nº 17), 0,5 µM de cada uno de los cebadores de MG (U-MG 1320 - ID. SEC. nº 15, y L-MG 1578 - ID. SEC. nº 18), glicerol al 5%, PVP 10 al 0,3%, 2 U de Taq polimerasa, dNTP 1 mM y 6 mM final de MgCl₂.

Se añaden 10 µl de DNA a esta mezcla.

* Termociclación:

Primer ciclo: 15 segundos a 95 °C

Segundo ciclo: 30 segundos a 95 °C

Tercer ciclo: 45 segundos a 57 °C

Cuarto ciclo: 30 segundos a 72 °C

5 Se repite 50 veces del ciclo 2 al ciclo 4.

2.1.6. PCR simple en tiempo real para *Neisseria gonorrhoeae*

* Composición de la mezcla:

10 En una mezcla 1X para PCR, se añaden: 0,2 µM de la sonda para NG (pilEc - ID. SEC. nº 46), 0,5 µM de cada uno de los cebadores de NG (U-pilE 159 - ID. SEC. nº 44, y L-pilE 406 - ID. SEC. nº 47), glicerol al 5%, PVP 10 al 0,3%, 2 U de Taq polimerasa, dNTP 1 mM y 4 mM final de MgCl₂.

Se añaden 10 µl de DNA a esta mezcla.

* Termociclación:

Primer ciclo: 15 segundos a 95 °C

Segundo ciclo: 30 segundos a 95 °C

15 Tercer ciclo: 45 segundos a 57 °C

Cuarto ciclo: 30 segundos a 72 °C

Se repite 50 veces del ciclo 2 al ciclo 4.

2.1.7. PCR múltiple en tiempo real

* Composición de la mezcla:

20 En una mezcla 1X para PCR, se añaden los cebadores siguientes:

cebador directo U-PC 5580 de CT (ID. SEC. nº 7) en una concentración 0,125 µM,

cebador inverso L-PC 5754 de CT (ID. SEC. nº 12) en una concentración 0,5 µM,

cebador directo U-MG 1320 de MG (ID. SEC. nº 15) en una concentración 0,025 µM,

cebador inverso L-MG 1578 de MG (ID. SEC. nº 18) en una concentración 1,25 µM,

25 cebador directo U-pilE 159 de NG (ID. SEC. nº 44) en una concentración 0,85 µM,

cebador inverso L-pilE 406 de NG (ID. SEC. nº 47) en una concentración 0,25 µM,

cebador directo IS 368 de IC (ID. SEC. nº 49) en una concentración 0,5 µM, y

cebador inverso IS 569 de IC (ID. SEC. nº 52) en una concentración 0,5 µM.

Las sondas se usan en las concentraciones siguientes:

30 sonda SCT 175b para CT (ID. SEC. nº 9) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo FAM),

sonda SF-MG 258c para MG (ID. SEC. nº 17) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo TAMRA),

sonda pilEc para NG (ID. SEC. nº 46) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo ATTO 647N), y

sonda SIMB para IC (ID. SEC. nº 51) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo ATTO-590).

Se añaden además los reaccionantes siguientes:

35 glicerol al 5%, PVP 10 al 0,3%, 2 U de Taq polimerasa, dNTP 1 mM, y 5 mM final de MgCl₂.

Se añaden 10 µl de DNA a esta mezcla.

* Termociclación:

Primer ciclo: 15 segundos a 95 °C

Segundo ciclo: 30 segundos a 95 °C

Tercer ciclo: 50 segundos a 58 °C

Cuarto ciclo: 30 segundos a 72 °C

5 Se repite 50 veces del ciclo 2 al ciclo 4.

* Material de partida:

DNA de CT: cepa 434 de *Chlamydia trachomatis* LGV II, asequible de ABi, lote 141-115, $1,63 \cdot 10^{10}$ cuerpos elementales/ml, 10 μ l en una concentración de 50 ng/ μ l.

ABi es Advanced Biotechnologies Inc., Rivers Park II, 9108 Guilford Road, Columbia, Maryland 21046-2701, EE.UU.

10 DNA de MG: cepa G-37 asequible de ATCC, número de depósito 33530 (cultivo fuente = ATCC 33530D), lote 2305272, concentración de 200 ng/ μ l.

ATCC es American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU.

15 DNA de NG: cepa 107031 del CNCM (Collection de l'Institut Pasteur, BP 52, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, Francia), cepa de referencia para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana con disco (el recuento se ha realizado en placas de Petri).

Cantidad de IC: 1000 copias por PCR.

2.2. Resultados

20 Los cebadores y sondas para CT y MG tienen una especificidad perfecta: no reaccionan cruzadamente con ningún ácido nucleico que no sea ácido nucleico de CT o MG (respectivamente); notablemente, no reaccionan cruzadamente con otros ácidos nucleicos bacterianos ni con ácidos nucleicos humanos.

Los cebadores y sondas para NG son específicos para NG salvo por que reaccionan cruzadamente con *N. meningitidis*.

2.2.1. Ensayo de especificidad para el sistema de CT en una PCR simple en tiempo real

El amplicón es de 175 bp.

25 Los cebadores y sondas para CT del invento detectan todos los serotipos de CT. Notablemente, detectan los siguientes serotipos: A, B, Ba, C, D, E, F, H, I, J, K, L1, L2a y L3.

30 Los cebadores y sondas para CT del invento han sido también ensayados sobre 24 cepas bacterianas diferentes que se pueden encontrar en la esfera urogenital y se ha mostrado que no presentan reactividad cruzada. Para estas otras 24 cepas, la presencia de DNA fue confirmada por una PCR de punto final utilizando los cebadores de rRNA 16S (cebadores S1R y S1F), seguida de depósito sobre gel. Los resultados de especificidad se muestran más adelante en la Tabla 2 (columna "CT simple").

2.2.2. Ensayo de especificidad para el sistema de MG en una PCR simple en tiempo real

El amplicón es de 258 bp.

35 Los cebadores y sondas para MG del invento detectan las nueve cepas de MG que han sido examinadas (cepas G-37, 2282, 2288, 2300, 2321, 2341, M30, UTMB1 y TW-10-51).

Los cebadores y sondas para MG del invento no reaccionaron cruzadamente con ninguno de los 29 DNAs bacterianos examinados que no eran de MG.

Los resultados se presentan en la Tabla 2 siguiente, columna "MG simple".

Tabla 2: especificidad de los sistemas de CT y MG

Cepa	CT simple	MG simple	rRNA 16S
DNA humano	negativo	negativo	//
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo A, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo B, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo Ba, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo C, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo D, cepa UW-3/Cx, ATCC VR 885	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo F, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo H, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo I, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo J, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo K, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo L1, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo L2a, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo L3, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	NE	positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	negativo	negativo	positivo
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecium</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	negativo	negativo	positivo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Bacillus subtilis</i> , cepa clínica	negativo	NE	positivo
<i>Gardnerella vaginalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , 5 cepas clínicas	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria cinerea</i> DSMZ 4630	NE	negativo	positivo
<i>Neisseria lactamica</i> DSMZ 4691	NE	negativo	positivo
<i>Neisseria sicca</i> , cepa clínica	NE	negativo	positivo
<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa clínica	NE	negativo	positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus simulans</i> , cepa del Institut Pasteur	NE	negativo	positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	negativo	negativo	positivo

Cepa	CT simple	MG simple	rRNA 16S
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , CIP 104298	negativo	NE	positivo
<i>Streptococcus agalactiae</i> , ATCC 12403	negativo	negativo	positivo
<i>Streptococcus bovis</i> CIP 105065	negativo	negativo	positivo
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ATCC 49139	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 49139	negativo	negativo	positivo
<i>Candida albicans</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria mucosa</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Rhodococcus equi</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Moraxella catarrhalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa G-37, ATCC 33530	negativo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2282, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	NE	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2288, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	NE	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2300, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	NE	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2321, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	NE	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2341, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	NE	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa M30, cepa clínica, CHU Bordeaux	NE	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa UTMB1, cepa clínica, CHU Bordeaux	NE	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa TW-10-51, cepa clínica, CHU Bordeaux	NE	positivo	positivo
<i>Mycoplasma orale</i> ATCC 23714	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma fermentans</i> , cepa PG18, cepa clínica, CHU Bordeaux	NE	negativo	positivo
<i>Mycoplasma penetrans</i> , cepa GTU64, cepa clínica, CHU Bordeaux	NE	negativo	positivo
NE: No examinado CHU Bordeaux = Hospital de Burdeos, Francia			

2.2.3. Ensayo de especificidad para el sistema de NG en una PCR simple en tiempo real

El amplicón es de 252 bp.

Los cebadores y sondas para NG del invento han sido ensayados en una PCR en tiempo real sobre 55 cepas de NG diferentes. Todos los resultados fueron positivos.

- 5 Los cebadores y sondas para NG del invento han sido también ensayados sobre diversas especies de *Neisseria* distintas de NG. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3. No se obtuvo multiplicación con las especies siguientes: *N. sicca* (3 cepas), *N. polysaccharia* (1 cepa), *N. subflava* (4 cepas), *N. mucosa* (3 cepas), *N. cinerea*

(1 cepa) y *N. lactamica* (2 cepas).

Entre las 16 cepas de *N. meningitidis* que han sido examinadas, 10 dieron una respuesta positiva (reacción cruzada con NM).

Tabla 3: especificidad del sistema de NG en una PCR simple con diferentes especies de *Neisseria*

Cepa	NG simple	rRNA 16S
DNA humano	negativo	positivo
<i>N. cinerea</i> (1850) DSMZ 4630	negativo	positivo
<i>N. lactamica</i> (1851) DSMZ 4691	negativo	positivo
<i>N. lactamica</i> (1874)	negativo	positivo
<i>N. meningitidis</i>, 10 cepas clínicas	positivo	positivo
<i>N. meningitidis</i> , 6 cepas clínicas	negativo	positivo
<i>N. mucosa</i> (1853, 1870, 1871)	negativo	positivo
<i>N. polysaccharia</i> (1852) CIP 100113T	negativo	positivo
<i>N. sicca</i> (1854, 1872, 1873)	negativo	positivo
<i>N. subflava</i> (1855, 1876, 1877)	negativo	positivo
<i>N. subflava</i> (1875) CIP 73.13	negativo	positivo
<i>N. gonorrhoeae</i>, 55 cepas clínicas	positivo	positivo

- 5 La especificidad de los cebadores de NG del invento ha sido examinada en una PCR de punto final, seguida de depósito sobre gel, con 13 cepas bacterianas que no pertenecen al género *Neisseria*. No se ha detectado multiplicación alguna. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4: especificidad relativa a cepas no pertenecientes al género *Neisseria*

Cepa	PCR de punto final para NG	rRNA 16S
DNA humano	negativo	//
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	negativo	positivo
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	negativo	positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> , cepa clínica	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecium</i> , cepa clínica	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecalis</i> , cepa clínica	negativo	positivo
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	negativo	positivo
<i>Bacillus subtilis</i> , cepa clínica	negativo	positivo
<i>Gardnerella vaginalis</i> , cepa clínica	negativo	positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	negativo	positivo
<i>Streptococcus agalactiae</i> , ATCC 12403	negativo	positivo
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ATCC 49139	negativo	positivo

Cepa	PCR de punto final para NG	rRNA 16S
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 49139	negativo	positivo
<i>Moraxella catarrhalis</i> , cepa clínica	negativo	positivo

2.2.4. Resultados en PCR múltiple

Sensibilidad de la PCR

Los cebadores y sondas para CT, MG, NG e IC del invento han sido ensayados en modo múltiple sobre una mezcla de DNAs de CT, MG y NG en una cantidad predeterminada (el experimento se realizó por duplicado).

