

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 202**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07866534 .6**  
96 Fecha de presentación: **20.11.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2087134**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2009**

54 Título: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO Y DE SEGUIMIENTO DE UNA VAGINOSIS BACTERIANA MEDIANTE CUANTIFICACIÓN MOLECULAR.**

30 Prioridad:  
**24.11.2006 FR 0610313**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.12.2011**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE (AIX-  
MARSEILLE II)  
LES JARDIN DU PHARO 58 BOULEVARD  
CHARLES LIVON  
13284 MARSEILLE CÉDEX 07, FR**

72 Inventor/es:  
**BRETELLE, Florence;  
FENOLLAR, Florence;  
HENRY-MARY, Mireille;  
MENARD, Jean-Pierre y  
RAOULT, Didier**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 371 202 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

Método de diagnóstico y de seguimiento de una vaginosis bacteriana mediante cuantificación molecular.

5 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico y de seguimiento *in vitro* del estado de la flora bacteriana vaginal frente a la presencia de una vaginosis bacteriana (VB) o de su evolución, llegado el caso para el seguimiento de su asistencia terapéutica.

10 Las técnicas actuales de diagnóstico de la VB, que es una infección frecuente con unas consecuencias nefastas para el embarazo, se basan en unos criterios que son poco fiables. Algunas bacterias han sido descritas como asociadas a esta enfermedad, sin haberse beneficiado jamás de una calificación y de una cuantificación molecular fiable.

15 Durante mucho tiempo, la VB se ha definido desde el punto de vista microbiológico por una casi desaparición de la flora vaginal normal compuesta principalmente por lactobacilos en beneficio de otras bacterias, en particular *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp. y micoplasmas genitales [Spiegel CA, CMR 1991 ; Thorsen P, AJGO 1998]. La VB es un motivo frecuente de consulta médica, estando implicada en particular en la susceptibilidad a las infecciones sexualmente transmisibles tales como el VIH, y para los embarazos en la premadurez y el nacimiento de niños de bajo peso. Su prevalencia en la mujer, incluyendo durante el embarazo, se sitúa entre 8 y 23% [Guise JM, AJPM 2001] según los métodos actuales de investigación.

20 Sin embargo, el repaso de la bibliografía es divergente en cuanto al impacto de la asistencia terapéutica de esta patología. En efecto, los primeros estudios, que habían demostrado una reducción del riesgo de parto prematuro durante el tratamiento de la VB, no han podido ser confirmados [Morales HJ, AJOG 1994; Hauth JC, NEJM 1995; Guise JM, AJPM 2001; McDonald H, CDSR 2005; Varma R, EJOGRB 2006; Okun N, OG, 2005; Leitich H, AJOG 2003; Guerra B, EJOGRB 2006].

25 El objetivo inicial de la presente invención era evaluar el impacto de la VB durante el embarazo así como la eficacia de la asistencia terapéutica de la VB durante el embarazo. Pero, para ello, no estaba disponible ninguna herramienta de diagnóstico. En efecto, el estudio de la bibliografía revela una gran confusión en lo que se refiere a la asistencia terapéutica de la VB relacionada principalmente con la ausencia de herramienta racional para el diagnóstico y el seguimiento de esta patología.

30 Actualmente, las dos herramientas de diagnóstico disponibles son la puntuación de Nugent y los criterios de Amsel. La puntuación de Nugent es el método más mencionado habitualmente en la bibliografía, considerado por algunos como la técnica de referencia, incluso si no se realiza en rutina en los laboratorios de microbiología clínica debido a su carácter fastidioso de su realización [Fredricks DN, NEJM 2005; Thomason JL, AJOG 1992; Ison CA, STD 2002; Nugent RP, JCM 1991]. La puntuación de Nugent identifica la VB gracias a un análisis morfológico semi-cuantitativo de las bacterias después de la coloración de Gram. Por lo tanto, es una técnica subjetiva cuya reproducibilidad ha sido cuestionada [Sha BE, JCM 2005; Schwabe JR, OG 1996]. Los criterios clínicos de Amsel (pH vaginal superior a 4,5; leucorreas grisáceas homogéneas adherentes; olor nitrogenado después de la adición de KOH al 10%; presencia de clue-cells) representan el segundo enfoque de diagnóstico [Amsel R AJM 1983]. Al igual que la puntuación de Nugent, es de determinación delicada y no se utiliza en la práctica clínica habitual.

35 Uno de los límites más peyorativos de estos métodos diagnósticos es la ausencia de identificación de ciertos microorganismos implicados en la VB. Por un lado, la ausencia de pared de los micoplasmas no permite sus identificaciones mediante la coloración de Gram y por lo tanto sus cotizaciones mediante la puntuación de Nugent. Por otro lado, la aportación de la biología molecular ha permitido identificar nuevas bacterias que pueden estar implicadas en la VB pero su demostración mediante los 2 métodos diagnósticos existentes es imposible. *Atopobium vaginalae* es la principal nueva especie bacteriana caracterizada. Su presencia se correlaciona con la VB en algunos artículos sin por ello se haya realizado una apreciación cuantitativa fiable de su sitio relativo con respecto a los demás microorganismos [Bradshaw CS, JID 2006, Rodríguez JM, IJSB 1999; Ferris MJ, BMCID 2004; Ferris MJ, JCM 2004; Verhelst R, BMCM 2004].

40 En el artículo publicado recientemente por Bradshaw *et al.* [Bradshaw CS, JID 2006], se describe en particular una relación entre la detección de las bacterias *A. vaginalae* y *G. vaginalis* y la VB, pero estos resultados son insuficientes para realizar un diagnóstico de VB y/o un seguimiento de la evolución de una VB fiables. En efecto, los datos presentados en este estudio permiten la detección de dichas bacterias pero no su cuantificación real. Además, esta detección ha mostrado una buena sensibilidad, siendo *A. vaginalae* y *G. vaginalis* detectadas respectivamente en 96% y 99% de los pacientes que padecen VB. Sin embargo, su especificidad es mala puesto que *A. vaginalae* se detecta en 12% de los pacientes que presentan una flora normal y *G. vaginalis* en 60%.

45 Los autores han intentado entonces un enfoque denominado "semi-cuantitativo" clasificando las cargas bacterianas como bajas o elevadas mediante la comparación de los CT ("Cycle Threshold") medianos de detección de los microorganismos en el seno de todas las muestras analizadas. Así, los autores han estimado una carga mediana de  $4 \times 10^5$  copias para *G. vaginalis* (mediana que corresponde a 21 ciclos) y  $4 \times 10^6$  copias para *A. vaginalae* (mediana

de 18 ciclos). Las cargas elevadas de *G. vaginalis* ( $>4 \times 10^5$ ) y de *A. vaginae* ( $>4 \times 10^6$ ) estaban significativamente más presentes en los pacientes que presentan una VB con respecto a los pacientes con una flora normal. Sin embargo, estos valores presentaban una mala sensibilidad, siendo *A. vaginae* y *G. vaginalis* solamente detectadas respectivamente en 49% y 71% de los pacientes que padecen VB (tabla 1). Además, 16 pacientes (28%) con una recaída de VB después del tratamiento presentaban una concentración en *G. vaginalis* por debajo del umbral determinado (tabla 3). Cuarenta pacientes (70%) con una recaída de VB presentaban asimismo una concentración por debajo del umbral en *A. vaginae*.

El enfoque "semi-cuantitativo" de los autores no se puede aplicar por lo tanto como herramienta de diagnóstico y de seguimiento inmediato de los pacientes. De hecho, las técnicas utilizadas para obtener estos resultados eran insuficientes en varios puntos. En primer lugar, las técnicas de PCR no eran suficientemente sensibles puesto que las dianas moleculares amplificaban fragmentos demasiado largos (fragmento del ARN 16S ribosómico de 430 pares de bases para *A. vaginae* y de 291 pares de bases para *G. vaginalis*). En la actualidad, se establece que con una secuencia determinada durante una reacción de PCR tan larga, la sensibilidad es baja. Además, las técnicas de PCR en tiempo real utilizaban para la detección y la cuantificación un marcado en SybrGreen del producto de amplificación, método mucho menos específico que los que utilizan unas sondas de hidrólisis marcadas que necesitan una triple especificidad (dos cebadores más la sonda, para amplificar un fragmento cuyo tamaño no excede 120 pares de bases). Las cuantificaciones se efectúan aparentemente con un estándar variable y no en función de una gama plasmídica estable, reproducible y comparable a lo largo del tiempo. Por último, no se beneficiaban de una herramienta de control cuantitativo que permite juzgar la calidad de sus extracciones. En efecto, buscaba solamente la presencia de  $\beta$ -globina humana en las muestras sin cuantificarla. Por lo tanto, es muy difícil comparar cuantitativamente las muestras entre sí puesto que la variación de la cantidad de bacterias puede estar relacionada con una variación cualitativa y cuantitativa de secreciones vaginales extraídas.

La evaluación de la asistencia terapéutica de las VB no puede por lo tanto librarse de la implementación previa de una herramienta fiable adaptada al diagnóstico de la VB y al seguimiento cualitativo y cuantitativo de la flora vaginal.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método de diagnóstico y de seguimiento de la VB al mismo tiempo más fiable, más preciso y más simple de realizar en rutina en los laboratorios de análisis microbiológico clínico.

Para ello, los inventores han estudiado las extracciones vaginales de 204 mujeres embarazadas, y han buscado la presencia de cada microorganismo implicado en la VB, desarrollando un método de PCR en tiempo real que permite la detección del ADN específico de las bacterias y la determinación de la carga bacteriana por medio de una gama plasmídica establecida gracias a la construcción de un plásmido patrón. Este plásmido comprende los fragmentos de ADN específicos de dichas bacterias a amplificar y a cuantificar y del gen de la albúmina humana utilizado como control de la calidad de la muestra de ADN y de la amplificación molecular así como de la riqueza de la muestra biológica. Los microorganismos diana estudiados (*Lactobacillus sp.*, *G. vaginalis*, *Mobilincus curtisii*, *Mobilincus Mulieris*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *A. vaginae*, y *Candida albicans*) eran los descritos como que podían estar implicados en la VB y/o la premadurez. Los resultados de la cuantificación de los diversos microorganismos obtenidos mediante biología molecular han sido confrontados con la clasificación por la puntuación de Nugent.

Según la presente invención, se ha demostrado que la presencia de *A. vaginae* a partir de un cierto umbral de concentración puede estar asociada a una VB de manera muy específica y significativamente y que esta detección molecular hace que el diagnóstico resulte fácil y fiable.

La existencia de un umbral de concentración específica de la VB para la bacteria *G. vaginalis* ha sido demostrada asimismo según la presente invención.

Además, se ha demostrado que la asociación de las 2 bacterias a ciertas concentraciones permite el diagnóstico de VB en particular con una predictividad positiva superior a 95% y sobre todo una predictividad negativa superior a 99%.

Por otra parte, durante las VB, las bacterias del género *Lactobacillus sp.*, normalmente presentes en la vagina, presentan una concentración que va disminuyendo y se ha demostrado según la presente invención que por debajo de un cierto umbral de concentración la cuantificación de estas bacterias *Lactobacillus sp.* permite diagnosticar de manera fiable una VB. Por último, se ha demostrado que una evolución de las concentraciones de *Lactobacillus sp.* frente a la adición de las concentraciones de *A. vaginae* y *G. vaginalis* permite evaluar la evolución de la VB de manera fiable.

Más precisamente, la presente invención proporciona un método de diagnóstico y de seguimiento *in vitro* del estado de la flora bacteriana vaginal frente a la presencia de una vaginosis bacteriana y, llegado el caso, para el seguimiento de su tratamiento terapéutico, caracterizado porque

- 1/se cuantifican las concentraciones de bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis*

- 5 \* determinando las concentraciones de secuencias específicas de dichas bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* presentes en una sola copia en el ADN de dichas bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* respectivamente, y de una secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica que contiene células humanas, en el ADN extraído de una muestra de secreción vaginal de paciente, presentando dichas secuencias específicas un tamaño inferior a 150 nucleótidos,
- 10 \* mediante la co-amplificación enzimática de tipo PCR de dichas secuencias específicas contenidas, por un lado, en dicho ADN extraído de la muestra y, por otro lado, en unas muestras de fragmentos de ADN sintéticos comprendiendo cada una de dichas secuencias específicas dichas bacterias y dicha secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica de células humanas, sirviendo dichas muestras de estándar de calibrado de cuantificación del ADN,
- 15 \* realizándose la detección y la cuantificación de dichos fragmentos con la ayuda de sondas marcadas de secuencias distintas de las de los cebadores de amplificación para cada una de dichas secuencias específicas de dichas bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* y dicha secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica que contiene unas células humanas, y
- 20 \* siendo dichas secuencias específicas de dichas bacterias las secuencias siguientes, que incluyen unas secuencias de dichas sondas (subrayadas) flanqueadas por unas secuencias de dichos cebadores (en negrita) o sus secuencias complementarias:

25 - para *Atopobium vaginae*:

**Sec. n°2 = 5'-CCTATCCGCTCCTGATACCGGCAGGCTTGAGTCT**  
GGTAGGGGAAGATGGAATTCCAAGTGTGAAATGCGCAGATATTTGG  
 -3'

- para *Gardnerella vaginalis*:

**Sec. n°3 = 5'-GCATCTGCTAAGGATGTTGAAACATCGTTTAAGG**  
CTACTGCAACTATTTCTGCAGCAGATCCTGAAGTTGGCGAAAAGATT  
**GCTG-3'**,

- 30 y
- 35 - 2/se determina la presencia de una vaginosis bacteriana o el fracaso del tratamiento terapéutico en curso si las concentraciones de fragmentos de ADN de dichas dos secuencias específicas de las bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* respectivamente en una muestra de extracción de secreciones vaginales de paciente que contiene por lo menos  $10^4$  células humanas/ml, son tales que se respeta una por lo menos de las 2 condiciones a) y b) siguientes:

- 40 a) la concentración Ca en dicho fragmento de ADN de *Atopobium vaginae* es superior o igual a  $10^8$  copias/ml, y  
 b) la concentración Cg en dicho fragmento de ADN de *Gardnerella vaginalis* es superior o igual a  $10^9$  copias/ml.

45 Una concentración de bacteria *Atopobium vaginae* superior o igual al umbral de  $10^8$  permite detectar aproximadamente 90% de las vaginosis. La cuantificación de la bacteria *Gardnerella vaginalis* sirve como complemento en el caso en el que la concentración en *Atopobium vaginae* fuera inferior al umbral de  $10^8$  bacterias/ml, para detectar una vaginosis, puesto que el umbral de detección de *G. vaginalis* superior o igual a  $10^9$  bacterias/ml permitiría por sí mismo detectar únicamente aproximadamente la mitad de las vaginosis. Es por eso que, según la presente invención, es necesario cuantificar las concentraciones de ADN para las dos bacterias.

50 Por otra parte, se subraya que el desarrollo de una vaginosis bacteriana se confirma si las concentraciones Ca, Cg y Cl de por lo menos tres fragmentos de secuencias específicas presentes en una sola copia en el ADN de las bacterias *A. vaginae* (Ca), *G. vaginalis* (Cg) y respectivamente *Lactobacillus sp.* (Cl) en el ADN extraído de una muestra de secreción vaginal de paciente son tales que la relación de las concentraciones Cl/(Ca+Cg) disminuye entre las 2 muestras extraídas sucesivamente en el tiempo a intervalo de tiempo suficiente, preferentemente por lo menos 1 mes.

55 Se entiende en este caso por "desarrollo de una vaginosis" una agravación de una vaginosis ya detectada o, en algunos casos, un riesgo de aparición de una vaginosis, es decir de un desequilibrio o una anomalía de la flora vaginal que puede volverse patológica.

Asimismo, el fracaso del tratamiento en curso en función de las concentraciones de las secuencias específicas presentes en una sola copia en el ADN de las bacterias se confirma si la relación de las concentraciones  $CI/(Ca+Cg)$  disminuye o no aumenta entre las 2 muestras extraídas a intervalo de tiempo suficiente, preferentemente por lo menos 1 mes.

Más particularmente, se realiza un método en el que:

- a/en la etapa 1/, se cuantifican además las bacterias *Lactobacillus sp.* que comprenden por lo menos las bacterias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus iners*,

\* determinando además la concentración de una secuencia específica de dichas bacterias *Lactobacillus sp.*, estando dicha secuencia específica de los *Lactobacillus sp.* presente en una sola copia en el ADN de dichas bacterias *Lactobacillus sp.*, y de tamaño inferior a 150 nucleótidos,

\* mediante la co-amplificación enzimática de tipo PCR adicional de dicha secuencia específica de las bacterias *Lactobacillus sp.* contenida, por un lado, en dicho ADN extraído de la muestra y, por otro lado, en una muestra de fragmentos de ADN sintético que comprende, además, dicha secuencia específica de dichas bacterias *Lactobacillus sp.*, comprendiendo dicho fragmento de ADN sintético dicha secuencia específica de dichas bacterias *Lactobacillus sp.* que sirven de estándar de calibración de cuantificación,

\* siendo la detección y la cuantificación de dichos fragmentos realizadas con la ayuda de sondas marcadas de secuencias distintas de las de los cebadores de amplificación para cada una de dichas secuencias específicas de dichas bacterias *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus sp.* y dicha secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica que contiene unas células humanas, y

- b/en la etapa 2/, se determina una vaginosis bacteriana si, además, la concentración CI en fragmento de ADN específico de dichas bacterias *Lactobacillus sp.* es inferior o igual a  $10^8$  copias/ml, preferentemente inferior o igual a  $10^7$  copias/ml.

Según la presente invención, la concentración en bacterias del género *Lactobacillus sp.* no es suficiente para concluir la presencia de una vaginosis bacteriana, pero sirve de complemento o de confirmación en el caso en el que se reúnen las condiciones de concentraciones en *A. vaginae* y *G. vaginalis*.

Preferentemente, se determina una vaginosis bacteriana si dichas concentraciones son tales que se respetan las 3 condiciones siguientes:

a- concentración Ca en dicho fragmento de ADN de secuencia específica de *Atopobium vaginae* superior o igual a  $10^8$  copias/ml,

b- concentración Cg en dicho fragmento de ADN de secuencia específica de *Gardnerella vaginalis* superior o igual a  $10^9$  copias/ml,

c- concentración CI en dicho fragmento de ADN de secuencia específica de *Lactobacillus sp.* inferior o igual a  $10^7$  copias/ml,

Ventajosamente, dichas concentraciones Ca, Cg o CI se determinan mediante amplificación enzimática de tipo PCR en tiempo real y cuantificación del ADN de dichos fragmentos de ADN de secuencias específicas de las bacterias respectivamente *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* y, llegado el caso, *Lactobacillus sp.*, así como, preferentemente, de un fragmento de ADN humano presente en cualquier extracción biológica humana que contiene unas células.

Preferentemente, dichas secuencias específicas respectivamente de dichas bacterias *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* y, llegado el caso, *Lactobacillus sp.* presentan un tamaño de 70 a 150 nucleótidos, preferentemente de 90 a 120 nucleótidos.

Más preferentemente, se realizan unas reacciones de amplificación y cuantificación mediante PCR en tiempo real, utilizando unas sondas de hidrólisis específicas respectivamente de cada una de dichas secuencias específicas de dichas bacterias y secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica que contiene unas células humanas, en la muestra a ensayar.

La técnica de PCR en tiempo real consiste en una PCR clásica que utiliza unos cebadores de secuencia directa e inversa, y que comprende una detección del producto amplificado basada en la medición de la emisión de fluorescencia proporcional a la cantidad de genes amplificados con una sonda denominada de "hidrólisis". Para ello,

dicha sonda está marcada por un emisor de fluorescencia o fluoróforo en dirección 5' y un agente que bloquea la emisión de fluorescencia en dirección 3'. Este agente bloqueante absorbe la fluorescencia emitida cuando el fluoróforo y el agente bloqueante están cerca. Cuando el fluoróforo y el agente bloqueante se separan, la emisión de fluorescencia ya no es absorbida por el agente bloqueante. Durante su paso, la Taq polimerasa arrastra una hidrólisis de la sonda y por lo tanto una liberación de los nucleótidos y del fluoróforo en disolución. La emisión de fluorescencia será por lo tanto proporcional al número de amplificado. El principio de la PCR en tiempo real se basa en la capacidad de la Taq polimerasa durante la etapa de elongación para hidrolizar una sonda hibridada sobre el ADN a copiar, permitiendo esta hidrólisis la emisión de fluorescencia, la cual permite una cuantificación. Durante la misma reacción, se pueden cuantificar dos dianas diferentes, introduciendo en la mezcla de reacción dos cebadores y una sonda dirigidos contra una primera diana, y otros dos cebadores y sonda dirigidos contra la otra diana. Las dos sondas están marcadas con unos fluoróforos diferentes.

Más preferentemente, se utiliza un gran fragmento sintético de ADN que sirve de estándar de calibración de cuantificación del ADN, agrupando dicho gran fragmento de ADN sintético dichas secuencias específicas respectivamente de cada una de dichas bacterias cuyas concentraciones son cuantificadas, y dicha secuencia de ADN humano específico de células humanas. La presencia de varias dianas moleculares en un mismo fragmento nucleico permite cuantificar unas dianas diferentes en una misma muestra y co-cuantificarlas de manera homogénea, permitiendo la cuantificación utilizando la misma gama de calibración de varias especies moleculares la comparación de la eficacia de las diferentes reacciones de PCR entre sí y de una determinación a la otra a lo largo del tiempo y evita los sesgos relacionados con el control positivo.

Se entiende por "secuencia específica de dicha bacteria" una secuencia del genoma de dicha bacteria que no se encuentra en ningún otro genoma de organismo vivo.

Se entiende por "fragmento de ADN", un fragmento de ADN u oligonucleótido cuyas secuencias se escriben a continuación en el sentido 5'→3'.

Más particularmente, dichas secuencias específicas de dichas bacterias comprenden:

- para la bacteria *Atopobium vaginae*: el fragmento de las posiciones 248 a 334 del gen ARN 16S ribosomal de referencia Genebank AY 738658.1,
- para la bacteria *Gardnerella vaginalis*: el fragmento de las posiciones 981 a 1072 del gen *Cpn 60* de la proteína protectora de 60 kDa de referencia Genebank AF 240579.3, y
- para la bacteria *Lactobacillus sp.*: una secuencia común a las bacterias *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus ineri* y *Lactobacillus acidophilus* en el seno del gen *tuf* que codifica para el factor de elongación en las posiciones 253 a 343 del gen de referencia Genebank AY 562191.1.

Más particularmente todavía, dichas secuencias específicas de dichas bacterias son las secuencias siguientes que incluyen unas secuencias sondas (subrayadas) flanqueadas por unas secuencias cebadores (en negrita) o sus secuencias inversas y complementarias para los cebadores antisentido:

- para *Atopobium vaginae*:

**Sec. n°2 = 5'-CCCTATCCGCTCCTGATACCGGCAGGCTTGAGT**  
**CTGGTAGGGGAAGATGGAATTCCAAGTGTGAAATGCGCAGATATT**  
**TGG-3'**

- para *Gardnerella vaginalis*:

**Sec. n°3 = 5'-CGCATCTGCTAAGGATGTTGAAACATCGTTTAA**  
**GGCTACTGCAACTATTTCTGCAGCAGATCCTGAAGTTGGCGAAAAG**  
**ATTGCTG-3'**

- para *Lactobacillus sp.*

**Sec. n°4 = 5'-TACATCCCAACTCCAGAACGTGATACTGACAAGC**  
**CATTCTTAATGCAGTTGAAGACGTATTTACTATCACTGGTCGTGGTA**  
**CTGTTGCTT-3'**

Ventajosamente, se realiza además la cuantificación de las células humanas presentes en dicha muestra, en particular en el ADN obtenido a partir de la extracción vaginal a ensayar, a título de control de la riqueza de la extracción, de la calidad de la extracción del ADN, y de la presencia potencial de inhibidores de la reacción de PCR. Para ello, se cuantifica el número de copias de un gen humano presente en cualquier extracción biológica humana que contiene unas células, en particular el número de copias del gen de albúmina humana. La cuantificación del gen de albúmina humana sirve así de control interno para demostrar la calidad y la riqueza de la muestra. Además, durante el seguimiento de los pacientes, esta cuantificación es un medio de normalización entre dos muestras extraídas en tiempos diferentes. En efecto, el cálculo del número de microorganismos por millones de células humanas permite una comparación intercambiadora rigurosa. El gen de la albúmina está presente únicamente en 2 copias en las células humanas y la medición de la señal de esta secuencia permite por lo tanto la cuantificación del número de células humanas iniciales en la extracción. Una cantidad de células inferior o igual a 50 para 5 µl de muestra (10<sup>4</sup> células/ml), es decir una cantidad de ADN de albúmina inferior o igual a 10<sup>2</sup>/5 µl, lleva a rechazar la extracción debido a una cantidad insuficiente.