5 Los resultados son los siguientes:

Tabla 5: Sonda para CT (FAM)

Número de copias	Mezcla cuádruple	
	Ct	RFU
1000	31,75 +/- 0,10	400
100	35,20 +/- 0,63	300
10	41,30 +/- 2,62	100
1	ND	
ND: no detectado → la sensibilidad es de 10 copias por PCR		

Tabla 6: Sonda para MG (TAMRA)

Número de copias	Mezcla cuádruple	
	Ct	RFU
1000	36,93 +/- 2,07	140
100	40,63 +/- 0,85	100
10	ND	
1	ND	
ND: no detectado → la sensibilidad es de 100 copias por PCR		

Tabla 7: Sonda para NG (ATTO 647N)

Número de copias	Mezcla cuádruple	
	Ct	RFU
1000	27,30 +/- 0,28	350
100	31,33 +/- 0,43	325
10	34,4 +/- 0,37	250
1	37,95 +/- 0,51	200
→ la sensibilidad es de 1 copia por PCR		

Tabla 8: Sonda para IC (ATTO-590)

Número de copias	Mezcla cuádruple	
	Ct	RFU
1000	34,35 +/- 0,24	225
100	34,15 +/- 0,37	
10	34,53 +/- 0,17	
1	34,65 +/- 0,40	
→ no hay variación de Ct para el IC sea cual sea la cantidad de DNA que se use.		

3. EJEMPLO 3: Especificidad y sensibilidad de los sistemas de multiplicación de CT, MG y NG en tiempo real del invento

- 5
- Especificidad en una PCR múltiple en tiempo real (sistemas de multiplicación de CT+MG+NG+IC en tiempo real del invento, conjuntamente en modo múltiple en la misma mezcla, ensayada sobre un conjunto de cepas bacterianas);
 - Sensibilidad en una PCR múltiple en tiempo real (sistemas de CT+MG+NG+IC conjuntamente en modo múltiple en la misma mezcla, ensayados sobre una mezcla de DNAs de CT, MG y NG en una cantidad predeterminada).

3.1. Material y métodos

10 PCR múltiple en tiempo real

* Composición de la primera mezcla

En una mezcla 1X para PCR, se añaden los cebadores siguientes:

- 15
- cebador directo U-PC 5580 de CT (ID. SEC. nº 7) en una concentración 0,125 µM,
 - cebador inverso L-PC 5754 de CT (ID. SEC. nº 12) en una concentración 0,5 µM,
 - cebador directo U-MG 1144 de MG (ID. SEC. nº 21) en una concentración 0,5 µM,
 - cebador inverso L-MG 1283 de MG (ID. SEC. nº 14) en una concentración 0,5 µM,
 - cebador directo U-pilE 159 de NG (ID. SEC. nº 44) en una concentración 0,85 µM,
 - cebador inverso L-pilE 406 de NG (ID. SEC. nº 47) en una concentración 0,25 µM,
 - cebador directo IS 368 de IC (ID. SEC. nº 49) en una concentración 0,5 µM, y
 - 20 cebador inverso IS 569 de IC (ID. SEC. nº 52) en una concentración 0,5 µM.

Las sondas se usan en las concentraciones siguientes:

- 25
- sonda SCT 175b para CT (ID. SEC. nº 9) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo FAM),
 - sonda MGBR 140c para MG (ID. SEC. nº 23) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo TAMRA),
 - sonda pilEc para NG (ID. SEC. nº 46) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo ATTO 647N), y
 - sonda SIMB para IC (ID. SEC. nº 51) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo ATTO-590).

* Composición de la segunda mezcla

En una mezcla 1X para PCR, se añaden los cebadores siguientes:

- 30
- cebador directo U-PC 5580 de CT (ID. SEC. nº 7) en una concentración 0,125 µM,
 - cebador inverso L-PC 5754 de CT (ID. SEC. nº 12) en una concentración 0,5 µM,
 - cebador directo U-MG 1087 de MG (ID. SEC. nº 27) en una concentración 0,5 µM,

cebador inverso L-MG 1249 de MG (ID. SEC. nº 30) en una concentración 0,5 µM,
 cebador directo U-pilE 159 de NG (ID. SEC. nº 44) en una concentración 0,85 µM,
 cebador inverso L-pilE 406 de NG (ID. SEC. nº 47) en una concentración 0,25 µM,
 cebador directo IS 368 de IC (ID. SEC. nº 49) en una concentración 0,5 µM, y
 5 cebador inverso IS 569 de IC (ID. SEC. nº 52) en una concentración 0,5 µM.

Las sondas se usan en las concentraciones siguientes:

sonda SCT 175b para CT (ID. SEC. nº 9) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo FAM),
 sonda MGBR 186j para MG (ID. SEC. nº 29) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo TAMRA),
 sonda pilEc para NG (ID. SEC. nº 46) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo ATTO 647N), y
 10 sonda SIMB para IC (ID. SEC. nº 51) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo ATTO-590).

* Composición de la tercera mezcla

En una mezcla 1X para PCR, se añaden los cebadores siguientes:

cebador directo U-PC 5580 de CT (ID. SEC. nº 7) en una concentración 0,125 µM,
 cebador inverso L-PC 5754 de CT (ID. SEC. nº 12) en una concentración 0,5 µM,
 15 cebador directo U-MG 1527 de MG (ID. SEC. nº 33) en una concentración 0,5 µM,
 cebador inverso L-MG 1704 de MG (ID. SEC. nº 36) en una concentración 0,5 µM,
 cebador directo U-pilE 159 de NG (ID. SEC. nº 44) en una concentración 0,85 µM,
 cebador inverso L-pilE 406 de NG (ID. SEC. nº 47) en una concentración 0,25 µM,
 cebador directo IS 368 de IC (ID. SEC. nº 49) en una concentración 0,5 µM, y
 20 cebador inverso IS 569 de IC (ID. SEC. nº 52) en una concentración 0,5 µM.

Las sondas se usan en las concentraciones siguientes:

sonda SCT 175b para CT (ID. SEC. nº 9) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo FAM),
 sonda MGBR 178q para MG (ID. SEC. nº 35) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo TAMRA),
 sonda pilEc para NG (ID. SEC. nº 46) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo ATTO 647N), y
 25 sonda SIMB para IC (ID. SEC. nº 51) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo ATTO-590).

* Composición de la cuarta mezcla

En una mezcla 1X para PCR, se añaden los cebadores siguientes:

cebador directo U-PC 5580 de CT (ID. SEC. nº 7) en una concentración 0,125 µM,
 cebador inverso L-PC 5754 de CT (ID. SEC. nº 12) en una concentración 0,5 µM,
 30 cebador directo U-MG 1501 de MG (ID. SEC. nº 39) en una concentración 0,5 µM,
 cebador inverso L-MG 1704 de MG (ID. SEC. nº 36) en una concentración 0,5 µM,
 cebador directo U-pilE 159 de NG (ID. SEC. nº 44) en una concentración 0,85 µM,
 cebador inverso L-pilE 406 de NG (ID. SEC. nº 47) en una concentración 0,25 µM,
 cebador directo IS 368 de IC (ID. SEC. nº 49) en una concentración 0,5 µM, y
 35 cebador inverso IS 569 de IC (ID. SEC. nº 52) en una concentración 0,5 µM.

Las sondas se usan en las concentraciones siguientes:

sonda SCT 175b para CT (ID. SEC. nº 9) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo FAM),

sonda MGBR 204u para MG (ID. SEC. nº 41) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo TAMRA),
sonda pIlEc para NG (ID. SEC. nº 46) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo ATTO 647N), y
sonda SIMB para IC (ID. SEC. nº 51) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo ATTO-590).

Se añaden además los reaccionantes siguientes:

5 glicerol al 5%, PVP 10 al 0,3%, 2 U de Taq polimerasa, dNTP 1 mM, y 5 mM final de MgCl₂.

Se añaden 10 µl de DNA a esta mezcla.

* Termociclación:

Primer ciclo: 15 segundos a 95 °C

Segundo ciclo: 30 segundos a 95 °C

10 Tercer ciclo: 50 segundos a 58 °C

Cuarto ciclo: 30 segundos a 72 °C

Se repite 50 veces del ciclo 2 al ciclo 4.

PCR de rRNA 16S

Véase el capítulo 1.6.1.

15 **3.2. Resultados**

3.2.1 Ensayo de especificidad para los sistemas de MG en una PCR múltiple en tiempo real

Los cebadores y sondas para MG del invento detectan las nueve cepas de MG que han sido examinadas (cepas G-37, 2282, 2288, 2300, 2321, 2341, M30, UTMB1 y TW-10-51).

20 Los cebadores y sondas para MG del invento han sido también ensayados sobre 27 cepas bacterianas diferentes que se pueden encontrar en la esfera urogenital y se ha mostrado que no presentan reactividad cruzada. Para estas 27 cepas bacterianas diferentes, la presencia de DNA fue confirmada por una PCR de punto final utilizando los cebadores de rRNA 16S (cebadores S1R y S1F), seguida de depósito sobre gel.

Los resultados se presentan en las tablas posteriores.

Tabla 9. Especificidad del sistema de MG en una PCR múltiple en tiempo real

	Primera múltiple	Segunda múltiple	Tercera múltiple	Cuarta múltiple	rRNA 16S
Tamaño del amplicón	140 nt	186 nt	178 nt	204 nt	
Cepa					
DNA humano	negativo	negativo	negativo	negativo	//
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo D, cepa UW-3/Cx, ATCC VR 885	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo L1, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecium</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Bacillus subtilis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Gardnerella vaginalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , 1 cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , CIP 104298	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Streptococcus agalactiae</i> , ATCC 12403	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Streptococcus bovis</i> CIP 105065	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ATCC 49139	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 49139	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Candida albicans</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria mucosa</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Rhodococcus equi</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Moraxella catarrhalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa G-37, ATCC 33530	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2282, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2288, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2300, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2321, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2341, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa M30, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa UTMb1, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

	Primera múltiple	Segunda múltiple	Tercera múltiple	Cuarta múltiple	rRNA 16S
Tamaño del amplicón	140 nt	186 nt	178 nt	204 nt	
Cepa					
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa TW-10-51, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Mycoplasma orale</i> ATCC 23714	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma fermentans</i> , cepa PG18, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma penetrans</i> , cepa GTU64, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
NE: No examinado					
CHU Bordeaux = Hospital de Burdeos, Francia					

Tabla 10: Especificidad del sistema de CT en una PCR múltiple en tiempo real

Tamaño del amplicón	Primera múltiple	Segunda múltiple	Tercera múltiple	Cuarta múltiple	rRNA 16S
Cepa	175 nt	175 nt	175 nt	175 nt	
DNA humano	negativo	negativo	negativo	negativo	//
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo D, cepa UW-3/Cx, ATCC VR 885	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo L1, cepa clínica, CHU Bordeaux	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecium</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Bacillus subtilis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Gardnerella vaginalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , 1 cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , CIP 104298	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Streptococcus agalactiae</i> , ATCC 12403	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Streptococcus bovis</i> CIP 105065	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ATCC 49139	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 49139	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Candida albicans</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria mucosa</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Rhodococcus equi</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Moraxella catarrhalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa G-37, ATCC 33530	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2282, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2288, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2300, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2321, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2341, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa M30, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa UTMb1, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo

<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa TW-10-51, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma orale</i> ATCC 23714	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma fermentans</i> , cepa PG18, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma penetrans</i> , cepa GTU64, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
NE: No examinado						
CHU Bordeaux = Hospital de Burdeos, Francia						

Tabla 11: Especificidad del sistema de NG en una PCR múltiple en tiempo real

	Primera múltiple	Segunda múltiple	Tercera múltiple	Cuarta múltiple	rRNA 16S
Tamaño del amplicón	252 nt	252 nt	252 nt	252 nt	
Cepa					
DNA humano	negativo	negativo	negativo	negativo	//
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo D, cepa UW-3/Cx, ATCC VR 885	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotipo L1, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecium</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Enterococcus faecalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Bacillus subtilis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Gardnerella vaginalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , 1 cepa clínica	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , CIP 104298	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Streptococcus agalactiae</i> , ATCC 12403	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Streptococcus bovis</i> CIP 105065	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ATCC 49139	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 49139	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Candida albicans</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Neisseria mucosa</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Rhodococcus equi</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Moraxella catarrhalis</i> , cepa clínica	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa G-37, ATCC 33530	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2282, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2288, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2300, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2321, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa 2341, cepa clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa M30, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa UTM1, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo

<i>Mycoplasma genitalium</i> , cepa TW-10-51, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma orale</i> ATCC 23714	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma fermentans</i> , cepa PG18, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
<i>Mycoplasma penetrans</i> , cepa GTU64, cepa clínica, CHU Bordeaux	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
NE: No examinado						
CHU Bordeaux = Hospital de Burdeos, Francia						

3.2.2. Resultados en PCR de mezcla cuádruple: sensibilidad

Los cebadores y sondas para CT, MG, NG e IC del invento han sido ensayados en modo cuádruple sobre una mezcla de DNAs de CT, MG y NG en una cantidad predeterminada (el experimento se realizó por cuadruplicado). Se ensayan cuatro modos múltiples, conteniendo cada modo múltiple un modo simple de MG descrito en la parte superior.

5

Los resultados son los siguientes:

Tabla 12: Sonda para MG (TAMRA)

Número de copias	Primera mezcla cuádruple	Segunda mezcla cuádruple	Tercera mezcla cuádruple	Cuarta mezcla cuádruple
	Sonda MGBR 140c	Sonda MGBR 186j	Sonda MGBR 178q	Sonda MGBR 204u
	Ct	Ct	Ct	Ct
1000	33,48 +/- 2,03	34,58 +/- 0,75	37,68 +/- 1,11	37,78 +/- 0,64
100	39,75 +/- 2,92	40,05 +/- 2,01	42,23 +/- 3,81	44,20 +/- 2,39
10	41,73 +/- 0,46	ND	ND	ND
1	ND	ND	ND	ND

ND: no detectado

→ la sensibilidad es de 10 copias por PCR para la primera mezcla cuádruple (sonda MGBR 140c) y 100 copias por PCR para los demás modos múltiples.

Tabla 13: Sonda para CT (FAM)

Número de copias	Primera mezcla cuádruple	Segunda mezcla cuádruple	Tercera mezcla cuádruple	Cuarta mezcla cuádruple
	Sonda MGBR 140c	Sonda MGBR 186j	Sonda MGBR 178q	Sonda MGBR 204u
	Ct	Ct	Ct	Ct
1000	30,13 +/- 0,54	31,63 +/- 0,34	30,85 +/- 0,52	31,33 +/- 0,29
100	33,95 +/- 0,62	34,55 +/- 0,87	33,63 +/- 0,74	34,88 +/- 0,71
10	37,53 +/- 1,66	41,40 +/- 3,58	42,47 +/- 0,51	39,55 +/- 3,67
1	ND	ND	ND	ND

ND: no detectado

→ la sensibilidad es de 10 copias por PCR para todos los modos múltiples ensayados.

10

Tabla 14: Sonda para NG (ATTO 647N)

Número de copias	Primera mezcla cuádruple	Segunda mezcla cuádruple	Tercera mezcla cuádruple	Cuarta mezcla cuádruple
	Sonda MGBR 140c	Sonda MGBR 186j	Sonda MGBR 178q	Sonda MGBR 204u
	Ct	Ct	Ct	Ct
1000	26,80 +/- 0,33	27,13 +/- 0,40	27,20 +/- 0,29	27,28 +/- 0,22
100	29,85 +/- 0,10	30,15 +/- 0,75	30,20 +/- 0,64	30,35 +/- 0,61
10	32,63 +/- 1,64	33,20 +/- 0,43	32,58 +/- 0,22	34 +/- 0,29
1	36,33 +/- 0,61	36,15 +/- 0,13	36,33 +/- 1,34	36,53 +/- 0,39

ND: no detectado
→ la sensibilidad es de 1 copia por PCR para todos los modos múltiples ensayados.

Tabla 15: Sonda para IC (ATTO 590)

Número de copias	Primera mezcla cuádruple	Segunda mezcla cuádruple	Tercera mezcla cuádruple	Cuarta mezcla cuádruple
	Sonda MGBR 140c	Sonda MGBR 186j	Sonda MGBR 178q	Sonda MGBR 204u
	Ct	Ct	Ct	Ct
1000	34,38 +/- 0,17	35,03 +/- 0,30	35,25 +/- 0,64	34,80 +/- 0,22
100	34 +/- 0,18	34,90 +/- 0,41	34,75 +/- 0,13	34,63 +/- 0,15
10	34,08 +/- 0,31	34,38 +/- 0,28	34,33 +/- 0,22	34,80 +/- 0,20
1	34,55 +/- 0,13	34,88 +/- 0,26	34,65 +/- 0,31	35,40 +/- 0,28

→ no hay variación de Ct para el IC sea cual sea la cantidad de DNA que se use.

4. EJEMPLO 4: muestras recogidas de pacientes (ensayos con orina de primera micción)

- 5 Sistemas de multiplicación de CT+MG+NG+IC en tiempo real del invento, conjuntamente en modo múltiple en la misma mezcla, en comparación con el ensayo Amplicor para CT de Roche, el ensayo interno de MG por PCR y el ensayo de cultivo de NG.

4.1. Material y métodos

4.1.1. Muestras

- 10 Se recogen muestras de pacientes humanos (Hospital de Saint Louis, Francia). Las orinas de primera micción son guardadas a -20 °C hasta su uso.

Se examinan 19 muestras (1 a 19) en modo múltiple. En el mismo experimento se examinan un testigo negativo (muestra sin DNA), un testigo positivo de *C. trachomatis* (sólo DNA de *C. trachomatis*), un testigo positivo de *M. genitalium* (sólo DNA de *M. genitalium*) y un testigo positivo de *N. gonorrhoeae* (sólo DNA de *N. gonorrhoeae*).

4.1.2. Descripción del método de extracción

- 15 Véase el Ejemplo 2.

4.1.3. Métodos de detección de CT o MG o NG de la técnica previa

Detección de CT: ensayo COBAS Amplicor® para CT, asequible de Roche Diagnostics (kit Amplicor para multiplicación de CT/NG, referencia: ART: 07 59 41 4, y kit Cobas Amplicor para detección de CT, referencia: Art 07 5749 7).

Detección de MG: ensayo interno de MG por PCR: Se utilizó un conjunto de cebadores, MgPa-1 (5' - AGT TGA TGA

5 AAC CTT AAC CCC TTG G - 3'; ID. SEC. nº 55) y MgPa-3 (5' CCG TTG AGG GGT TTT CCA TTT TTG C - 3'; ID. SEC. nº 56), para multiplicar el fragmento de 281 pares de bases del gen principal de la adhesión (J. S. Jensen, S. A. Uldum, J. Søndergård-Andersen, J. Vuust y K. Lind, "Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples", J. Clin. Microbiol., 1991, 29: 46-50). La especificidad del fragmento multiplicado de 281 pares de bases fue verificada por hibridación con la sonda MgPa 2 de 25 monómeros (5' - GAC CAT CAA GGT ATT TCT CAA CAG C 3'; ID. SEC. nº 57), marcada con fluoresceína-11-dUTP mediante el uso del sistema de marcación 3'-terminal de oligonucleótidos y detección de ECL (Amersham International, Amersham, Reino Unido). Las muestras de las que se obtuvo el fragmento de DNA de 281 pares de bases, visible después de una hibridación por transferencia Southern con la sonda interna, fueron consideradas positivas (I. Casin, D. Vexiau-Robert, P. De La Salmoniere, A. Eche, B. Grandry y M. Janier, "High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in the lower genitourinary tract of women attending a sexually transmitted disease clinic in Paris, France", Sex. Transm. Dis., junio de 2002, 29: 353-359).

15 Detección de NG: ensayo estándar de cultivo de NG, como se describe en "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Information Supplement", enero de 2006, página 130, Tabla 2F, redactado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), normas M2-A9 y M7-A7 para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

4.1.4. PCR múltiple en tiempo real del invento

Véase el Ejemplo 2.

PCR múltiple en tiempo real

20 * Composición de la mezcla

En una mezcla 1X para PCR, se añaden los cebadores siguientes:

cebador directo U-PC 5580 de CT (ID. SEC. nº 6) en una concentración 0,125 µM,
 cebador inverso L-PC 5754 de CT (ID. SEC. nº 12) en una concentración 0,5 µM,
 cebador directo U-MG 1320 de MG (ID. SEC. nº 15) en una concentración 0,025 µM,
 25 cebador inverso L-MG 1578 de MG (ID. SEC. nº 18) en una concentración 1,25 µM,
 cebador directo U-pilE 159 de NG (ID. SEC. nº 44) en una concentración 0,85 µM,
 cebador inverso L-pilE 406 de NG (ID. SEC. nº 47) en una concentración 0,25 µM,
 cebador directo IS 368 de IC (ID. SEC. nº 49) en una concentración 0,5 µM, y
 cebador inverso IS 569 de IC (ID. SEC. nº 52) en una concentración 0,5 µM.

30 Las sondas se usan en las concentraciones siguientes:

sonda SCT 175b para CT (ID. SEC. nº 9) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo FAM),
 sonda SFMG 258c para MG (ID. SEC. nº 17) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo TAMRA),
 sonda pilEc para NG (ID. SEC. nº 46) en una concentración 0,2 µM (fluoróforo ATTO 647N), y
 sonda SIMB para IC (ID. SEC. nº 51) en una concentración 0,15 µM (fluoróforo ATTO-590).

35 Se añaden además los reaccionantes siguientes:

glicerol al 5%, PVP 10 al 0,3%, 2 U de Taq polimerasa, dNTP 1 mM, y 5 mM final de MgCl₂.

Se añaden 10 µl de DNA a esta mezcla.

* Termociclación:

Primer ciclo: 15 segundos a 95 °C
 40 Segundo ciclo: 30 segundos a 95 °C
 Tercer ciclo: 50 segundos a 58 °C
 Cuarto ciclo: 30 segundos a 72 °C
 Se repite 50 veces del ciclo 2 al ciclo 4.

4.2. Resultados: Tabla 16 [ND: no detectado; SD: desviación estándar (del inglés, standard deviation); IC: testigo interno]

Muestra	Resultado de la primera PCR		Resultado de la segunda PCR		Resultado del cultivo		PCR en tiempo real, del presente invento							
	C. trachomatis		M. genitalium		N. gonorrhoeae		C. trachomatis		M. genitalium		N. gonorrhoeae		IC	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
1	+	-	-	-	-	-	33,0	0,00	ND	ND	ND	ND	34,15	0,35
2	+	-	-	-	-	-	35,95	0,07	ND	ND	ND	ND	34,70	0,14
3	+	-	-	-	-	-	27,95	0,21	ND	ND	ND	ND	34,70	0
4	+	-	-	-	-	-	23,95	0,21	ND	ND	ND	ND	34,10	0
5	+	-	-	-	-	-	31,70	0,14	ND	ND	ND	ND	34,25	0,21
6	+	-	-	-	-	-	33,75	0,35	ND	ND	ND	ND	34,75	0,07
7	+	-	-	-	-	-	29,05	0,07	ND	ND	ND	ND	34,65	0,07
8	+	-	-	-	-	-	29,95	0,07	ND	ND	ND	ND	34,05	0,19
9	+	-	-	-	-	-	24,50	0,28	ND	ND	ND	ND	34,95	0,07
10	+	-	-	-	-	-	31,25	0,49	ND	ND	ND	ND	34,80	0,57
11	-	-	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	37,05	1,34	0,92
12	+	-	-	-	-	-	31	0	ND	ND	ND	ND	34,10	0,28
13	-	-	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	45,15	3,04	0,14
14	-	-	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	29,50	0,28	0,92
15	+	-	-	-	-	-	31,80	0,42	ND	ND	ND	ND	34,55	0,35
16	+	-	-	-	-	-	32,75	0,07	ND	ND	ND	ND	35,30	0,57
17	-	-	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	33,45	0,21	0,07
18	-	-	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	39,30	0,85	0,42

Muestra	Resultado de la primera PCR	Resultado de la segunda PCR	Resultado del cultivo	PCR en tiempo real, del presente invento									
				<i>C. trachomatis</i>		<i>M. genitalium</i>		<i>N. gonorrhoeae</i>		IC			
				Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD		
19	+	-	-	31,20	0,42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34,45	0,92
Testigo negativo	NE	NE	NE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34,25	0,07
Testigo positivo de <i>C. trachomatis</i>	NE	NE	NE	28,85	0,21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35,40	0,14
Testigo positivo de <i>M. genitalium</i>	NE	NE	NE	ND	ND	31,80	0,14	ND	ND	ND	ND	34,65	0,21
Testigo positivo de <i>N. gonorrhoeae</i>	NE	NE	NE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25,30	0,14	35,60	0,57

El IC es perfectamente detectado en el sistema múltiple en tiempo real del invento, lo que confirma que no hay inhibidor de Taq polimerasa alguno.

La multiplicación múltiple en tiempo real del invento presenta una buena reproducibilidad, siendo las desviaciones estándares muy pequeñas salvo para dos puntos en *N. gonorrhoeae*.

- 5 Los resultados de detección obtenidos con el sistema múltiple en tiempo real del invento son al menos tan precisos como los obtenidos con los sistemas de la técnica previa.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección de *Chlamydia trachomatis* (CT) y/o *Mycoplasma genitalium* (MG) y/o *Neisseria gonorrhoeae* (NG) en una muestra, que es adecuado para dicha detección en una multiplicación múltiple en tiempo real,
- 5 en que dicha detección comprende la determinación de si se ha producido, o se produce, al menos un amplicón a partir de dicha muestra, o a partir de material de ácido nucleico de la misma, mediante multiplicación por medio de cebadores de multiplicación,
- de modo que una determinación positiva indica que está(n) presente(s) al menos una CT y/o al menos un MG y/o al menos una NG en dicha muestra,
- 10 en que dichos cebadores de multiplicación comprenden:
- al menos dos cebadores que están destinados a dirigirse a CT y que son adecuados para la detección de CT en una multiplicación múltiple en tiempo real,
- en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son oligonucleótidos que consisten en 14-30 nucleótidos, cuyas secuencias son adecuadas para uso como cebadores directo e inverso, respectivamente, en la multiplicación de al menos una secuencia molde de referencia de CT, en que dicha al menos una secuencia molde de referencia de CT es un fragmento que consiste en las posiciones 5571-5760 (ID. SEC. nº 5) de la secuencia de CT de ID. SEC. nº 1, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a CT que permiten una detección múltiple de CT en tiempo real,
- 15
- 20 y
- al menos dos cebadores que están destinados a dirigirse a MG y que son adecuados para la detección de MG en una multiplicación múltiple en tiempo real,
- en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son oligonucleótidos que consisten en 14-30 nucleótidos, cuyas secuencias son adecuadas para uso como cebadores directo e inverso, respectivamente, en la multiplicación de al menos una secuencia molde de referencia de MG, en que dicha al menos una secuencia molde de referencia de MG es un fragmento que consiste en:
- 25
- las posiciones 1-270 (ID. SEC. nº 13) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 2, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
- 30
- las posiciones 1140-1290 (ID. SEC. nº 19) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
- 35
- las posiciones 1060-1250 (ID. SEC. nº 25) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
- 40
- las posiciones 1520-1710 (ID. SEC. nº 31) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
- 45
- las posiciones 1500-1710 (ID. SEC. nº 37) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real,
- y
- al menos dos cebadores que están destinados a dirigirse a NG y que son adecuados para la detección de NG en una multiplicación múltiple en tiempo real,
- 50 en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son oligonucleótidos que consisten en 14-30 nucleótidos, cuyas secuencias son adecuadas para uso como cebadores directo e inverso, respectivamente, en la multiplicación de al menos una secuencia molde de referencia de NG, en que dicha al menos una secuencia molde de re-

ferencia de NG es un fragmento que consiste en las posiciones 101-380 (ID. SEC. nº 42) de la secuencia de NG de ID. SEC. nº 4 , o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a NG que permiten una detección múltiple de NG en tiempo real,

5 en que dicha determinación de si se ha producido, o se produce, al menos un amplicón es llevada a cabo por medio de al menos una sonda que está destinada a hibridarse con dicho al menos un amplicón, y en que dicha al menos una sonda comprende:

– al menos una sonda específica para CT, que es adecuada para la detección de CT en una multiplicación múltiple en tiempo real, en que dicha al menos una sonda específica para CT es:

10 i. un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de CT, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de CT por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, o

ii. una variante conservativa de dicho fragmento, cuya secuencia tiene al menos un 90% de identidad con un fragmento de i. por todo lo largo de dicho fragmento de i.,

15 y

– al menos una sonda específica para MG, que es adecuada para la detección de MG en una multiplicación múltiple en tiempo real, en que dicha al menos una sonda específica para MG es:

20 iii. un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de MG, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de MG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, o

iv. una variante conservativa de dicho fragmento, cuya secuencia tiene al menos un 90% de identidad con un fragmento de iii. por todo lo largo de dicho fragmento de iii.,

y

25 – al menos una sonda específica para NG, que es adecuada para la detección de NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, en que dicha al menos una sonda específica para NG es:

v. un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia de NG, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia de NG por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, o

30 vi. una variante conservativa de dicho fragmento, cuya secuencia tiene al menos un 90% de identidad con un fragmento de v. por todo lo largo de dicho fragmento de v.,

compartiendo dichas secuencias molde de referencia de CT, MG y NG la característica técnica especial de ser secuencias molde de referencia que son adecuadas para la construcción y producción de cebadores dirigidos a CT, MG y NG, así como de sondas específicas para CT, MG y NG, que se pueden usar conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo para detectar específicamente CT y/o MG y/o NG, ventajosamente CT y MG y NG, en tiempo real en dicho mismo tubo.

2. El procedimiento de detección de la Reivindicación 1, en que dicha al menos una secuencia molde de referencia de CT es el fragmento que consiste en las posiciones 5580-5754 (ID. SEC. nº 6) de la secuencia de CT de ID. SEC. nº 1.

40 3. El procedimiento de detección de la Reivindicación 1 ó 2, en que dicha al menos una secuencia molde de referencia de MG es

– el fragmento que consiste en las posiciones 2-259 (ID. SEC. nº 14) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 2, o

– el fragmento que consiste en las posiciones 1144-1283 (ID. SEC. nº 20) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o

45 – el fragmento que consiste en las posiciones 1064-1249 (ID. SEC. nº 26) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o

– el fragmento que consiste en las posiciones 1527-1704 (ID. SEC. nº 32) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o

– el fragmento que consiste en las posiciones 1501-1704 (ID. SEC. nº 38) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3,

compartiendo dichas secuencias molde de referencia de MG la característica técnica específica de ser referencias adecuadas para construir y producir cebadores dirigidos a MG, así como sondas específicas para MG, que se pueden utilizar conjuntamente en modo múltiple en el mismo tubo para detectar específicamente CT y/o MG y/o NG, ventajosamente CT y MG y NG, en tiempo real en dicho mismo tubo.

- 5 4. El procedimiento de detección de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicha al menos una secuencia molde de referencia de NG es el fragmento que consiste en las posiciones 114-365 (ID. SEC. nº 43) de la secuencia de NG de ID. SEC. nº 4.
5. El procedimiento de detección de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 7 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 12.
- 10 6. El procedimiento de detección de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18, o son al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 21, 27, 33 y 39, y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 24, 30 y 36.
- 15 7. El procedimiento de detección de la Reivindicación 6, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18.
8. El procedimiento de detección de la Reivindicación 6, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 21 y 27 y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 24, 30 y 36.
- 20 9. El procedimiento de detección de la Reivindicación 8, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 24 y 36.
10. El procedimiento de detección de la Reivindicación 9, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 24.
- 25 11. El procedimiento de detección de la Reivindicación 8, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 24, 30 y 36.
12. El procedimiento de detección de la Reivindicación 11, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 30.
- 30 13. El procedimiento de detección de la Reivindicación 6, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36 y al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 21, 27, 33 y 39.
14. El procedimiento de detección de la Reivindicación 13, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 33 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36.
- 35 15. El procedimiento de detección de la Reivindicación 13, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 39 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36.
16. El procedimiento de detección de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 44 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 47.
- 40 17. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 1-16, en que dicha al menos una sonda específica para CT es de ID. SEC. nº 8 ó 10, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., estando dicha sonda opcionalmente enlazada con al menos una etiqueta de detección y/o al menos un brazo nucleotídico que no está relacionado con CT, MG ni NG y que está destinado a portar un agente sofocador o un agente informador.
18. El procedimiento de detección de la Reivindicación 17, en que dicha al menos una sonda está enlazada con al menos un brazo de baliza.
- 45 19. El procedimiento de detección de la Reivindicación 18, en que dicha al menos una sonda específica para CT es de ID. SEC. nº 9 u 11, o la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
- 50 20. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 17-19, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 7 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 12, y dicha al menos una sonda específica para CT es seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 8, 9, 10 y 11.
21. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 1-20, en que dicha al menos una sonda