Debido a la variabilidad de la calidad de la extracción, del transporte y de la conservación, la presente invención contiene así un control molecular de calidad que permite una sistematización del diagnóstico con una cuantificación fiable.

La cuantificación de las células permite asimismo detectar la ausencia de los limitadores de la reacción de PCR. En efecto, cuando la muestra se ensaya mediante PCR a diferentes diluciones, la cantidad de albúmina detectada aumenta cuando se aumentan las diluciones en presencia de los limitadores, mientras que disminuye cuando se aumentan las diluciones en ausencia de los limitadores de reacción PCR.

Más particularmente, se realiza además la cuantificación del ADN humano contenido en dicha muestra, y dicho gran fragmento de ADN comprende además una secuencia específica de ADN humano en la muestra a ensayar tal como una secuencia específica de la albúmina.

Aún más particularmente, dicha secuencia específica de ADN humano en la muestra a ensayar comprende el fragmento de las posiciones 16283-16423 del exón 12 del gen de la albúmina humana de referencia Genebank M12523.1 de secuencia del listado de secuencias siguiente o de la secuencia complementaria:

Sec. n<sup>o</sup> 1 = 5'-**GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGTTTAAGAGTAATATTGCAAAACCTGTCATGCCACACAAATCTCTCCCTGGCATTGTTGCTTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGAACCAGCAGCTCCCATGAGTTT**-3', preferentemente una secuencia Sec. n<sup>o</sup> 1 modificada por inserción de un sitio de escisión, en particular el sitio XhoI (secuencia rayada entre paréntesis) fuera de las secuencias que corresponden a los cebadores (secuencias en negrita) y secuencia sonda (secuencia subrayada) tal como la secuencia Sec. n<sup>o</sup> 17.

Más ventajosamente, se realizan unas reacciones de amplificación y de cuantificación utilizando unos cebadores y unas sondas de hidrólisis específicos de cada una de las diferentes bacterias denominadas secuencias específicas de cada una de dichas bacterias a ensayar y, llegado el caso, de una secuencia específica de ADN humano en la muestra a ensayar, tal como una secuencia específica de la albúmina humana, y dicha secuencia específica comprende una secuencia sonda flanqueada por unas secuencias aptas para servir como cebador en una reacción de amplificación del tipo PCR de dichas secuencias específicas.

Se entiende en este caso por "sonda" un oligonucleótido, más preferentemente de 20 a 30 nucleótidos, que se hibrida específicamente con dicha secuencia específica y que permite por lo tanto detectarla y cuantificarla de manera específica gracias a la medición del incremento de la fluorescencia relacionada de la reacción de PCR.

La sonda permite detectar el ADN específico amplificado y cuantificarlo mediante la comparación de la intensidad de la señal con la del estándar de cuantificación.

Se entiende en este caso por "cebador" un oligonucleótido preferentemente de 15 a 25 nucleótidos que se hibrida de manera específica con uno de los 2 extremos de la secuencia que el ADN polimerasa amplificará en la reacción de PCR.

Más particularmente, se utilizan los juegos de cebadores y de sondas seleccionados, llegado el caso, de entre las secuencias siguientes del listado de secuencias adjunto a la presente descripción, o respectivamente sus secuencias complementarias:

- para *Atopobium vaginae*:

Cebador 5': Sec. n<sup>o</sup> 5 = 5'-CCCTATCCGCTCCTGATACC-3'

Cebador 3': Sec. n<sup>o</sup> 6 = 5'-CCAAATATCTGCGCATTTC-3'

Sonda: Sec. n<sup>o</sup> 7 = 5'-GCAGGCTTGAGTCTGGTAGGGGA-3'

## ES 2 371 202 T3

- para *Gardnerella vaginalis*:

Cebador 5': Sec. n° 8 = 5'-CGCATCTGCTAAGGATGTTG-3'

Cebador 3': Sec. n° 9 = 5'-CAGCAATCTTTTCGCCAACT-3'

5 Sonda: Sec. n° 10 = 5'-TGCAACTATTTCTGCAGCAGATCC-3'

- para *Lactobacillus sp.*:

Cebador 5': Sec. n° 11 = 5'-TACATCCCAACTCCAGAACG-3'

10 Cebador 3': Sec. n° 12 = 5'-AAGCAACAGTACCCACGACCA-3'

Sonda: Sec. n° 13 = 5'-TGACAAGCCATTCTTAATGCA-3'

- para la albúmina humana:

15 Cebador 5': Sec. n° 14 = 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'

Cebador 3': Sec. n° 15 = 3'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3'

Sonda: Sec. n° 16 = 5'-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-3'

20 Preferentemente, dicho gran fragmento de ADN sintético constitutivo del ADN de la muestra estándar de calibrado de la cuantificación se inserta en un plásmido.

25 En estos métodos de cuantificación de ADN, es importante saber si una reacción positiva no se debe a una contaminación por el plásmido recombinante utilizado como estándar de cuantificación o como control positivo. Para resolver este problema, un sitio de corte por una enzima de restricción se introduce ventajosamente en por lo menos una de las dianas moleculares sintéticas. Este sitio está ausente en la secuencia natural. Por lo tanto, mediante corte enzimático y análisis del fragmento amplificado sobre gel de agarosa, o utilizando una sonda de PCR en tiempo real que reconoce específicamente el sitio de restricción, se puede así detectar la presencia eventual del plásmido contaminante.

30 Así, se pueden realizar más particularmente las etapas siguientes, en las que:

35 1- se realiza una reacción de amplificación enzimática de tipo PCR del ADN de por lo menos dicha secuencia específica de por lo menos uno de dichos agentes, en el ADN extraído de dichas muestras a ensayar y en el ADN de la muestra estándar de calibrado, con la ayuda de por lo menos un juego de cebadores apto para amplificar al mismo tiempo dicha secuencia específica auténtica y dicha secuencia específica modificada,

2- se verifica si los amplificados eventuales del ADN extraído de dichas muestras a ensayar comprenden dicha secuencia específica, y

40 3- se detectan los falsos positivos eventuales que proceden de contaminaciones eventuales de dichas muestras a ensayar por el ADN que procede de la muestra de estándar de calibrado, mediante por lo menos una de las etapas siguientes:

45 -3a- se realiza una digestión enzimática del producto de PCR obtenido con una enzima que corresponde al sitio de escisión y análisis sobre gel de agarosa del producto de digestión en comparación con el producto de PCR no digerido por la enzima de restricción.

50 Si el fragmento digerido procede de la amplificación de la diana molecular insertada en el plásmido control, contiene el sitio de restricción, y será de un tamaño inferior al fragmento no digerido.

-3b- se realiza una reacción de tipo PCR en tiempo real con unos cebadores directos e inversos de una de las dianas moleculares, y una sonda específica de dicha secuencia exógena que contiene el sitio de restricción.

55 Sólo un fragmento que procede del plásmido control y que contiene la secuencia exógena podrá ser amplificado.

Más particularmente, se utiliza dicha secuencia específica de ADN humano en la muestra a ensayar que comprende el fragmento de las posiciones 16283-16423 del exón 12 del gen de la albúmina humana de referencia Genebank M12523.1 modificada mediante inserción de un sitio de escisión, en particular el sitio XhoI, fuera de las secuencias que corresponden a los cebadores (secuencias en negrita) y secuencia sonda (secuencia subrayada) de secuencia del listado de secuencias siguiente:

60 Sec. n° 17 = 5'-**GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGT**(CTCGAG)TTAAGAGTAATATTGCAAAAC**CCTGTCA**  
TGCCACACAAATCTCTCCCTGGCATTGTTGTCTTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGA**ACCAGCAGCTCCCATGAG**  
**TTT**-3', que comprende el sitio XhoI (entre paréntesis) fuera de las secuencias que corresponden a los cebadores  
65 (secuencias en negrita) y secuencia sonda (secuencia subrayada).



Más ventajosamente, se utiliza una pluralidad de reacciones de amplificaciones enzimáticas PCR simultáneas o no de cada una de dichas secuencias específicas de dichas bacterias con el mismo gran fragmento de ADN sintético patrón, con la ayuda de una pluralidad de diferentes juegos de cebadores específicos de cada una de las diferentes denominadas secuencias específicas de cada una de dichas bacterias, no cruzándose las secuencias de los diferentes cebadores entre dichas diferentes bacterias y pudiendo dichos cebadores ser utilizados en una reacción de amplificación enzimática realizada según el mismo protocolo y, en particular, a la misma temperatura de hibridación.

Se conocen diferentes métodos para construir un gran fragmento de ADN quimérico que combina varios fragmentos, en particular de orígenes diversos, en particular el método descrito en el documento FR 2 882 063 en el que se prepara un gran primer fragmento de ADN sintético bicatenario de secuencia determinada que comprende una cadena en un orden determinado de una pluralidad de n segundos pequeños fragmentos de ADN sintéticos contiguos, que consiste esencialmente en la dimerización de una pluralidad de n oligonucleótidos mediante amplificación enzimática con la ayuda de una enzima polimerasa termorresistente que comprende:

- una primera etapa de reacción de amplificación de ácidos nucleicos de tipo PCR en presencia de dicha enzima polimerasa, de una serie de n oligonucleótidos de secuencias determinadas, sin cebadores exógenos, que comprende una serie de ciclos en unas condiciones de temperaturas que permiten la hibridación de dichos oligonucleótidos, seguida de una elongación del complejo obtenido, destinada a poner extremo con extremo en un orden determinado dichos oligonucleótidos, correspondiendo las secuencias de dichos oligonucleótidos sucesiva y alternativamente a las secuencias sentido y antisentido de dichos diferentes segundos fragmentos sintéticos, y conteniendo cada dicho oligonucleótido en sus regiones 5' y 3' unas secuencias complementarias de las de los oligonucleótidos siguiente y anterior, llegado el caso, y
- una segunda etapa de amplificación con la ayuda de cebadores específicos de los extremos 5' y 3' de dicha hebra directa de dicho gran primer fragmento sintético a preparar, permitiendo producir unas copias idénticas de dicho gran primer fragmento.

Esta técnica se basa por lo tanto en la utilización y en el control de un artefacto de la PCR, que consiste en la hibridación de los cebadores entre sí (dimerización de los cebadores). Este fenómeno se observa en el caso en el que las condiciones de PCR, en particular de temperatura, están mal adaptadas, y en el que los cebadores contienen unas secuencias parcialmente complementarias.

La técnica de construcción consiste por lo tanto, a partir de las secuencias dianas, en seleccionar las secuencias de los oligonucleótidos, con una alternancia de oligonucleótidos de secuencias directas ("sentido") o inversas (también denominadas "reversas" o "antisentido"). Con el fin de hacer posible la puesta extremo con extremo de estos oligonucleótidos, se procura introducir en dirección 3' de la secuencia de un oligonucleótido una secuencia nucleotídica complementaria de los primeros nucleótidos del oligonucleótido siguiente. Estos oligonucleótidos se hibridarán por sus partes complementarias, y gracias a la actividad polimerásica, por ejemplo de la Taq polimerasa, se realiza una síntesis de 5' en 3' con el fin de obtener unos fragmentos bicatenarios. El fragmento final (ensamblado) se sintetiza mediante PCR utilizando un par de cebadores directo e inverso que corresponden a las secuencias de los extremos del primer gran fragmento de ADN sintético bicatenario deseado.

Tal como se ha mencionado anteriormente, ventajosamente, dichos grandes fragmentos de ADN sintéticos, están ventajosamente insertados en un plásmido.

Esta técnica de construcción genérica de un fragmento nucleotídico sintético permite la puesta en contigüidad de varias dianas moleculares de interés. Se trata de un método simple de realizar, rápido y fiable, y que no necesita un equipamiento pesado y costoso.

La presente invención tiene asimismo por objeto un estuche de diagnóstico útil para la realización de un método de diagnóstico y de seguimiento de una vaginosis según la invención, caracterizado porque comprende:

- unas muestras de ADN estándar de calibrado a una concentración conocida que comprende dichas secuencias específicas de cada una de dichas bacterias tales como se han definido anteriormente, y preferentemente dicha secuencia específica del ADN humano tal como la definida anteriormente, y más preferentemente dicho gran fragmento de ADN sintético que agrupa dichas secuencias específicas de cada una de dichas bacterias tales como las definidas anteriormente, y preferentemente dicha secuencia específica del ADN humano tal como la definida anteriormente, así como
- dichos juegos de cebadores específicos de dichos fragmentos de ADN sintéticos modificados específicos de dichas bacterias y más preferentemente, dichas sondas tales como las definidas anteriormente, y
- unos agentes reactivos de realización de una reacción de amplificación de ADN de tipo PCR.

Otras características de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción

detallada siguiente de diferentes ejemplos de realización haciendo referencia al listado de secuencias y a las figuras 1 a 4, en las que:

- 5 - la figura 1A representa el análisis de las cargas microbianas de 20 vaginosis bacterianas definidas por la puntuación de Nugent cuantificadas mediante PCR en tiempo real según la presente invención.
- la figura 1B representa el análisis de las cargas microbianas de 167 floras normales definidas por la puntuación de Nugent cuantificadas mediante PCR en tiempo real según la presente invención.
- 10 - la figura 2 representa el análisis de las cargas microbianas de 44 floras intermedias identificadas por la puntuación de Nugent cuantificadas mediante PCR en tiempo real según la presente invención.
- la figura 3 muestra 25 vaginosis bacterianas identificadas sobre unos criterios moleculares y cuantificadas según la presente invención a partir del grupo de las 44 floras intermedias definidas por la puntuación de Nugent.
- 15 - la figura 4 presenta 19 floras normales identificadas sobre unos criterios moleculares y cuantificadas según la presente invención después de la aplicación de los criterios moleculares de la vaginosis bacteriana al grupo de las 44 floras intermedias identificadas por la puntuación de Nugent.

## 20 I. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

### I.1 Realización y transporte de las extracciones vaginales

25 Las mujeres embarazadas, con seguimiento de su embarazo, han sido reclutadas en el hospital de La Conception en Marsella. Un consentimiento informado es la condición necesaria para la inclusión. Las extracciones han sido realizadas a nivel de la cavidad vaginal posterior bajo el espéculo estéril no lubricado y sin antiséptico. Se han realizado cuatro extracciones para cada mujer: dos extracciones mediante legra de algodón en tubo seco (Copan innovation<sup>®</sup>, Brescia, Italia) y dos extracciones mediante citocepillo (Scrienet<sup>®</sup> 5,5 mm, laboratoire C.C.D. international, Paris, Francia). Se utiliza una legra de algodón estándar para el estado fresco y el cultivo bacteriano. Se dispone 30 una segunda en un medio de transporte específico (R1 Urée-Arginine LYO 2, BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Francia) para la búsqueda de los micoplasmas genitales (*M. bominis* y *M. urealyticum*). Se utiliza un citocepillo para el esparcido sobre la lámina y coloración de Gram. Un segundo para la extracción del ADN con fines de cuantificación mediante amplificación molecular se transporta en 500 µl de medio de transporte MEM (Minimum Essential Médium, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Se congela a -80°C desde que llega al laboratorio hasta su 35 utilización.

### I.2 Análisis bacteriológico

#### I.2.1. Estado fresco

40 La búsqueda de *Trichomonas vaginalis* se realiza mediante un examen en el estado fresco entre lámina y portaobjetos en el microscopio óptico (objetivo 10x).

#### 1.2. Puntuación de Nugent:

##### 45 I.2.2.1 La coloración de Gram:

Después del esparcido de la extracción sobre la lámina de vidrio y del secado, la coloración de Gram comprende: 50 una coloración con cristal violeta oxalato (1 minuto), una coloración con líquido de Lugol (1 minuto), una decoloración con alcohol/acetona y coloración con safranina en disolución (BioMérieux). Cada etapa está seguida de un lavado con agua. La coloración de Gram permite establecer la puntuación de Nugent según una evaluación semi-cuantitativa de 3 morfotipos bacterianos (tabla 1). En función de la puntuación, se identifican tres floras vaginales: una flora normal (FN) para una puntuación de 0 a 3, una flora intermedia (FI) para una puntuación de 4 a 6 y una VB para una puntuación superior a 7.

##### 55 I.2.2.2 Cultivo

Las extracciones vaginales son inoculadas sobre 3 medios de cultivo: la gelosa Columbia ANC más 5% de sangre de oveja (BioMérieux), la gelosa Chocolat Poly Vitex PVX (BioMérieux), la gelosa CHOC VCAT (BioMérieux) 60 incubadas a 37°C durante 48 horas. Para la búsqueda de los micoplasmas, las extracciones son inoculadas sobre un kit específico (Urée-Arginine LYO 2, BioMérieux) y después se incuban a 37°C y se inoculan sobre medios de cultivo anaeróbico (BioMérieux) durante 48 horas.

#### 65 1.3. Detección y cuantificación mediante PCR en tiempo real:

##### I.3.1. Extracción del ADN

La extracción del ADN utiliza el kit «QIAmp® DNA Mini Kit » (Qiagen®, Courtaboeuf, Francia). El protocolo se modifica de la manera siguiente: incubación durante 12 horas a 56°C de 200 µl de muestra para 200 µl de tampón de lisis y 20 µl de proteinasa K. El lisado se trata según las recomendaciones del fabricante. El ADN se eluye en 100 µl de tampón de elución y después se almacena a -20°C.

### 1.3.2 Realización de las PCR en tiempo real

#### 1.3.2.1 Selección de las dianas moleculares

El análisis de los datos de la bibliografía, y de las secuencias depositadas en el sitio «GenBank» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) permite conocer las secuencias disponibles para cada uno de los microorganismos dianas. La especificidad de los cebadores, de las sondas y de los fragmentos de las secuencias dianas de cada uno de los microorganismos seleccionados se ensayan para su especificidad en la página Internet NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Los inventores han seleccionado unas dianas en todos los agentes potenciales de vaginosis, incluyendo unos agentes con un papel incierto. De manera sorprendente, la diana más significativa *Atopobium vaginae* no estaba considerada como un agente esencial.

Las dianas elegidas están localizadas en la secuencia del gen que codifica para la proteína protectora de 60 kDa (*Cpn60*) para *G. vaginalis* y *M. curtisii*, en la del ARN 16S para *M. mulieris* y *A. vaginae*, el gen *fts Y* para *M. bominis*, en la de la ureasa para *U. urealyticum*, el gen de la topoisomerasa III para *C. albicans*. Para la diana de *Lactobacillus sp.*, se selecciona una secuencia común a: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus acidophilus*, está situada en el gen que codifica para el factor de elongación *tu (tuf)*. Una secuencia situada en el exón 12 del gen de la albúmina humana se selecciona con el fin de demostrar la presencia y la cantidad de ADN en la muestra ensayada.

#### 1.3.2.2 Selección de las sondas y de los cebadores

Para cada microorganismo estudiado (*Lactobacillus sp.*, *G. vaginalis*, *M. curtisii*, *M. mulieris*, *U. urealyticum*, *M. bominis*, *A. vaginae*, *C. albicans*) y la albúmina humana, se seleccionan una sonda, un par de cebador sentido y antisentido en las secuencias dianas definidas anteriormente utilizando el programa Primer 3® ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)). Los cebadores y las sondas están descritos en el anexo 1 siguiente. Cada cebador y sonda están analizados en la página Internet NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para asegurarse de su especificidad *in silico* (Anexo 1).

Con el fin de realizar unas PCR en tiempos reales en doble reconocimiento (PCD dúplex) se seleccionan arbitrariamente unos pares de reconocimiento de microorganismos: estando una de las sondas marcada FAM y estando la otra marcada VIC. Se definen así cuatro pares de PCR.

- *Lactobacillus sp.* (FAM) y *G. vaginalis* (VIC)
- *M. curtisii* (FAM) y *M. mulieris* (VIC)
- *U. urealyticum* (VIC) y albúmina humana (FAM)
- *A. vaginae* (VIC) y *C. albicans* (FAM)
- *Mycoplasma bominis* (FAM) se cuantificará solo.

Los cebadores están sintetizados por Eurogentec® (Seraing, Bélgica), y las sondas por Applied Biosystems (Warrington, Cheshire, UK).

#### 1.3.2.3 Ensayo de especificidad frente a las diferentes cepas ensayadas

Con el fin de ensayar la especificidad de los cebadores y de las sondas, el ADN extraído de cepas bacterianas de referencia (*L. acidophilus* CIP 104464, *A. vaginae* CIP 106431, *G. vaginalis* CIP 103660, *M. curtisii* subsp. *bolmesii* ATCC 35242, *M. mulieris* ATCC 35239, *C. albicans* UMIP 1180.79, *U. urealyticum* CIP 103755 y *M. bominis* CIP 103715) se utiliza a tres diluciones ((1/10<sup>a</sup>, 1/100<sup>a</sup>, 1/1000<sup>a</sup>) para la puesta a punto de las PCR en tiempo real (determinación de las cantidades relativas de cebadores y de sondas, de las especificidades, de las reactividades cruzadas). Cada cepa se ensaya con los cebadores y la sonda específica pero también con las sondas y los cebadores de los otros 7 microorganismos y las de la albúmina humana.

#### 1.3.2.4 Puesta a punto de las PCR dúplex

Se han medido los valores de CT ("ciclo threshold"). Se trata del punto de intersección entre la línea de base de la reacción y la curva logarítmica de la representación de la amplificación. Este valor de CT corresponde al número de ciclo de amplificación necesario para que comience la amplificación. Está en relación con la concentración del producto nucleico a cuantificar, a saber cuanto más bajo es el CT, más elevada es la concentración.

Las cantidades de cebadores y de sondas necesarios para la obtención de una amplificación óptima en simple y en doble fluorescencia están definidas ensayando las reacciones de amplificación en una mezcla de ADN bacteriano de las 8 cepas de referencia en equimolaridad, así como con las cepas puras, para una concentración final a  $1/10^3$  en los dos casos. Las condiciones experimentales consideradas son aquéllas para las cuales los valores de CT son idénticos a los obtenidos en simple fluorescencia.

#### I.3.2.5 Ensayo de especificidad frente a 40 cepas no ensayadas:

Las muestras de ADN genómico procedentes de 40 cepas bacterianas diferentes (Anexo) diferentes de las 8 cepas bacterianas de referencia se ensayan en dilución a  $1/10^3$ . El conjunto de estos ensayos se efectúa teniendo cuidado de introducir durante cada reacción de amplificación unos controles negativos que no contienen ningún ADN o unos controles positivos (mezcla del ADN de las 8 cepas de referencia). La especificidad se ensaya con los cuatro pares de PCR en tiempo real así como *Mycoplasma bovinis*.

#### I.4 Construcción del plásmido

Se ha utilizado el método de preparación descrito en el documento FR 2 882 063.

##### 1.4.1 Secuencia del fragmento híbrido de cuantificación:

La secuencia nucleotídica del fragmento híbrido de cuantificación se obtiene alineando las secuencias dianas de las PCR en tiempo real para los 8 microorganismos así como las de la albúmina humana. Se obtiene un fragmento híbrido de 931 pares de bases descrito en el Anexo 2 siguiente.

##### 1.4.2 Secuencias de los oligonucleótidos de construcción del fragmento híbrido de cuantificación:

La secuencia del fragmento nucleotídico híbrido se divide en 6 fragmentos de oligonucleótidos consecutivos descritos en el Anexo 3. Con el fin de asegurar la continuidad de los oligonucleótidos adyacentes, se añaden 10 nucleótidos complementarios del extremo 3' en el oligonucleótido de corriente arriba en el extremo 5' del oligonucleótido de corriente abajo. Los tamaños de las 6 secuencias oligonucleotídicas se escalonan de 155 a 172 nucleótidos. Los oligonucleótidos consecutivos están alternativamente en secuencia directa y reversa. Así, los oligonucleótidos 1, 3 y 5 se utilizan en forma de secuencia directa, mientras que los oligonucleótidos 2, 4 y 6 se utilizan en secuencia reversa. Se sintetizarán unos cebadores denominados de construcción (sentido y antisentido) cuyas secuencias corresponden a las de los 20 nucleótidos en dirección 5' y en dirección 3' del fragmento híbrido de cuantificación. Los oligonucleótidos y los cebadores son sintetizados por Eurogentec®.