- específica para MG es seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 16, 22, 28, 34 y 40, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., estando dicha sonda opcionalmente enlazada con al menos una etiqueta de detección y/o al menos un brazo nucleotídico que no está relacionado con CT, MG ni NG y que está destinado a portar un agente sofocador o un agente informador.
22. El procedimiento de detección de la Reivindicación 21, en que dicha al menos una sonda tiene al menos un brazo de baliza.
23. El procedimiento de detección de la Reivindicación 22, en que dicha al menos una sonda específica para MG es seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 17, 23, 29, 35 y 41, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
24. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 21-23, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18, y en que dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 16 ó 17, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
25. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 21-23, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 24, y en que dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 22 ó 23, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
26. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 21-23, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 30, y en que dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 28 ó 29, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
27. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 21-23, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 33 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y en que dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 34 ó 35, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
28. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 21-23, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 39 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y en que dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 40 ó 41, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
29. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 1-28, en que dicha al menos una sonda específica para NG es de ID. SEC. nº 45, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., estando dicha sonda opcionalmente enlazada con al menos una etiqueta de detección y/o al menos un brazo nucleotídico que no está relacionado con CT, MG ni NG y que está destinado a portar un agente sofocador o un agente informador.
30. El procedimiento de detección de la Reivindicación 29, en que dicha al menos una sonda tiene al menos un brazo de baliza.
31. El procedimiento de detección de la Reivindicación 30, en que dicha al menos una sonda específica para NG es de ID. SEC. nº 46, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
32. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 29-31, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 44 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 47, y en que dicha al menos una sonda específica para NG es de ID. SEC. nº 45 ó 46, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.
33. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 1-32, en que:
- dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 7 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 12, y
 - dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18, o un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 24, o un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 30, o un oligonucleótido de ID. SEC. nº 33 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, o un oligonucleótido de ID. SEC. nº 39 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y
 - dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 44 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 47.

34. El procedimiento de detección de cualquiera de las Reivindicaciones 1-33, en que:

– dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 7 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 12, y dicha al menos una sonda específica para CT es de ID. SEC. nº 8, 9, 10 u 11, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., y

– dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 44 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 47, y dicha al menos una sonda específica para NG es de ID. SEC. nº 45 ó 46, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., y

– dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG y dicha al menos una sonda específica para MG son los siguientes:

– dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 15 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 18, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 16 ó 17, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o

– dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 21 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 24, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 22 ó 23, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o

– dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 27 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 30, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 28 ó 29, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o

– dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 33 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 34 ó 35, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC., o

– dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG son un oligonucleótido de ID. SEC. nº 39 y un oligonucleótido de ID. SEC. nº 36, y dicha al menos una sonda específica para MG es de ID. SEC. nº 40 ó 41, o es la secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.

35. El procedimiento de detección de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dichos al menos dos cebadores dirigidos a CT y/o dichos al menos dos cebadores dirigidos a MG y/o dichos al menos dos cebadores dirigidos a NG consisten en 17-25 nucleótidos.

36. El procedimiento de detección de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicha al menos una sonda específica para CT y/o dicha al menos una sonda específica para MG y/o dicha al menos una sonda específica para NG consiste(n) en 22-27 nucleótidos.

37. El procedimiento de detección de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la multiplicación de un testigo interno (IC) cuya secuencia no está relacionada con CT, MG ni NG, tal como el IC de ID. SEC. nº 48.

38. El procedimiento de detección de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una multiplicación múltiple en tiempo real.

39. El procedimiento de detección de la Reivindicación 38, en que dicha multiplicación es una PCR.

40. **Un método para la producción de cebadores y sondas** que se pueden utilizar en el mismo tubo para la detección de CT y MG y NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que comprende producir al menos una pareja de cebadores y al menos una sonda,

en que un oligonucleótido de dicha pareja de cebadores es de 14-30 nucleótidos, cuya secuencia tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de una secuencia molde de referencia, y el otro oligonucleótido de dicha pareja de cebadores es de 14-30 nucleótidos, cuya secuencia tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

en que dicha sonda es:

i. un fragmento de al menos 15 nucleótidos de dicha secuencia molde de referencia, o un fragmento de al menos 15 nucleótidos de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia, o

5 ii. una variante conservativa de un fragmento como el definido en i., teniendo la secuencia de dicha variante conservativa una identidad de al menos 90% con la secuencia de dicho fragmento de i. por todo lo largo de dicho fragmento de i.,

estando dicha sonda opcionalmente enlazada con al menos una etiqueta de detección y/o al menos un brazo de baliza,

en que dicha secuencia molde de referencia es:

10 – para el diseño de cebadores y sondas para CT: un fragmento que consiste en las posiciones 5571-5760 (ID. SEC. nº 5) de la secuencia de CT de ID. SEC. nº 1, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a CT que permiten una detección múltiple de CT en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento, en
15 que dicho fragmento conservativo consiste en las posiciones 5580-5754 (ID. SEC. nº 6) de la secuencia de CT de ID. SEC. nº 1,

– para el diseño de cebadores y sondas para MG: un fragmento que consiste en:

20 – las posiciones 1-270 (ID. SEC. nº 13) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 2, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento, en que dicho fragmento conservativo consiste en las posiciones 2-259 (ID. SEC. nº 14) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 2,

25 – las posiciones 1140-1290 (ID. SEC. nº 19) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento, en que dicho fragmento conservativo consiste en las posiciones 1144-1283 (ID. SEC. nº 20) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3,

30 – las posiciones 1060-1250 (ID. SEC. nº 25) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento, en que dicho fragmento conservativo consiste en las
35 posiciones 1064-1249 (ID. SEC. nº 26) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3,

40 – las posiciones 1520-1710 (ID. SEC. nº 31) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento, en que dicho fragmento conservativo consiste en las posiciones 1527-1704 (ID. SEC. nº 32) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3,

45 – las posiciones 1500-1710 (ID. SEC. nº 37) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a MG que permiten una detección múltiple de MG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento, en que dicho fragmento conservativo consiste en las posiciones 1501-1704 (ID. SEC. nº 38) de la secuencia de MG de ID. SEC. nº 3,

50 – para el diseño de cebadores y sondas para NG: un fragmento que consiste en las posiciones 101-380 (ID. SEC. nº 42) de la secuencia de NG de ID. SEC. nº 4, o de un subfragmento conservativo de la misma, que ha conservado la propiedad de ser una secuencia molde de referencia adecuada, para construir y producir cebadores dirigidos a NG que permiten una detección múltiple de NG en tiempo real, o una secuencia que es totalmente complementaria de dicho fragmento o subfragmento por todo lo largo de dicho fragmento o subfragmento, en que dicho fragmento conservativo consiste en las posiciones 114-365 (ID. SEC. nº 43) de la secuencia de NG de ID. SEC. nº 4.

55 **41. Un cebador, que está especialmente adaptado para** la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que es:

un oligonucleótido de 14-30 nucleótidos, cuya secuencia tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de una secuencia molde de referencia o de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

5 en que dicha secuencia molde de referencia es:

– la ID. SEC. nº 6; o

– la ID. SEC. nº 14 o la ID. SEC. nº 20 o la ID. SEC. nº 26 o la ID. SEC. nº 32 o la ID. SEC. nº 38; o

– la ID. SEC. nº 43.

42. El cebador de la Reivindicación 41, que es:

10 – un cebador dirigido a CT, seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 7 y 12, o

– un cebador dirigido a MG, seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 y 39, o

– un cebador dirigido a NG, seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 44 y 47.

15 43. **Un sistema de cebadores, que está especialmente adaptado para** la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que comprende:

al menos una pareja de oligonucleótidos, cada uno de 14-30 nucleótidos,

teniendo la secuencia de un oligonucleótido de dicha pareja una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de una secuencia molde de referencia, y

20 teniendo la secuencia del otro oligonucleótido de dicha pareja una identidad de al menos 80% con la secuencia de la misma longitud que es el extremo terminal 5' exacto de la secuencia que es totalmente complementaria de dicha secuencia molde de referencia por todo lo largo de dicha secuencia molde de referencia,

en que dicha secuencia molde de referencia es:

– la ID. SEC. nº 6; o

– la ID. SEC. nº 14 o la ID. SEC. nº 20 o la ID. SEC. nº 26 o la ID. SEC. nº 32 o la ID. SEC. nº 38; o

25 – la ID. SEC. nº 43.

44. El sistema de cebadores de la Reivindicación 43, que comprende:

– al menos una pareja de cebadores dirigidos a CT, de ID. SEC. nº 7 e ID. SEC. nº 12, y/o

30 – al menos una pareja de cebadores dirigidos a MG, seleccionada de entre las parejas siguientes: las ID. SEC. números 15 y 18; las ID. SEC. números 21 y 24; las ID. SEC. números 27 y 30; las ID. SEC. números 33 y 36; las ID. SEC. números 39 y 36, y/o

– al menos una pareja de cebadores dirigidos a NG, de ID. SEC. números 44 y 47.

45. El sistema de cebadores de la Reivindicación 43 ó 44, que comprende tres de dichas parejas de oligonucleótidos, y en que dicha secuencia molde de referencia es:

– para una de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 6;

35 – para otra de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 14 o la ID. SEC. nº 20 o la ID. SEC. nº 26 o la ID. SEC. nº 32 o la ID. SEC. nº 38;

– para la última de dichas tres parejas: la ID. SEC. nº 43.

46. **Una sonda, que está especialmente adaptada para** la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que es:

40 – una sonda específica para CT de ID. SEC. nº 8 ó 10, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.,

– una sonda específica para MG de ID. SEC. nº 16, 22, 28, 34 ó 40, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.,

– una sonda específica para NG de ID. SEC. nº 45, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.,

estando dicha sonda opcionalmente enlazada con al menos una etiqueta de detección y/o al menos un brazo de baliza.

5 47. La sonda de la Reivindicación 46, que es:

– una sonda específica para CT de ID. SEC. nº 9 u 11, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.,

– una sonda específica para MG de ID. SEC. nº 17, 23, 29, 35 ó 41, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.,

10 – una sonda específica para NG de ID. SEC. nº 45 ó 46, o que consiste en una secuencia que es totalmente complementaria de esta secuencia ID. SEC. por todo lo largo de esta secuencia ID. SEC.

48. Un sistema de cebadores y sondas, que está especialmente adaptado para la detección de CT y/o MG y/o NG en una multiplicación múltiple en tiempo real, que comprende al menos un sistema de cebadores de cualquiera de las Reivindicaciones 43-45 y al menos una sonda de cualquiera de las Reivindicaciones 46-47.

15 **49. Una composición de multiplicación,** que comprende al menos un amplicón obtenible por implementación del procedimiento de cualquiera de las Reivindicaciones 1-39 sobre una muestra que contiene CT y/o MG y/o NG, o por multiplicación de al menos un ácido nucleico procedente de una muestra que contiene CT y/o MG y/o NG por medio de al menos un sistema de cebadores de cualquiera de las Reivindicaciones 43-45, y

que comprende además:

20 – los cebadores dirigidos a CT como se definen en la Reivindicación 1 y los cebadores dirigidos a MG como se definen en la Reivindicación 1 y los cebadores dirigidos a NG como se definen en la Reivindicación 1; o

– el sistema de cebadores de la Reivindicación 45.

50. La composición de multiplicación de la Reivindicación 49, que comprende tres amplicones, en que dichos tres amplicones son obtenibles:

25 – por implementación del procedimiento de cualquiera de las Reivindicaciones 1-39 sobre una muestra que contiene CT y MG y NG, o

– por multiplicación de al menos un ácido nucleico de CT, y de al menos un ácido nucleico de MG y al menos un ácido nucleico de NG, por medio del sistema de cebadores de la Reivindicación 45.

51. **Un kit para el diagnóstico** de una infección por CT y/o MG y/o NG, que comprende:

30 – al menos un sistema de cebadores de cualquiera de las Reivindicaciones 43-45, y/o

– al menos una sonda de cualquiera de las Reivindicaciones 46-47, y,

– opcionalmente, instrucciones para el uso de los mismos y/o nucleótidos.

35 52. El kit de la Reivindicación 50, que comprende además el oligonucleótido Testigo Interno (IC) de ID. SEC. nº 48, y/o la pareja de cebadores de IC de ID. SEC. números 49 y 52, y/o la sonda para IC de ID. SEC. nº 50, y/o la sonda para IC de ID. SEC. nº 51.

```

1 ggatccgtaa gttagacgaa attttgtctt tgcgcacaga c gatctattt tttgcatcca
61 atcagatttc ctttcgcatt aaaaaaagac agaataaaga aaccaaaatt ctaatcacat
121 ttcctatcag cttaatggaa gagttgcaaa aatacacttg tgggagaaat gggagagtat
181 ttgtttctaa aatagggatt cctgtaacaa caagtcaggt tgcgcataat tttaggettg
241 cagagttcca tagtgctatg aaaataaaaa ttactcccag agtacttcgt gcaagcgctt
301 tgattcattt aaagcaaata ggattaaaag atgaggaaat catgcgattt tccctgtctt
361 catcgagaca aagtgtgtgt tcttattgtt ctggggaaga ggtaaltcct ctagtacaaa
421 caaccacaat attgtgatat aattaaaatt atattcatat tctgttgcca gaaaaaacac
481 ctttaggcta tattagagcc atcttctttg aagcgttgtc ttctcgagaa gatttatcgt
541 acgcaaatat catctttgcg gttgcggtgc ctgtgacctt cattatgtcg gagtctgagc
601 accctaggcg tttgtactcc gtcacagcgg ttgctcgaag cacgtgcggg gttattttaa
661 aagggattgc agctttagt cctgcttgag agaacgtgcg ggcgatttgc ctaacccca
721 ccatttttcc ggagcgagtt acgaagacaa aacctcttcg ttgaccgatg tactcttgta
781 gaaagtgc ataaacttctga ggataagtta taataatcct cttttctgtc tgacggttct
841 taagctggga gaaagaaatg gtagcttgtt ggaaacaaat ctgactaatc tccaagctta
901 agacttcaga ggagcgttta cctccttgga gcattgtctg ggcgatcaac caatcccggg
961 cattgatttt ttttagctct tttaggaagg atgctgtttg caaactgttc caagctccg
1021 tttttactat ttccctgggt ttaaaaaatg ttcgactatt ttcttgttta gaaggttgcg
1081 ctatagcgac tattccttga gtcactctgt ttaggaatct tghtaaggaa atatagcttg
1141 ctgctcgaac ttgttttagta ccttcggctc aagaagtctt ggcagaggaa acttttttaa
1201 tgcctatctag gattagatta tgatttaaaa gggaaaactc ttgcagattc atatccaagg
1261 acaatagacc aatcttttct aaagacaaaa aagatcctcg atatgatcta caagtatggt
1321 tgttgagtgatg tgcggtccaa tgcataataa cttcgaataa ggagaagctt tcatgcggtt
1381 tccaatagga ttcttgccga atttttaaaa cttctgata agacttttca ctatattcta
1441 acgacatttc ttgtgcgcaa gataaaatcc ctttaccat gaaatccctc gtgatataac
1501 ctatccgtaa aatgtcctga ttagtgaat aatcaggttg ttaacaggat agcacgctcg
1561 gtattttttt atataaacat gaaaactcgt tccgaaatag aaaatcgc atgcaagatc
1621 gagtatgcgt tghtaggtaa agctctgata tttgaagact ctactgagta tattctgagg
1681 cagcttgcta attatgagtt taagtgttct catcataaaa acatattcat agtatttaaa
1741 cacttaaaag acaatggatt acctataact gtagactcgg cttgggaaga gcttttgcgg
1801 cgtcgtatca aagatatgga caaatcgtat ctcgggttaa tghtgcatga tgccttatca
1861 aatgacaagc ttgatccgt ttctcaccg gtttctctcg atgatttgag gttggttagc
1921 ctggaagaaa atttgagtaa tttcatttcc cgtcgttta atgagtacaa tgaaaatcca
1981 ttgcttagat ctccgtttct attgcttgag cgtataaagg gaaggcttga tagtgctata
2041 gcaaagactt tttctattcg cagcgttaga ggccggctca tttatgatat attctcacag
2101 tcagaaattg gagtgcctggc tcgtataaaa aaaagacgag tagcgttctc tgagaatcaa
2161 aattctttct ttgatggctt cccaacagga tacaaggata ttgatgataa aggagttatc
2221 ttagctaaaag gtaatttctg gattatagca gctagaccat ctatagggaa aacagcttta
2281 gctatagaca tggcgataaa tcttgccggtt actcaacagc gttagagttgg tttcctatct
2341 ctagaaatga gcgcaggtca aattggttag cggattattg ctaatttaac aggaatatct
2401 ggtgaaaaat tacaagagg ggatctctct aaagaagaat tattccgagt agaagaagct
2461 ggagaaacgg ttagagaatc acatttttat atctgcagt atagtcagta taagcttaac
2521 ttaatcgcga atcagatccg gttgctgaga aaagaagatc gagtagacgt aatatttatc
2581 gattacttgc agttgatcaa ctcatcgggt ggagaaaatc gtcaaaatga aatagcagat
2641 atatctagaa ccttaagagg tttagcctca gagctaaaca ttctatagtt ttgtttatcc
2701 caactatcta gaaaagttga ggatagagca aataaagttc ccatgctttc agatttgcca
2761 gacagcggtc aaatagagca agacgcagat gtgattttgt ttatcaatag gaaggaatcg
2821 tcttctaatt gtgagataac tgttgggaaa aatagacatg gatcggtttt ctcttcggta
2881 ttacatttct atccaaaaat tagtaaatc tccgctatta aaaaagtatg gtaaatata
2941 gtaactgcca ctcatcaaa agtccatcc accttgaaaa tcagaagttt ggaagaagac
3001 ctggtcaatc tattaagata tctcccaaat tggctcaaaa tgggatggta gaagttatag
3061 gtcttgattt tctttcatct cattaccatg cattagcagc tatccaaaga ttactgaccg
3121 caacgaatta caaggggaa caaaaagggg ttgttttatc cagagaatca aatagtttct
3181 aatttgaagg atggatacca agaatccgtt ttacaaaaac tgaattctta gaggcttatg

```

FIGURA 1 (inicio)

3241 gagttaagcg gtataaaaca tccagaaata agtatgagtt tagtggaaaa gaagctgaaa
 3301 ctgctttaga agccttatac cattedaggac atcaaccggtt tttaatagtg gcaactagaa
 3361 ctgatggac taatggaaca caaatagtag accgttacca aactctttct cggatcatta
 3421 ggatttacga aggatgggaa ggtttaactg acgaagaaaa tatagatata gacttaacac
 3481 cttttaattc accacctaca cggaaacata aagggttcgt tgtagagcca tgtcctatct
 3541 tggtagatca aatagaatcc tactttgtaa tcaagcctgc aaatgtatac caagaaataa
 3601 aaatgcggtt cccaaatgca tcaaagtatg cttacacatt tatcgactgg gtgattacag
 3661 cagctgcgaa aaagagacga aaattaacta aggataattc ttggccagaa aacttgttat
 3721 taaacgttaa cgttaaaagt cttgcatata ttttaaggat gaatcggtag atctgtacaa
 3781 ggaactggaa aaaaatcgag ttagctatcg ataaatgtat agaaatcgcc attcagcttg
 3841 gctggttatc tagaagaaaa cgcattgaaat ttctggattc ttctaaactc tctaaaaaag
 3901 aaattctata tctaaataaa gagcgttttg aagaaataac taagaaatct aaagaacaaa
 3961 tggaaacaatt agaacaagaa tctattaatt aatagcaagc ttgaaactaa aaacctaat
 4021 tatttaaagc tcaaaataaa aaagagtttt aaaatgggaa attctggttt ttatttgtat
 4081 aacactgaaa actgctctt tgcctgataat atcaaagttg ggcaaatgac agagccgctc
 4141 aaggaccagc aaataatcct tgggacaaca tcaacacctg tcgcagccaa aatgacagct
 4201 tctgatggaa tatctttaac agtctccaat aattcatcaa ccaatgcttc tattacaatt
 4261 ggtttggatg cggaaaaagc ttaccagctt attctagaaa agttgggaga tcaaatctt
 4321 gatggaaattg ctgatactat tgttgatagt acagtcctaa atattttaga caaaatcaaa
 4381 acagaccctt ctctaggttt gttgaaagct tttaaact ttccaatcac taataaaatt
 4441 caatgcaacg ggttattcac tcccagtaac attgaaactt tattaggagg aactgaaata
 4501 ggaaaattca cagtcacacc caaaagctct gggagcatgt tcttagtctc agcagatatt
 4561 attgcatcaa gaatggaagg cggcgttggt ctagctttgg tacgagaagg tgattctaag
 4621 ccctgcgcca ttagttatgg atactcatca ggcattccta atttatgtag tctaagaacc
 4681 agtattacta atacaggatt gactccgaca acgtattcat tacgtgtagg cggtttagaa
 4741 ggcggtgtgg tatgggttaa tgcctttct aatggcaatg atattttagg aataacaat
 4801 acttctaattg tatctttttt agaggtaata cctcaaacia acgcttaaac aatttttatt
 4861 ggatttttct tataggtttt atatttagag aaaacagttc gaattacggg gtttgttatg
 4921 caaaataaaa gaaaagttag ggacgatttt attaaaattg ttaaagatgt gaaaaaagat
 4981 tccccogaat tagacctaaa aatcagagta aacaaggaaa agtaacttt cttaaattct
 5041 cccttagaac tctaccataa aagtgtctca ctaattctag gactgcttca acaaatagaa
 5101 aactcttttag gattattccc agactctcct gttcttgaaa aattagagga taacagttta
 5161 aagctaaaaa aggctttgat tatgctatc ttgtctagaa aagacatgt ttccaagtt
 5221 gaatagacaa cttactctaa cgttggagtt gatttgcaca ccttagtttt ttgctcttt
 5281 aaggagggaa ctggaaaaac aacactttct ctaaactggt gatgcaactt ggcccaattt
 5341 ttagggaaaa aagtgttact tgctgaccta gaccgcgaat ccaatttatc ttctggattg
 5401 gggctagtg tcagaagtga ccaaaaaggc ttgcacgaca tagtatacac atcaaacgat
 5461 ttaaaatcaa tcatattgca aacaaaaaaa gatagtggtg acctaattcc tgcattcatt
 5521 tcatccgaac agtttagaga attggatatt catagaggac ctagtaacaa cttaaagtt
 5581 tttctgaatg agtactgcgc tctttttat gacatctgca taatagacac tccacctagc
 5641 ctaggagggt taacgaaaga agcttttggt gcaggagaca aattaattgc ttgtttaact
 5701 ccagaacctt tttctattct aggtttacaa aagatacgtg aattcttaag ttgggtcgg
 5761 aaacctgaag aagaacacat tcttgaata gctttgtctt tttgggatga tcgtaactcg
 5821 actaaccaaa tgtatataga cattatcgag tctatttaca aaaacaagct tttttcaaca
 5881 aaaattcgtc gagatatttc tctcagccgt tctcttctta aagaagattc tgtagcta
 5941 gtctatccaa attctagggc cgcagaagat attctgaagt taacgcataa aatagcaaat
 6001 attttgcatc tcgaatatga acgagattac tctcagagga caactggaac aaactaaaaa
 6061 aagaagcggg tgtctttttt aaaaaaatc aaactgccgc ttctctagat tttaaaga
 6121 cgcttccctc cattgaaacta ttctcagcaa ctttgaattc tgaggaaagt cagagtttg
 6181 atcgattatt tttatcagag tcccaaaact attcggatga agaattttat caagaagaca
 6241 tcctagcggg aaaactgctt actggtcaga taaaatccat acagaagcaa cacgtacttc
 6301 ttttaggaga aaaaatctat aatgctagaa aaatcctgag taaggatcac ttctctcaa