##### I.4.3 Construcción del fragmento híbrido:

El fragmento nucleotídico bicatenario se construye mediante reacción de amplificación gracias a la complementariedad de los extremos de dos oligonucleótidos adyacentes. Se necesitan dos PCR sucesivas.

###### I.4.3.1 Primera PCR:

Permite la hibridación de los oligonucleótidos por sus extremos y una elongación parcial cuando es compatible con la actividad de la Taq polimerasa. Los 6 oligonucleótidos son introducidos en equimolaridad (0,2 mMol), con tampón de polimerasa 1 X MgCl<sub>2</sub> (1,5 mMol), los dNTP (0,2 mMol), 0,2 µl de Taq Roche (Roche®) a 5 UI/µl, en un volumen de reacción de 50 µl. El programa de amplificación es: 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos que comprenden 94°C durante 30 s (desnaturalización), 37°C durante 1 minuto (hibridación), 72°C durante 1 minuto y 30 s (elongación).

###### I.4.3.2 Segunda PCR:

Permite obtener un fragmento de PCR que contiene extremo con extremo los motivos de oligonucleótidos esperados (Anexo 4). Se añade un µl de producto de amplificación de la primera PCR a la mezcla de reacción siguiente: tampón de polimerasa Hotstar (Qiagen®) 1 X MgCl<sub>2</sub> (1,5 mMol), los dNTP (0,2 mmol), 0,2 µl de Hotstar (Qiagen®) a 5 UI/µl, 0,2 mMol de los cebadores de construcción sentido y antisentido. El programa de PCR es: 95°C durante 15 minutos, seguido de 95°C durante 30 s, 58°C durante 45 s, 72°C durante 2 minutos 40 ciclos, 72°C durante 5 minutos. El fragmento de PCR obtenido se analiza sobre gel BET Agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X. Si el tamaño del fragmento está de acuerdo con el tamaño esperado, se purifica utilizando el kit QIAquick® PCR Purification Kit 250 PCR QiaKit (Qiagen®).

###### I.4.3.3 Clonación del inserto

Se introducen dos µl del fragmento obtenido anteriormente en una mezcla de reacción de ligación que contiene 5 µl de tampón de ligasa, 1 µl de ligasa y 1 µl de plásmido PGEM (kit pGEM®-T Easy Vector System 2 Promega®),

Madison, Wisconsin, USA) linearizado y desfosforilado. El volumen final es de 10 µl. El producto de ligación se incubaba a 15°C durante una noche. Se mezclan siete µl de producto de ligación con 50 µl de células competentes (*Escherichia coli* JM 109) mantenidas durante 20 minutos en hielo y después incubadas durante 1 minuto a 42°C. Después de la adición de 950 µl de LB broth (USB®, Cleveland, Ohio, USA), y de la incubación durante 1h30 a 37°C, se extienden 500 y 250 µl de este medio de cultivo en 2 cajas de Petri que contienen LB agar (USB®) con 100 µg/ml de ampicilina. Las cajas se incuban durante una noche a 37°C. Las colonias recombinantes se depositan al mismo tiempo en 50 µl de agua destilada estéril y sobre una caja de LB agar ampicilina.

Se extraen las colonias de *E. coli* recombinantes para ser analizadas mediante PCR: 5 µl de suspensión bacteriana en agua destilada, el par de cebadores M13 (10 pm/µl) y el medio de reacción de PCR descrito anteriormente. El programa de PCR es idéntico al utilizado para la segunda etapa de la construcción. Los productos de PCR obtenidos se analizan sobre gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5 X. Los fragmentos del tamaño esperado se purifican utilizando el kit Qiaquick® PCR Purification Kit 250 Qiaquick (Qiagen®). A continuación, se secuencian utilizando el Big Dye® Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Warrington, UK), 3,2 pmol/µl de cebadores M13 sentido y antisentido cromatografiados sobre el secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems®). La secuencia obtenida se compara con la secuencia del fragmento esperado utilizando los programas auto assembler y Sequence Navigator (Applied Biosystems®). Uno de los clones recombinantes, de acuerdo con la secuencia esperada, se introducirá en gran cantidad en 100 ml de LB BROTH ampicilina y se purificará según el protocolo High Speed Plasmid Midi Kit (Qiagen®). El plásmido purificado se almacena después a -20°C. La cepa recombinante seleccionada se congela a -80°C.

#### I.4.3.4 Obtención de la gama plasmídica

Su concentración se determina mediante la medición de la densidad óptica a 260 nm. Es decir, por ejemplo: 0,38 para la disolución inicial. Una unidad DO corresponde a 50 µl/ml:  $0,38 \times 50 = 19 \mu\text{g/ml} = 19 \cdot 10^{-6} \text{ g/ml}$  de plásmido en la disolución inicial. El tamaño del plásmido = tamaño del pGEM®-T Easy + tamaño del fragmento = 3015 + 931 = 4334 pb, es decir 8668 bases. La masa molar de un nucleótido es de 330 Da (g/mol). La masa molar del plásmido será de  $8668 \times 330 = 2,860 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$ . La concentración del plásmido será en mol/ml, es decir  $19 \cdot 10^{-6} / 2,860 \cdot 10^6 = 6,64 \cdot 10^{-12} \text{ mol/ml}$ . Multiplicado por el número de Avogadro, se obtiene el número de copias de plásmido para 1 ml de disolución, es decir:  $6,64 \cdot 10^{-12} \times 6,023 \cdot 10^{23} = 40 \cdot 10^{11}$  copias/ml es decir  $2 \cdot 10^{10}$  copias/5 µl. Una primera dilución de la disolución plasmídica inicial a  $1/2500^a$  permite ajustar la concentración a la primera constante de la gama plasmídica, es decir el punto  $10^7$  copias/5 µl de disolución plasmídica. Una cascada de dilución por pasos de 10 permite crear las constantes sucesivas de la gama (de  $10^7$  copias a 1 copia para 5 µl de disolución).

### 1.5. Análisis de las muestras

#### I.5.1 PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizan las reacciones de cuantificación mediante PCR en tiempo real sobre los extractos de ADN de las extracciones vaginales. En el seno de cada placa de reacción se introducen: 4 controles negativos (NTC), la gama plasmídica de calibrado (de  $10^7$  a 1 copia por pocillo), 24 muestras a ensayar, puras y diluidas a  $1/120^a$  y a  $1/100^a$  para buscar unos inhibidores. Los controles negativos así como los puntos de la gama plasmídica se ensayan por duplicado. Para la amplificación y la cuantificación de los 8 microorganismos así como de la albúmina humana, se realizan 4 placas de PCR en doble fluorescencia y una en simple fluorescencia. Para la preparación de la mezcla de reacción, se utiliza el kit «Quantitect Probe PCR Kit» (Qiagen®) que contiene la mezcla de reacción 2X que asocia el tampón de la Taq polimerasa y la Taq polimerasa (Hotstar), los dNTP y dUTP. A este medio de reacción, se añaden los cebadores sentido y antisentido y las sondas necesarias para la realización de la PCR en simple o en doble fluorescencia según las condiciones experimentales indicadas descritas en el Anexo 6, las tomas de ensayo de las muestras diluidas o no y de los puntos de gama plasmídica son de 5 µl y 0,25 µl de UDG (Uracil DNA glycosylase a 100 unidades, Sigma-Aldrich, Lyon, Francia) se añaden para un volumen de reacción final de 25 µl. Las reacciones de PCR se realizan en el aparato Stratagene® MX 3000P (La Jolla, California). El programa de amplificación es el siguiente: 2 minutos a 50 °C, 15 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de PCR que comprenden la desnaturalización a 95°C durante 30 segundos y después la fase de hibridación y de elongación a 60°C durante 1 minuto.

#### I.5.2 Cálculo de la carga bacteriana

Para cada extracción vaginal y para cada microorganismo, con el fin de asegurar la comparabilidad de las muestras, la carga bacteriana se define de la manera siguiente. La cuantificación en número de copias de ADN de cada microorganismo para 5 µl de extracto de ADN se indica en número de bacterias para 1 ml de muestra inicial. Se debe tener en cuenta el volumen de elución del ADN (100 µl), del volumen del medio de transporte por muestra inicial (200 µl) y debido a que el gen cuantificado es un gen único. El valor obtenido para cada microorganismo en número de copias para 5 µl de extracto de ADN se multiplica por  $10^2$  para obtener una concentración en número de bacterias por ml de muestra, puesto que se ha realizado un volumen de elución de 100 µl de ADN extraído a partir de 200 µl de muestra.

#### 1.5.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de la cuantificación bacteriana por PCR en tiempo real se lleva a cabo utilizando el ensayo de Wilcoxon y el ensayo de Mann-Whitney para un grado de significado  $p < 0,05$ . Para el análisis estadístico, se tienen en cuenta todos los valores de cuantificación incluyendo aquéllos por debajo del umbral de positividad. Para los valores de cuantificación igual a cero, se les atribuye la concentración más baja del conjunto de las muestras analizadas. El ensayo estadístico de Wilcoxon se aplica para describir la repartición de cada microorganismo en cada grupo de flora. El ensayo de Mann-Whitney se aplica para la comparación de la cuantificación de cada uno de los 8 microorganismos en el grupo de las VB y de las FN. Con el fin de buscar unos criterios moleculares de la VB, cada umbral de cuantificación bacteriana (de  $10^3/\text{ml}$  a  $10^9/\text{ml}$ ) se estudia según la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo calculados según la identificación por el umbral de las FN y de las VB previamente definidos por la puntuación de Nugent. Los umbrales de cuantificación, considerados aisladamente o de manera combinada, que tienen la mejor sensibilidad y especificidad se seleccionan como criterios moleculares de identificación de la VB.

## 15 II. RESULTADOS

### II.1 Descripción de la población

De junio de 2005 a abril de 2006, se incluyen 204 mujeres embarazadas de 18 a 49 años de edad (media de edad de  $28,9 \pm 6,2$  años). El origen étnico es África del norte (43%), Europa (42%), Sudáfrica (14%) y otros orígenes (1%). Se realiza una extracción vaginal a cada mujer. Setenta y dos por ciento de estas extracciones se realizan en el tercer trimestre contra 20% en el segundo y 8% en el primer trimestre de embarazo. Se realiza un seguimiento bacteriológico en veintiuna mujeres que comprende de 2 a 4 extracciones. Se analizan así un total de 231 extracciones.

### 25 II.2. Resultados bacteriológicos

#### II.2.1 Coloración Gram y establecimiento de la puntuación de Nugent

A partir de las 231 extracciones vaginales que proceden de 204 mujeres, la puntuación de Nugent permite identificar: 167 FN, 44 FI y 20 VB. La frecuencia de las anomalías de la flora vaginal teniendo en cuenta la primera extracción vaginal para cada una de las 204 mujeres es de 71% para la FN (145 casos), 19% para la FI (39 casos) y 10% para la VB (20 casos). La mitad de las mujeres que presentan una VB son sintomáticas. El síntoma observado más frecuentemente es la abundancia de pérdidas vaginales.

#### 35 II.2.2 Cultivo y estado fresco

El cultivo permite aislar *G. vaginalis*, *C. albicans*, *M. bominis*, *U. urealyticum* así como *Streptococcus agalatae* (tabla 1). Ninguna de las extracciones vaginales examinadas presenta *T. vaginalis* en el examen directo.

### 40 II.3. Resultados de la biología molecular

#### II.3.1. Puesta a punto de la PCR en tiempo real

45 Durante la realización de las PCR en simple y en doble fluorescencia, no se realiza ninguna reacción cruzada ni ninguna competición. Se obtienen unos resultados similares en valor de CT en simple y doble fluorescencia utilizando las cepas bacterianas puras y la gama plasmídica.

Las cantidades óptimas de cebadores y de sondas necesarias para la obtención de una amplificación óptima se presentan en el anexo 5.