FIGURA 1 (continuación)

```

6361 caactttttc atcttggata gagttagttt ttagaactaa gtcttctgct tacaatgctc
6421 ttgcatatta cgagcttttt ataaacctcc ccaaccaaac tctacaaaaa gagtttcaat
6481 cgatccccta taaatccgca tatattttgg ccgctagaaa aggcgattta aaaaccaagg
6541 tcgatgtgat agggaaagta tgtggaatgt cgaactcatc ggcgataagg gtggtggatc
6601 aatttcttcc ttcacttaga aacaaagacg ttagagaaac gatagataag tctgattcag
6661 agaagaatcg ccaattatct gatttcttaa tagagatact tcgcatcatg tgttccggag
6721 tttctttgtc ctccctataac gaaaatcttc tacaacagct tttgaaactt ttttagcaaa
6781 agagctgatc ctccgtcagc tcatatata atatctatta tatatatata tttagggatt
6841 tgatttcacg agagagattt gcaactcttg gtggtagact ttgcaactct tgggtgtaga
6901 ctttgcaact cttggtggta gactttgcaa ctcttggtgg tagacttggg cataatggac
6961 ttttgtaaaa aaatttatta aaatcttaga gctccgattt tgaatagctt tgggtaagaa
7021 aatgggctcg atggctttcc ataaaagtag attgttttta acttttgggg acgcgctcga
7081 aatttggtta tctactttat cttatctaac tagaaaaaat tatgctctg ggattaactt
7141 tcttgtttct ttagagatcc tggatttatc ggaaaccttg ataaaggcta tttctcttga
7201 ccacagcgaa tctttgttta aaatcaagtc tctagatggt ttaatggaa aagttgtttc
7261 agaggcatct aaacaggcta gagcggcatg ctacatatct ttcacaaagt ttttgtatag
7321 attgaccaag ggatatatta aacctgctat tccattgaaa gattttggaa acactacatt
7381 ttttaaaatc cgagacaaaa tcaaaacaga atcgatttct aagcaggaat ggacagttt
7441 ttttgaagcg ctccggatag tgaattatag agactattta atcggtaaat tgattgtaca
7501 ag

```

ID. SEC. nº 1 (plásmido pCHL1 de CT; acceso J03321)

FIGURA 1 (fin)

```

1  aggatcattt  ggattagtaa  gaagccaaaa  tgacaactta  aatatttcaa  gtgttacaaa
61  gaatgttngt  gatgataatc  tcaagtatct  caatgctggt  gagaaatacc  ttgatggcca
121 gcaaaacttt  gcaatcagaa  ggtatgataa  caacggtaga  gctttatatg  atattaactt
181 agcaaaaatg  gaaaaccctt  caacggtgca  aaggggttta  aatggcgagc  ctatctttga
241 tcctttttaa  ggctttgggt  taactggtaa  tgcccctact  gattggaatg  agatcaaagg
301 taaagttcca  gtagaagtag  tccaatcccc  ccattcccc  aacctctatt  ttgtgttact
361 agtgcctaag  gtggcattag  agtaccacca  acttgataag  aaagtagtca  aagagagttt
421 ggaagtggaa  gcaacngatt  cttttgatcc  aactaaaagg  ttgcaaaaag  atagtccaat
481 gaaggattca  agtaacaag  gggagaaact  cagtgaagca  atgtcatcag  tgggtatgag
541 tagtggggg  gctacatctc  ctcgcaaggc  cctcaagata  gaggtggaga  aaggcagtaa
601 tgtcaatcaa  ggcgaactag  caaaaacga  ctttgctaaa  aagccactga  aacataaaga
661 aaatagtggg  acagaggtga  agttggatgc  gaatggggag  tttgccaatg  ataaagcctg
721 aaaaccattg  ttgactactg  atcaaatagc  aaaagagaag  gggatggggg  cgacggtggt
781 tagtttctat  gatgcaccct  acagtgaaaa  ccatactgcc  tttggacttg  ttgatcacat
841 cgatcctaaa  aagatgggtg  aaaactaccc  accaagttga  aagaccccga  agtgaacca
901 ccattggatc  tgggattaca  acgcaagaaa  cctcttgta  caaacaacag  gttctttaa
961 cccaagaaga  caccagagt  ggtttgatga  aggacaagct  aaggcagata  aactagccc

```

ID. SEC. nº 2 (porción 5' del gen Pa de MG; acceso X91074)

FIGURA 2

```

1 cattgtgtta ttagggatta tcttttgtct gtttgccatc tatgacattg cgcaagtgat
61 cattaccatt atcaatgaag gggcactttt ataatctttg ttatgaaaaa aggatcaata
121 actgaagcaa ttaatgccat taacaacttt gataagattg ttatctttca ccatgtgctc
181 cctgatgggg attgtttagg agcacaacaa ggcttgtttc acctcattaa agctaacttt
241 aaaaaataagg aggtgaagtg tgttggtaat aacaacaacc tgtttagctt tatcaacatg
301 acatttacca accaaattga tgagagcttt ttaaaagaag cacttgccat tgtggtcgat
361 gctaattaca aaaacaggat tgaattgaga gaactgttag ataaaaacct gtttaaagca
421 gtgtaagga ttgatcacca tccaatgaa gatgatctaa aactagctt taactttgtt
481 gaagaaagct atgtagcttg ttgtgagcag atagtggaga tggccacagt ggogaagtgg
541 accataccac cagtggctgc tactttacta tatataggta tctatacggg tagtaataga
601 tttctatata gtaatacatc atatagaaca ctatacttag cagcaatagc atataaagct
661 aaagctgata taaggatagt acatgatcat ttaaaccata ctagtttagc agatcttaag
721 tttaaaaagt atgtttataa ccactttaaa acccaaggac aagtgatcta ttttatctgt
781 actaaaaaga tccaaaagag actaagaatg actgcagatc aatgtgctag agttaacttg
841 ttaagtaaca tagcagatta caagatctga cttttcttta ttgaacaagc taataatgag
901 atcaggatag aactgaggag taatgggatt aatgtcagag atatagccat taagtatggt
961 gggggaggac ataataatgc aagtggagcg atcattacta aaaaaaaca aattagtgat
1021 gttgttagtg attgtgtgaa aaaaattggt tataattaag tttgtatgca ccaaccaaag
1081 aaagactgg ctaagaagtc ttgagccttt ctaaccgctg cacttacctt tggggttata
1141 acaggtgtag gtggttatt tctctttaac caaataagc aacgtatgag cgtgagcaac
1201 tttgcttacc aaccaagca gttaaagtgt aacaccaac aagcagttga tgaacctta
1261 accccttggc ctgaaacaa taacaacttc tcttactaa agattactgg agagaacca
1321 ggatcatttg gattagtaag aagccaaaat gacaacttaa atatttcaag tgttacaag
1381 aattctagtg atgataatct caagtatctc aatgctgttg agaaatacct tgatggctag
1441 caaaactttg caatcagaag gtatgataac aacggtagag ctttatatga tattaactta
1501 gcaaaaaatgg aaaaccctc aacggtgcaa aggggtttaa atggcgagcc tatctttgat
1561 ccttttaag gctttggtt aactggtaat gccctactg attggaatg gatcaaaggt
1621 aaagttccag tagaagtagt tcaatcccc cctccccca acctctattt tgtgttacta
1681 gtgcctaagg tggcattaga gtatcacaac ctgaataacc aagtagtcaa agagagtttg
1741 gaagtgaag caaccaatc atccttcaac cccacccaaa ggttgcaaaa agatagtcca
1801 gtgaaggatt caagtaacaa aggggagaaa ctcagtgaaa caactgcttc atccatgagt
1861 agtggatagg ctacatccac tcgagccaag gccctcaaag tggaggtgga aagggggagt
1921 caaagtgatt cacttttaaa aaacgacttt gctaaaaagc cactaaagca taagaacagt
1981 agtggggagg tgaagttaga ggcagagaag gactttactg aggcctgaaa accattggtg
2041 actctagtc aaatagcaag agagaagggg atgggggcca cgtggttag tttctatgat
2101 gcaccctaca gtgaaaacca tactgccttt ggacttgttg atcacatcga tcttaaaaag
2161 atggttgaaa actaccacc aagttgaaag accccgaagt gaaaccacca tgggatctgg
2221 gattacaacg caagaaacct cttgttacia acaacagggt tctttaacct aagaagacac
2281 cgggagtggg ttgatgaagg acaagctaag gcagataaca ctlagcctgg ctttaaggta
2341 ggggatactg atcacaaaa agacggggtt aaaaaaact ctcttctcc aatagcttta
2401 ccatttgaag catactttgc taacattggt aacatggttg ctattggtaa ctcggtattt
2461 atctttggtg gtaatggtca tgctactaag atgtttacca ccaatccctt aagtattggg
2521 gtatttagga ttaaatcac tgataacttt agtaagtcag cagtaacagg ttgaccatat
2581 gcagtgttat ttgggggatt aattaatccc caaaccaatg gctgaaaga tcttccctt
2641 ggtaccaaca ggtggttga atatgtacca agaatggcag ttagtggggg gaaatgggtt
2701 ggtaatcaac tagtgtagc aggaacacta acaatgggtg atacagctac tgtacctagg
2761 ttaaagtatg atcaactaga aaaacactta aacctagttg ctcaaggcca gggactattg
2821 agagaagact tgcagatctt cactccctat gggtagacta atcgtcctga tattcctgta
2881 ggagcatgac tccaagatga aatgggcagt aaatttggtc cccattactt cttaataaac
2941 cctgatatcc aggacaatgt taataatgat acggttgaag cattaatcag tagttacaaa
3001 aacactgata agttaaaaca cgtttactct tatcgataca gtggttggta tggctgacag
3061 ttatttaact ggtctaacaa actaaccac actcccctat cagctaactt tgttaatgaa
3121 aacagttatg caccaacag tttgtttgct gctatcttaa atgaagatct gttaacaggg
3181 ctaagtgata agattttcta tggtaaaggag aatgagtttg ctgaaaatga agcagatagg
3241 tttaaccaac ttttaagttt aaatcctaact cctaacacta actgagctag gtatttaaac
3301 gtagtacaac gttttactac cggacctaac cttgatagtt ctacctcga tcagttctta
3361 gactttctcc cctgaatcgg caatggtaaa cccttttcca actccccctc ccttcaact