#### 50 II.3.2 Evaluación de la técnica de cuantificación por biología molecular

La cuantificación bacteriana para cada muestra está asegurada por la gama de dilución plasmídica. Para cada reacción de amplificación, se ensayan los 8 puntos de la gama plasmídica, de  $10^7$  copias a 1 copa para 5  $\mu\text{l}$ . El punto de gama  $10^7$  copias se ha identificado de manera precoz para un CT alrededor de 17. Para el punto de gama de 1 copia la detección es más tardía con un CT a 37. Para el conjunto de los puntos de la gama, la reacción de amplificación es lineal. La representación gráfica da una recta cuya pendiente varía de -3,2 a -3,5. Esta linealidad se confirma ensayando las cepas puras diluidas a  $1/10^a$ ,  $1/100^a$  y  $1/1000^a$ . Un umbral de positividad se define por encima de 10 copias (es decir  $10^3$  bacterias/ml), sea cual sea el tipo de microorganismo considerado (tabla 2). En efecto, de manera estadística, la amplificación del punto "1 copia" está asegurada en 75% mientras que es del 100% para el punto "10 copias". En el seno de cada placa de amplificación, cada muestra se ensaya en disolución diluida, diluida a la décima y a la centésima. De manera reproducible, la detección del producto de amplificación sigue el paso de dilución puesto que una dilución a la décima corresponde a un aumento de 3 CT. Se considera únicamente la disolución pura para el cálculo de la carga bacteriana. Para cada muestra, se ensaya la albúmina humana mediante PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos son homogéneos para el conjunto de las 231 muestras. Los

valores de CT se distribuyen entre 19 y 22 (es decir  $10^5$  a  $10^6$  copias de ADN de la albúmina por 5  $\mu$ l de ADN extraído). No se ha excluido ninguna muestra del análisis.

### II.3.3 Análisis de los datos

#### II.3.3.1 Descripción molecular de las vaginosis bacterianas

Las concentraciones medianas de *A. vaginae* y de *G. vaginalis* son respectivamente de  $1,1 \cdot 10^9$ /ml y de  $1,2 \cdot 10^9$ /ml y no tienen diferencia estadística significativa mediante el ensayo de Wilcoxon ( $p=0,3755$ ). Estas 2 bacterias tienen unas concentraciones elevadas (figuras 1A y 3) con respecto a los demás microorganismos cuyas concentraciones medianas son estadísticamente más bajas ( $p=0,0001$ ).

#### II.3.3.2 Comparación molecular de las vaginosis bacterianas y de las floras normales

La concentración mediana de *Lactobacillus sp.* es significativamente más baja ( $p<0,0001$ ) para las VB (concentración mediana de  $3 \cdot 10^3$ /ml) que para las FN (concentración mediana de  $5,7 \cdot 10^7$ /ml). Por el contrario, las concentraciones medianas de *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *M. curtisii* y *M. bominis* son significativamente más elevadas ( $p \leq 0,0037$ ) para las VB (concentración mediana respectivamente de  $1,1 \cdot 10^9$ /ml;  $1,2 \cdot 10^9$ /ml;  $5 \cdot 10^5$ /ml y  $5,5 \cdot 10^2$ /ml) que para las FN. Para las concentraciones medianas de *U. urealyticum* y *C. albicans*, no existe ninguna diferencia estadística significativa entre las VB y las FN, *M. mulieris* no está identificado (umbral de positividad  $\geq 10^3$ /ml) en ninguna de las VB ni ninguno de las FN.

#### II.3.3.3 Definición de los criterios moleculares de la vaginosis bacteriana

El análisis por umbral de la cuantificación para *A. vaginae* y *G. vaginalis* considerado aisladamente presenta los mejores criterios de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo para la identificación molecular de las VB y de las FN definidos por la puntuación de Nugent (tabla 4). La asociación de una cuantificación de *A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml y/o de una cuantificación de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml tiene una sensibilidad de 95%, una especificidad de 99%, un valor predictivo positivo (VPP) de 95% y un valor predictivo negativo (VPN) de 99%.

#### II.3.3.4 Caracterización molecular de las floras intermedias

La aplicación a las FI de la puntuación de Nugent (figura 2) de los criterios moleculares de identificación de la VB definidos anteriormente por una cuantificación de *A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml y/o por una cuantificación de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml, permite caracterizar 25 floras (57%) que presentan un perfil de VB (figura 3) y 19 floras (43%) que presentan un perfil de FN (figura 4).

#### II.3.3.5 Seguimiento bacteriológico

Se ha realizado un seguimiento a ocho mujeres que presentan una VB o una FI por la puntuación de Nugent (tabla 7). La cuantificación molecular permite la demostración de la recidiva de la VB no identificada por la puntuación de Nugent para el sujeto 1. Permite confirmar la desaparición de la VB para los sujetos 7 y 8. Se caracterizan como VB las FI de la puntuación de Nugent persistentes con más de un mes de intervalo para los sujetos 2 y 5. Por último, confirma el carácter normal del seguimiento de la flora vaginal del sujeto 3.

## III DISCUSIÓN

La repartición de las floras vaginales en FN (71%), VB (10%) y FI (19%) según la puntuación de Nugent está de acuerdo con las indicadas en la bibliografía en Francia [Goffinet F, EJOGR 2003], en Europa [Guise JM, AMJPM 2001] y en los Estados Unidos [Delaney ML, OG 2001]. La originalidad de la presente invención es la de haber establecido una herramienta racional de identificación de la flora vaginal asociando la técnica de detección específica por PCR en tiempo real y la cuantificación relativa por un plásmido de calibrado.

El resultado más sorprendente se refiere a *A. vaginae*. Esta bacteria ha sido identificada por primera vez en 1999 mediante amplificación y secuenciación del ARN 16S a partir de una extracción vaginal de sujeto sano [Rodríguez JM, IJSB 1999]. En 2003, *A. vaginae* ha sido aislada mediante cultivo en una extracción de absceso tubo-ovárico, dejando suponer un papel patógeno de la bacteria [Geissdorfer W, JCM 2003]. En 2004, un enfoque de amplificación del ARN 16S r acoplado a unas técnicas de clonación ha permitido la demostración de la bacteria en unas extracciones obtenidas en peroperatorio en unos pacientes que presentan una salpingitis [Hebb JK, JID 2004]. Según la presente invención, esta bacteria es de identificación frecuente en 19 de las 20 VB (95%) y 115 de las 167 FN (69%). El criterio más discriminante para el diagnóstico de las VB y de las FN es una concentración de *A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml con una sensibilidad de 90% (18 casos de 20 VB) y una especificidad de 99% (1 caso de 167 FN).

Desde 2004, 4 estudios basados en diversas técnicas moleculares han demostrado una posible asociación entre *A. vaginae* y VB, pero ninguno tenía en cuenta criterios de cuantificación rigurosos. En primer lugar, un enfoque mediante PCR que tiene como diana el ARN 16S r seguido de una migración sobre gel ha permitido demostrar *A.*

*vaginae* entre sólo 12 VB de 20 (60%) y 2 FN de 24 (8,3%) [Ferris MJ, BMCID 2004]. Por PCR que tiene como diana específicamente el gen del ARN 16S r de *A. vaginae*, el ADN de la bacteria ha sido encontrado entre 7 VB de 9 (77,8%) y 22 FN de 112 (19,6%) [Verhelst R, BMCM 2004]. Aplicando la misma técnica, el ADN de *A. vaginae* ha sido demostrado entre 19 VB de 22 (86,4%) y 59 FN de 403 (14,7%) [Verhelst R, BMCM 2005]. Por último, mediante unas técnicas de amplificación, clonación y secuenciación, el ADN de *A. vaginae* se ha observado en 26 VB de 27 (96%) y 9 FN de 46 (19,5%) [Fredricks DN, NEJM 2005]. Ninguno de estos estudios ha cuantificado el ADN de *A. vaginae*, lo cual es esencial en las vaginosis bacterianas en las que la concentración de las bacterias es un elemento importante del diagnóstico.

*A. vaginae* falta en la puntuación de Nugent a pesar de su lugar capital en las anomalías de la flora vaginal. Su identificación por unos criterios morfológicos está poco adaptada. Su morfología variable en forma de un pequeño cocobacilo (0,6-0,9 µm) de Gram positivo a veces agrupado por pares o en cadena corta le asegura un camuflaje en contacto con otras bacterias, haciéndolo así indetectable [Verhelst R, BMCM 2004]. Su parecido a *Lactobacillus sp.* y a los estreptococos es por lo tanto fuente de error de identificación [Rodríguez JM, 1JSB 1999].

La descripción de una asociación entre *A. vaginae* y *G. vaginalis* en la VB es reciente, está poco documentada y es de alcance diagnóstico limitado en ausencia de cuantificación. Esta asociación es de 87,8% (8 de 9 VB) [Verhelst R, BMCM 2004] y de 90% (20 de 22 VB) [Zariffard MR, FEMS 2002] por PCR específica que tiene como diana el gen del ARN 16S r de *A. vaginae* y de *G. vaginalis*. Una publicación reciente describe la presencia de *A. vaginae* en las vaginosis bacterianas mediante un método semi-cuantitativo [Bradshaw CS, JID 2006].

Según la presente invención, esta asociación de *A. vaginae* y de *G. vaginalis* es de 90% (18 de 20 VB) pero la consideración de la cuantificación de *A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml y/o de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml con una sensibilidad de 95% (19 de 20 VB) presenta los mejores criterios de especificidad (99%), de VPP (95%) y de VPN (99%) jamás obtenidos para la identificación de la VB. En consecuencia, se utiliza una concentración de *A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml y/o una concentración de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml para el diagnóstico molecular de la VB.

Los resultados según la presente invención sugieren que la cuantificación de *G. vaginalis* es menos discriminante que la de *A. vaginae*. Para los *Lactobacillus sp.*, su disminución en la VB objetivada por la puntuación de Nugent se confirma mediante estos resultados. En efecto, si se considera una concentración de *Lactobacillus sp.* inferior o igual a  $10^7$ /ml, la sensibilidad para diagnosticar una VB es de 100% y la especificidad de 44%. Por otra parte, si se considera una concentración de *Lactobacillus sp.* superior o igual a  $10^8$ /ml, se observa una especificidad de 100% para demostrar una flora vaginal normal.

Para los *Mobiluncus spp.*, a pesar del lugar que se les otorga por la puntuación de Nugent, ninguna PCR es positiva para *M. mulieris*. Sólo *M. curtisii* está asociada a la VB. Sin embargo, su utilización como posible criterio de diagnóstico molecular sigue siendo menor.

Los micoplasmas genitales no se tienen en cuenta para la puntuación de Nugent. Siguen siendo identificables mediante cultivo o biología molecular. El estudio por cultivo de 445 VB y 2729 FN, identificaba *M. hominis* como significativamente asociado a la VB con una prevalencia de 29% (129 VB) y *U. urealyticum* como no asociado a la VB a pesar de una prevalencia de 56% (253 VB) [Thorsen P, AJOG 1998]. Un estudio sobre 203 VB y 203 FN que tiene como diana *M. hominis* por PCR en tiempo real sugería una implicación de *M. hominis* en la VB [Zariffard MR, FEMS 2002]. Sin embargo, un estudio idéntico sobre un efectivo más restringido (5 VB y 16 FN) no demostraba esta relación [Sha BE, JCM 2005]. Según la presente invención, sólo *M. hominis* se correlaciona con la VB pero esta correlación es insuficiente para proponer este microorganismo como criterio diagnóstico de la VB.

Los resultados según la presente invención no demuestran ninguna relación entre la VB y *C. albicans* tal como lo muestran los datos en la bibliografía [Thorsen P, AJOG 1998]. Esto es interesante porque aunque el reparto genital de *Candida albicans* no aumenta el riesgo de premadurez [Cotch MF, AJOG 1998], un estudio reciente [Kiss H, BMJ 2004] ha mostrado una reducción del porcentaje de premadurez mediante el tratamiento del reparto genital de *C. albicans*.

La originalidad de la presente invención es poder proponer por primera vez una herramienta diagnóstica de la VB basada en la cuantificación de *A. vaginae* y *G. vaginalis*. Los criterios considerados actualmente asocian una concentración de *A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml y/o una concentración de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml. Este ensayo diagnóstico tiene una sensibilidad de 95%, una especificidad de 99%, un VPP de 95% y un VPN de 99%. Varios métodos de lectura de los resultados de PCR, en particular los métodos mediante cálculo de ratio y de productos de concentraciones bacterianas, han sido ensayados para permitir identificar el método más pertinente.

Una de las aplicaciones más turbadora de la herramienta de biología molecular según la presente invención es la realizada sobre la FI de la puntuación de Nugent. Se sabe que la FI, únicamente identificada mediante la puntuación de Nugent, constituye una fracción no despreciable (8% a 22%) de la totalidad de las floras identificadas por esta última [Guerra B, EJOGRB 2006; Goffinet F, EJOGRB 2003; Delaney ML, OG 2001; Libman MD, DMID 2006; Larsson PG, STI 2004] y que está asociada a numerosas incertidumbres. En efecto, su interpretación está sujeta a confirmación puesto que no se sabe a qué realidad microbiológica corresponde esta flora intermedia. Algunos la



consideran como una flora de transición entre FN y VB [Ison CA, STI 2002; Guerra B, EJOGRB 2006; Goffinet F, EJOGRB 2003; Ugwumadu A, Lancet 2003; Carey JC, NEJM 2000]. Otros la consideran como un grupo heterogéneo que agrupa unas FN y unas VB [Ison CA, STI 2002; Libman MD, DMID 2006; Larsson PG, STI 2004]. Unas tentativas de caracterización de la FI en FN o VB se describen en la bibliografía. Por la aplicación de los criterios de Amsel a 13 FI, 12 FI son recatalogadas en FN y 1 en VB [Ison CA, STI 2002]. Por la coloración de Kopeloff para el establecimiento de la puntuación de Nugent, 69 de las 232 FI (30%) son recatalogadas en FN o VB [Libman MD, DMID 2006]. En esta coloración, la fucsina sustituye la safranina de la coloración de Gram para permitir una mejor identificación de las bacterias de Gram negativo. Por último, la estandarización de los criterios de la puntuación de Nugent en función de la superficie del campo óptico del aparato microscópico utilizado, ha permitido reclasificar 458 de las 1176 FI (39%) en FN o VB [Larsson PG, ST1 2004].

La aplicación a las FI de criterios moleculares según la presente invención que asocian a la VB una concentración de *A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml y/o una concentración de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml permiten prever una caracterización racional de esta FI. Así, 24 FI (57%) presentan un perfil similar al de las VB. Las otras diecinueve FI (43%) presentan un perfil similar al de las FN. Estos resultados dejan por lo tanto sugerir por un lado el carácter heterogéneo de las FI y por otro lado un defecto de sensibilidad de la puntuación de Nugent para diagnosticar más de la mitad de las VB. Estos datos confirman por lo tanto los límites de la puntuación de Nugent.

La etiología de la VB sigue siendo todavía un misterio pero se dispone por primera vez de una herramienta de cuantificación objetivo que permite un enfoque de diagnóstico racional de la VB. El carácter singular de la presente invención es haber mostrado al mismo tiempo la posición capital de *A. vaginae* en la VB pero también su utilización mediante cuantificación como criterio diagnóstico principal de la VB. Se entiende aún mejor el problema terapéutico suscitado por el carácter relativamente resistente de *A. vaginae* al metronidazol que puede explicar en parte la frecuencia de las recidivas después del tratamiento [ANAES 2001; Ferris MJ, BMC ID 2004; Secor AM, CNP 1997; Geissdorfer W, JCM 2003; De Backer E, BMC ID 2006]. Los criterios moleculares considerados para el diagnóstico de la VB asocian una concentración de *A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml y/o una concentración de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml. Esta herramienta molecular permite el diagnóstico de la VB y la caracterización en VB de una fracción de la FI. Se ha podido asimismo prever la herramienta molecular como un método diagnóstico de la VB y de seguimiento para la evaluación de la asistencia terapéutica de la VB durante el embarazo.

**Anexo 1.** Diana molecular y secuencia nucleotídica del par de cebadores y de la sonda para cada microorganismo estudiado

En la tabla siguiente, las secuencias de los "cebadores sentido" y "sondas" están escritas en el sentido 5'→3', y las secuencias de los "cebadores antisentido" están escritas en el sentido 5'→3' complementario inverso.

Microorganismos	Dianas	Secuencias nucleotídicas
<i>M. curtisii</i>	<i>Cpn 60</i>	Cebador sentido: TGGAAAAGGTGGGTCAAGAG Cebador antisentido: AAACGCATACCTTCGGTGAC Sonda: FAM-GGCGTCATCACCGTGAAGAA-TAMRA
<i>M. mulieris</i>	ARN 16 S ribosomal	Cebador sentido: ATGGATATGCGTGTGGATGG Cebador antisentido: CCAGGCATGTAAGCCCAAAC Sonda: VIC-IIIIIGGGTGGGGGCGCTA-TAMRA
<i>G. vaginalis</i>	<i>Cpn 60</i>	Cebador sentido: CGCATCTGCTAAGGATGTTG Cebador antisentido: CAGCAATCMMCGCCAACT Sonda: VIC-TGCAACTATTTCTGCAGCAGATCC-TAM RA
<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Tuf</i>	Cebador sentido: TACATCCCAACTCCAGAACG Cebador antisentido: AAGCAACAGTACCACGACCA Sonda: FAM-TGACAAGCCATTCTTAATGCCA-TAMRA
<i>U. urealyticum</i>	Ureasa	Cebador sentido: ACTGGTGACCGTCCTATCCA Cebador antisentido: CCTGATGGAATATCGAAACGA Sonda:VIC-TGAAAAAGGAAACGAAGACAAAGA-TAM RA
<i>M. hominis</i>	<i>fts Y</i>	Cebador sentido: ATTGATTGCTGCAGGTGATACA Cebador antisentido: GGTGTTACAATATCAGCCCAAAC Sonda: FAM-AGAGCAGCGGCAGTTGAA-TAMRA
<i>A. vaginae</i>	ARN 16S ribosomal	Cebador sentido: CCCTATCCGCTCCTGATACC Cebador antisentido: CCAATATCTGCGCATTTCA Sonda: VIC-GCAGGCTTGAGTCTGGTAGGGGA-TAMRA
<i>C. albicans</i>	Topoisomerasa 3	Cebador sentido: CAACGCCAACGAAGACAAG Cebador antisentido: CCAGCTTTGTTTGCATCAAC Sonda: FAM-AAAGCCGATGGTAGTAGAAAACCTGCTAMRA
Albúmina humana	Exón 12	Cebador sentido: GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT Cebador antisentido: AAACCTATGGGAGCTGCTGGTTC Sonda: FAM-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-TAMRA

**Anexo 2.** Secuencia teórica global del inserto de 939 pares de bases.

Secuencias en negrita = Secuencias de los cebadores sentido y antisentido

Secuencias subrayadas = Secuencias de las sondas específicas

5 Secuencias en negro = Secuencias intercalantes

Secuencias entre paréntesis = Secuencias del sitio de restricción XhoI

**Sec. n°18**=5'GCCATGGAAAAGGTGGGTCAAGAGGGCGTCATCA  
CCGTGGAAGAACATCGTCTCGAGTTAAGGAGCCTCGAAGTCACCGA  
**AGGTATGCGTTTCATTATGGATATGCGTGTGGATGGATTA**(CTCGA  
**G)**CTGCCTGTTTTGGGTGGGGGCGCTATCGGGGTTTGGGCTTACAT  
**GCCTGGCCCTCGCATCTGCTAAGGATGTTGAAACATCGT**(CTCGAG)  
**TTAAGGCTACTGCAACTATTTCTGCAGCAGATCCTGAAGTTGGCGA**  
**AAAGATTGCTGAATACATCCCAACTCCAGAACGTGATACTGACAAG**  
CCATTCTTAATGCCAGTTGAAGACGTATTTACTATCACTGGTCGTGG  
**TACTGTTGCTTCTATACTGGTGACCGTCCTATCCAAGTTGGATCAC**  
**ATCGT**(CTCGAG)**TTAAGAACAAATAGTGCATTAGTATTCTTTGATGA**  
AAAAGGAAACGAAGACAAAGAACGTAAAGTTGCTTATGGACGTCG  
**TTTCGATATTCCATCAGGTAATTGATTGCTGCAGGTGATACATTTA**  
GAGCAGCGGCAGTTGAACAATTCATCGT(CTCGAG)**TTAAGGAGTTG**  
**GGGCTGATATTGTAACACCAAACCCCTATCCGCTCCTGATACCGGC**  
AGGCTTGAGTCTGGTAGGGGAAGATGGAATTCCAAGT(CTCGAG)**G**  
**TGAAATGCGCAGATATTTGGAAGCCAACGCCAACGAAGACAAGGCA**  
**CTTCAA**AAAGCCGATGGTAGTAGAAAACTGCGACATCGT(CTCGAG)  
**TTAAGTTGGTTGATGCAAACAAAGCTGGTAGTTGCTGTCATCTCTT**  
**GTGGGCTGTAATCATCGT**(CTCGAG)**TTAAGAGTAATATTGCAAAAC**  
CTGTCATGCCACACAAATCTCTCCCTGGCATTGTTGTCTTTGCAGA  
**TGTCAGTGAAAGAGAACCAGCAGCTCCCATGAGTTTGG-3'**

10 **Anexo 3.** Secuencias de los 6 oligonucleótidos y de los cebadores de construcción del inserto.

- Oligonucleótido 1 sentido, 178 nucleótidos: secuencias de *M. curtisii* y *M. mulieris*

**Sec. n°19**=5'GCCATGGAAAAGGTGGGTCAAGAGGGCGTCATC  
 ACCGTGGAAGAACATCGTCTCGAGTTAAGGAGCCTCGAAGTCACCG  
 AAGGTATGCGTTTCATTATGGATATGCGTGTGGATGGATTACTCGA  
 GCTGCCTGTTTTGGGTGGGGGCGCTATCGGGGTTTGGGCTTACAT  
 GCCTGGCC3'

- Oligonucleótido 2 antisentido, 183 nucleótidos: *G. vaginalis* y *Lactobacillus* sp.

**Sec. n°20**=5'CGACCAGTGATAGTAAATACGTCTTCAACTGGCAT  
TAAGAATGGCTTGTTCAGTATCACGTTCTGGAGTTGGGATGTATTCA  
GCAATCTTTTCGCCAACTTCAGGATCTGCTGCAGAAATAGTTGCAGT  
AGCCTTAACTCGAGACGATGTTTCAACATECTTAGCAGATGCGAGG  
GCCAGGCAT3'

- Oligonucleótido 3 sentido, 145 nucleótidos: *U. ura/yticum*

**Sec. n°21**=5'TCACTGGTCGTGGTACTGTTGCTTCTATACTGGTG  
ACCGTCCTATCCAAGTTGGATCACATCGTCTCGAGTTAAGAACAAT  
AGTGCATTAGTATTCTTTGATGAAAAAGGAAACGAAGACAAAGAAC  
GTAAAGTTGCTTATGGA3'

- Oligonucleótido 4 antisentido, 188 nucleótidos: *M. bominis*

**Sec. n°22**=5'CTTGGAATTCCATCTTCCCCTACCAGACTCAAGCC  
TGCCGGTATCAGGAGCGGATAGGGGTTTGGTGTTACAATATCAGCC  
CCAACCTCCTTAACTCGAGACGATGAATTGTTCAACTGCCGCTGCTCT  
AAATGTATCACCTGCAGCAATCAATTACCTGATGGAATATCGAAACG  
ACGTCCATAAGCA3'

5

- Oligonucleótido 5 sentido; 152 nucleótidos: *A. vaginae* y *C. albicans*

**Sec. n°23**=5'GAATTCCAAGTCTCGAGGTGAAATGCGCAGATAT  
TTGGAAGCCAACGCCAACGAAGACAAGGCACTTCAAAAAGCCGATG  
GTAGTAGAAAAGTGCACATCGTCTCGAGTTAAGTTGGTTGATGCA  
AACAAAGCTGGTAGTTGCTGTCAT3'

- Oligonucleótido 6 antisentido, 147 nucleótidos: albúmina humana

**Sec. n°24**=5'CCAAACTCATGGGAGCTGCTGGTTCTCTTTCACTG  
ACATCTGCAAAGACAACAATGCCAGGGAGAGATTTGTGTGGGCATG  
ACAGGTTTTGCAATATTACTCTTAACTCGAGACGATGATTACAGCCC  
ACAAGAGATGACAGCAA3'

10

- Cebadores de construcción para el plásmido recombinante con el fragmento de 939 pares de bases