```

FIGURA 3 (inicio)

3421 tccgcttccct cttctacccc cctccccact ttttctaaca tcaatggttg ggttaaatca
3481 atgatcactc aacattttaa taagaaaaac acccgggtgg tgtttatacc taacttttca
3541 cctgacatct gaacaggagc agggatcgc gttcaaagt ctaatcagaa aaacggcatt
3601 ccttttgaac aggtgaaacc tagcaataat agtaccocct ttgatcccaa ttcagatgat
3661 aataaagtca caccatcagg tggctcctcc aaaccaacca cctatcctgc tttacccaac
3721 agtatcagtc ccaccagtga ctggatcaat gcattgactt tactaataa gaataaccg
3781 cagcgcacac aactggtgct cagaagctta ctaggaaacta tccggctctt gatcaataag
3841 agtgggggata gtaatgatca atttaacaag gatagtgagc agaaatggga taaaactgag
3901 acaaatgagg gtaatttacc tgggtttggg gaggtgaatg ggttgataa tgccgcatta
3961 ctccatacct atgggttttt tggcaccaat accaactcta ctgatcctaa gataggtttt
4021 aaagctgata gtagtagtag tagtagtagt acactagtag gtagtgggtt aaactgaact
4081 agtcaggatg taggtaatct tgttgtaatc aatgacacca gctttgggtt tcaacttggg
4141 ggttggttta ttaccttcac tgactttatc agaccaagaa ctggttatct agggattacc
4201 ttaagtagct tacaagatca aaccattatc tgagcagatc agccttgaac tagtttcaaa
4261 ggcagttatc tagacagtga tggtagccct aatcactgt gagatccaac tgctttaaaa
4321 tcccttccaa atagttcaac tacctatgat accaatccta cctctcacc ctccctccaa
4381 ctctaccaac ccaacaaggt gaaggcttac caaaccacta acacctacaa caagttaatt
4441 gaacagttg atgcaacaag tgcagcaact aacatgacca gtttgtaaa actcctaaca
4501 actaaaaaca tcaagcgaa attggggaag ggaacagctt ctccgaggg aataataat
4561 ggagggggtg ttagtcaaac gattaacacc atcaccacta cgggaaatat tagtgaaggt
4621 ctaaaagaag aaactagtat tcaagcagaa acacttaaaa agttctttga tagtaacaa
4681 aacaataaga gtgaaatagg gatagggtgat agtacattta ccaagatgga tggtaacta
4741 actggcgtag tatctactcc ccttggtaac cttatcaatg gccagggagc aactagtgat
4801 agtgatactg aaaaaattag ctttaaacct ggtaaccaga ttgactttaa taggttattc
4861 acctaccag taactgaact atttgatcct aacacgatgt ttgtctatga ccagtatgta
4921 cactattgg ttaacttacc tagtggcttt gatcaagctt caatccgctt aaagtaatt
4981 agttactcag tagaaaacca aaccttagga gttagattag agttcaaaga tccctaaacc
5041 caacagttta tcccggtact aaatgcatca agtacaggtc cccaaactgt ctttcaacc
5101 ttttaaccagt ggcagacta tgtcttacct ttgattgtaa ctgctctat agtagtgatt
5161 atccttagtg ttactttggg attaacgatt ggaattccaa tgcacagaaa caaaaaggca
5221 ttacaagcag gtttgatct tctaacaaa aaggttgatg tcttgaccaa agcagttggt
5281 agtgtcttta aagagatcat taacagaaca gggatctcta acgctcctaa gaagttaaaa
5341 caagctacca caaccaaac aactcctaaa accccaccaa aacctccagt aaaaataaa
5401 gatgaaaaca atgagaaaac agatttataa aaaagcatac tggttactat taccctttct
5461 accattagca ctagccaata ccttccttgt caaagaggat agtaagaatg ttactgctta
5521 ccccccttc gccaccccca tcaccgatcc taaaagtgat ctggttagtt tggcacaact
5581 tgattcttct tatcaaatcg ctgaccaaac catccataac accaacctgt ttgtgtgtt
5641 caagtctagg gatgtaaaag ttaagtatga gtcaagtggc agtaacaaca ttagttttga
5701 tccaactagt caaggtgaaa aacctccta tgtggtcgag tttactaact ctaccaacat
5761 tggcatcaag tgaacgatgg tgaaaaagta tcagttagat gtaccgaatg taagtagtga
5821 catgaaccaa gtactgaaaa atttaattct tgaacaacct ttgactaatg atacctaaa
5881 cagtagtttg gccaaagaga agggcaaaac gcaaaggag gtacatctgg gtagtgggca
5941 agcaaatcag tgaaccagtc aacgcaacca acatgacct aacaacaatc ccagtcccaa
6001 tgcttcaact gggtttaaac tcactaccgg caatgcatat agaaaactaa gtgagtcctg
6061 accaatttat gaaccaattg atgggaccaa gcagggcaaa ggaagggata gtagtgggtg
6121 gagttcaact gaagaaaacg aagctaaaaa tgatgcgcc agtgtttctg gagggggatc
6181 atcttctgga acatttaata aatacctcaa caccaagcaa gcgttagaga gcacgggat
6241 ctgttttgat gatcaaacc caagaaatgt tatcacccaa ctctattatg ctctactag
6301 caagctagca gtcaccaaca accaatgt cgtgatgggt aacagcttcc taccagcat
6361 gtggtactgg gtggtggagc ggagtgcaca ggaaaatgca agtaacaac ccacctggtt
6421 tgctaatacc aatttagact gaggagaaga caaacaaaa caatttggtg agaaccagtt
6481 ggggtataag gaaactacca gtaccaattc ccacaactc cattcfaat ctttaccaca
6541 acctgcatat ctgatcagtg gcattgacag tgtcaatgat caaatcatct tcagtggtt
6601 taagcgggg agtgtgggt gatcaacaac aactagctta gatagtaaaa cggggataa
6661 caagaccaa gcacttgctt cggggctaaa tggctccgat aatgggagtt tttcaatcca
6721 ggatcctagt accaacgaca cgggttattc ttccttattc ggggaatcat acaaatatg
6781 agacaccttc agctttgttg cagtgaaaaa agatcaaaaa tcaactgtca agatcaattc
6841 acccattaaa actgcttacc tgaatagtta tggggatgag gggattgggg tgtttgatgc
6901 tttgattaac gctacgcctt

FIGURA 3 (continuación)

```

6961 gttaggttta aactataact ttaaactctaa ccaagaacgt ttaccttcca gaactgatca
7021 gatctttggt tatgggattg tctcccctaa tgaattgcga agtgctaaaa gttctgctga
7081 ttcaactggg agtgatacaa aggtaaactg atcaaacacc caatcacggt acctccctgt
7141 tccctataac tattcagaag ggatcattga tgcagatgga tttaaagcgt ctgaaaacag
7201 gggtgctagt gtaactacct tctcagggct taaatcaatt gccctgatg gttttgctaa
7261 ctcaatagct aactttctcag ttgggttaaa agcaggaatt gatcctaacc cagtgatgag
7321 tggtaagaaa gctaactatg gagcggttgt gttaacacgg gggggtggtg ttagattaaa
7381 ctttaaccct ggtaatgatt cattgctttc aacaactgat aacaatatag cacctatctc
7441 cttctcattt actccgttca cagctgctga gagtgcggtg gatctcacta ccttcaaaga
7501 agttacctat aaccaagaat cagggttatg gagttatatac tttgacagct ccttaaaacc
7561 aagccatgat ggtaaacaaa ctctgtcac tgataacatg ggcttagtg ttatcactgt
7621 ctcaagaact ggcattgaac taaaccaaga ccaagctact acaactcttg atgtagcacc
7681 tagtgactca gcagtgcaat cagggatcca atctaccacc caaacctaa ctggagtact
7741 cccacttagt gaggaattca gtgcagttat tgctaaagat agtgatcaaa ataagattga
7801 tatctataaa aacaacaacg ggttggttga aattgatacc caactaagta atagtgttc
7861 caccaacaac ggtgggttag cacctagtta cacagaaaac agggttgatg catggggtaa
7921 agttgagttt gctgataaca gtgtattgca agcaagaaac ctagttgata aaactggtga
7981 tgagatcacc aataccctg aaatcttaaa ctcttcttt agattcacc ctgcttttga
8041 agatcaaaaa gctaccctg ttgctactaa gcaaagtgat acatcactta gtgtctcacc
8101 aaggatccag ttcttagatg gtaatttcta tgatcttaac tctaccatcg ctgggggtacc
8161 tttaaacatt ggtttccctt caagagtgtt tgctgggtt gcagcactcc ctgcatgggt
8221 gatccctgta tcagtaggtt cttcagttgg gatcttgttt atcttgtag tcttaggact
8281 tgggattggg atcccaatgt acagggtaag aaaactccaa gatgcatcgt ttgttaatgt
8341 ctttaaaaag gttgatacac tcacaactgc tgcggtagt gtgtacaaaa agattattac
8401 ccaaactggt gtggtgaaaa aagcacctag tgcattgaaa gctgctaate ctagtgttaa
8461 aaaacctgct gcttttttaa aaccacctgt tcaaccacca agtaaacctg aaggggaaca
8521 aaaagctgtt gaagttaagt cagaagaac caaaagttag ttttaacct ttcaataacc
8581 taaaacacaa tctttaaacc aaggttgtgt tttttgttt tttgtcactt ttcactaac
8641 ttgcaattta gagagtggat atgaaaagaa cagttaaaaa aataaaacct gaccacttgt
8701 ttaataaaaa gcagtggcac ttactgagtg aagagatcag tgataaccca atgattaagc

```

ID. SEC. nº 3 (gen Pa de MG; acceso M31431)

FIGURA 3 (fin)

```
1  gtgatcgcta  tcgtcggcat  tttggcggca  gtcgcccttc  ccgcctacca  agactacacc
61  gccgcgcgc  aagtttccga  agccatcctt  ttggccgaag  gtcaaaaatc  agccgtcacc
121 gagtattacc  tgaatcacgg  caaatggccg  gaaaacaaca  cttctgccgg  cgtggcatcc
181 tccccaccg  acatcaaagg  caaatatggt  aaagaggttg  aagttaaaaa  cggcgtcgtt
241 accgccacaa  tggcctcaag  caacgtaaac  aatgaaatca  aaggcaaaaa  actctccctg
301 tgggccaggc  gtgaaaacgg  ttcggtaaaa  tggttctgcg  gacagccggt  tacgcgcacc
361 gacgacgaca  ccgttgccga  cgccaaagac  ggcaaagaaa  tcgacaccaa  gcacctgccg
421 tcaacctgcc  gcgacaacaa  agatgccaaa  tga
```

ID. SEC. nº 4 (gen pile de NG; acceso AF042097)

FIGURA 4