- Sentido Sec. n° 25 = 5'GCCATGGAAAAGGTGGGTC3'

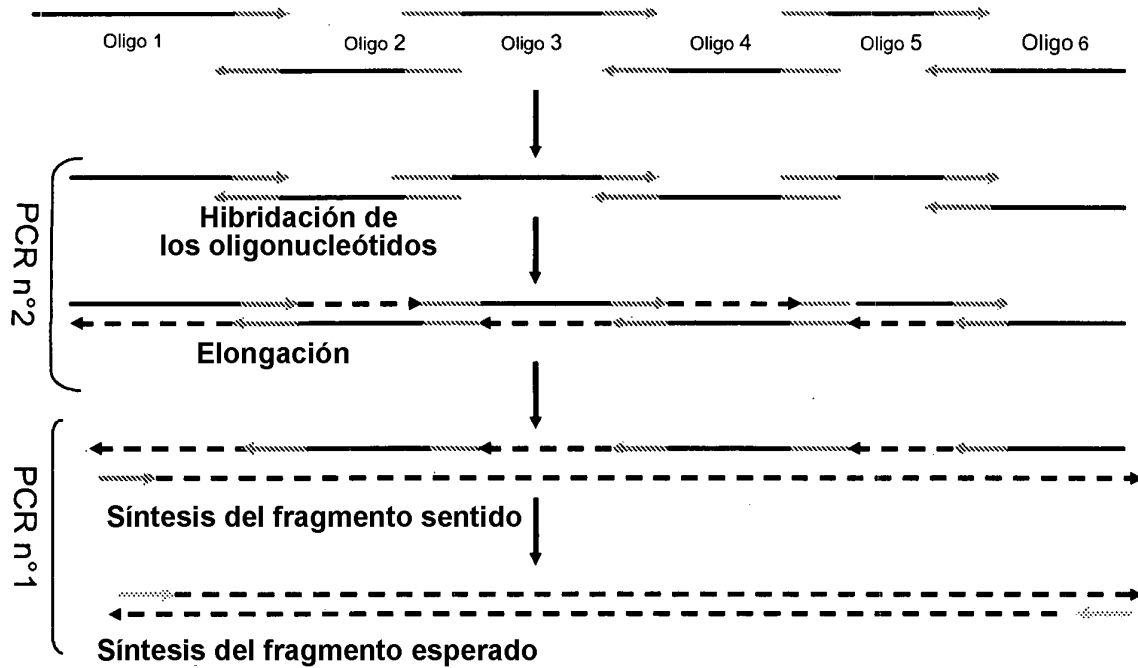
- Antisentido Sec. n° 28 = 5'CCAAACTCATGGGAGCTGCT3'

15

**Anexo 4.** Esquemas teóricos de construcción de un inserto por doble PCR.

El principio de construcción de un inserto con 6 oligonucleótidos

Esquema de construcción del plásmido



5 **Anexo 5.** Cantidad de sonda y de cebadores sentido y antisentido necesaria para la reacción de amplificación de 5 µl de extracto de ADN para cada microorganismo y la albúmina humana.

Microorganismos	Sonda (cantidad expresada en µl por pocillo)	Cebador sentido (cantidad expresada en µl por pocillo)	Cebador antisentido (cantidad expresada en µl por pocillo)
<i>M. curtisii</i>	0,25	0,5	0,5
<i>M. mulieris</i>	0,25	0,5	0,5
<i>G. vaginalis</i>	0,25	0,5	0,5
<i>Lactobacillus sp.</i>	0,25	0,5	0,5
<i>U. urealyticum</i>	0,25	0,5	0,5
<i>M. bominus</i>	0,125	0,125	0,125
<i>A. vaginae</i>	0,25	0,5	0,5
<i>C. albicans</i>	0,25	0,5	0,5
Albúmina humana	0,125	0,125	0,125

BIBLIOGRAFÍA

10 ANAES. 2001. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien anténatal. Recommandations pour les professionnels de santé.

Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med. 1983; 74:14-22.

15 De Backer E, Verhelst R, Verstraelen Hans, Antibiotic susceptibility of Atopobium vaginae. BMC infectious diseases, Marzo de 2006.

20 Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. J Infect Dis 2006; 193:1478-86.

25 Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SW. The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. J Infect Dis. 2006; 194:828-36.

- 5  
Carey JC, Klebanoff MA, Hauth JC, Hillier SL, Thom EA, Ernest JM, Heine RP, Nugent RP, Fischer ML, Leveno KJ, Wapner R, Varner M. Metronidazole to prevent preterm delivery in pregnant women with asymptomatic bacterial vaginosis. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med*. 2000; 342:534-40.
- 10  
Cotch MF, Hillier SL, Gibbs RS, Eschenbach DA. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 178:374-80.
- 15  
Delaney ML, Onderdonk AB. Nugent score related to vaginal culture in pregnant women. *Obstet Gynecol*. 2001; 98: 79-84.
- 20  
Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL Jr, Martin DH. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis*. 13 de feb, de 2004; 4:5.
- 25  
Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med*. 2005; 353:1899-911.
- 30  
Geissdorfer W, Bohmer C, Pelz K, Schoerner C, Frobenius W, Bogdan C. Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recover. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:2788-90.
- 35  
Goffinet F, Maillard F, Mihoubi N, Kayem G, Papiernik E, Cabrol D, Paul G. Bacterial vaginosis: prevalence and predictive value for premature delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003; 108:146-51.
- 40  
Guerra B, Ghi T, Quarta S, Morselli-Labate AM, Lazzarotto T, Pilu G, Rizzo N. Pregnancy outcome after early detection of bacterial vaginosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2 de feb. de 2006.
- 45  
Guise JM, Mahon SM, Aickin M, Helfand M, Peipert JF, Westhoff C. Screening for bacterial vaginosis in pregnancy. *Am J Prev Med*. 2001; 20(3 Supl.):62-72.
- 50  
Hauth JC, Goldenberg RL, Andrews WW, DuBard MB, Copper RL. Reduced incidence of preterm delivery with metronidazole and erythromycin in women with bacterial vaginosis. *N Engl J Med*. 1995; 333:1732-6.
- 55  
Hebb JK, Cohen CR, Astete SG, Bukusi EA, Totten PA. Détection of novel organisms associated with salpingitis, by use of 16S rDNA polymerase chain reaction. *J Infect Dis*. 2004; 190:2109-20.
- 60  
Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect*. 2002; 78:413-5.
- 65  
Kiss H, Petricevic L, Husslein P. Prospective randomised controlled trial of an infection screening programme to reduce the rate of preterm delivery. *BMJ*. 2004; 329:371.
- Larsson PG, Carlsson B, Fahraeus L, Jakobsson T, Forsum U. Diagnosis of bacterial vaginosis: need for validation of microscopic image area used for scoring bacterial morphotypes. *Sex Transm Infect*. 2004; 80:63-7.
- Leitich H, Brunbauer M, Bodner-Adler B, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Antibiotic treatment of bacterial vaginosis in pregnancy: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 188:752-8.
- Libman MD, Kramer M, Platt R; Montreal Prematurity Study Group. Comparison of Gram and Kopeloff stains in the diagnosis of bacterial vaginosis in pregnancy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54:197-201.
- McDonald H, Brocklehurst P, Parsons J. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 25 de enero de 2005;(1):CD000262. Review.
- Morales HJ, Schorr S and J Albritton, Effect of metronidazole in patients with preterm birth in preceding pregnancy and bacterial vaginosis: a placebo-controlled, double-blind study, *Am J Obstet Gynecol* 171 (1994), p. 345-347.

Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:297-301.

5 Okun N, Gronau KA, Hannah ME. Antibiotics for bacterial vaginosis or *Trichomonas vaginalis* in pregnancy: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2005; 105:857-68.

Rodriguez Jovita M, Collins MD, Sjoden B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49:1573-6.

10 Schwebke JR, Hillier SL, Sobel JD, McGregor JA, Sweet RL. Validity of the vaginal gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 1996; 88:573-6.

Schwebke JR, Lawing LF. Prevalence of *Mobiluncus* spp among women with and without bacterial vaginosis as detected by polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis.* 2001; 28:195-9.

15 Secor, A. M. 1997. Diagnosis and treatment of chronic vulvovaginitis. *Clin Nurse Practitioner* 1:1-6.

Sha BE, Chen HY, Wang QJ, Zariffard MR, Cohen MH, Spear GT. Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* sp. for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:4607-12.

20 Spiegel CA., Bacterial Vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 1991; 4:485-502.

Thomason JL, Anderson RJ, Gelbart SM, Osypowski PJ, Scaglione NJ, el Tabbakh G, James JA. Simplified gram stain interpretive method for diagnosis of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 167:16-9.

25 Thorsen P, Jensen IP, Jeune B, Ebbesen N, Arpi M, Bremmelgaard A, Moller BR. Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 178:580-7.

30 Ugwumadu A, Manyonda I, Reid F, Hay P. Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003; 361:983-8.

35 Varma R, Gupta JK. Antibiotic treatment of bacterial vaginosis in pregnancy: multiple meta-analyses and dilemmas in interpretation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006; 124:10-4.

Verhelst, R., H. Verstraelen, G. Claeys, G. Verschraegen, J. Delanghe, L. Van Simaey, C. De Ganck, M. Temmerman, y M. Vaneechoutte. 2004. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC. Microbiol* 2004; 4:16.

40 Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol.* 14 de oct. de 2005; 5:61.

45 Zariffard MR, Saifuddin M, Sha BE, Spear GT. Détection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for *Lactobacilli*, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 13; 34:277-81.

50

**Tabla 1.** Resultados del cultivo bacteriano para los 3 tipos de flora identificados por la puntuación de Nugent.

Cultivo	Flora normal	Flora intermedia	Vaginosis bacteriana	Total
Microorganismo buscado	Número de extracciones positivas en número de extracciones ensayadas (%)			
<i>G. vaginalis</i>	6 de 167 (3,6%)	6 de 44 (13,6%)	15 de 20 (75%)	27 de 231 (12%)
<i>M. hominis</i> y <i>U. urealyticum</i>	16 de 163 (9,8%)	6 de 39 (15%)	4 de 16 (25%)	26 de 231 (9%)
<i>C. albicans</i>	30 de 167 (18%)	17 de 44 (38,6%)	3 de 20 (15%)	50 de 231 (21,6%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5 de 167 (3%)	1 de 44 (2%)	0 de 20	6 de 231 (2,6%)

**Tabla 2.** Detección de la presencia de los 8 microorganismos mediante PCR en tiempo real para las 231 muestras.

Microorganismos determinados mediante PCR	Número y porcentaje de PCR positiva (límite de positividad 10 <sup>3</sup> /ml)
<i>Lactobacillus sp.</i>	177 (77%)
<i>G. vaginalis</i>	131 (57%)
<i>A. vaginae</i>	172 (74%)
<i>M. mulieris</i>	1 (0,4%)
<i>M. curtisii</i>	41 (18%)
<i>M. bominis</i>	47 (20%)
<i>U. urealyticum</i>	32 (14%)
<i>C. albicans</i>	60 (26%)

5 **Tabla 3.** Análisis de las concentraciones bacterianas medianas obtenidas mediante PCR cuantitativo para las vaginosis bacterianas y las floras vaginales normales determinadas por la puntuación de Nugent.

Microorganismos	20 vaginosis bacterianas	167 floras normales	Valor P
	Concentración bacteriana mediana/ml (concentración mínima y máxima)		Ensayo estadístico de Mann-Whitney
<i>Lactobacillus sp.</i>	2,7.10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -8.10 <sup>7</sup> )	5,6.10 <sup>7</sup> (<10 <sup>3</sup> -5,4.10 <sup>9</sup> )	< 0,0001
<i>G. vaginalis</i>	1,1 10 <sup>9</sup> (<10 <sup>3</sup> -1,5.10 <sup>10</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -5.10 <sup>8</sup> )	< 0,0001
<i>A. vaginae</i>	1,2 10 <sup>9</sup> (<10 <sup>3</sup> -1,2.10 <sup>10</sup> )	4,7.10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -2.10 <sup>3</sup> )	< 0,0001
<i>M. mulieris</i>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>	No se puede medir
<i>M. curtisii</i>	4,9.10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -1,3.10 <sup>6</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -6,2.10 <sup>4</sup> )	< 0,0001
<i>M. bominis</i>	8,5.10 <sup>2</sup> (<10 <sup>3</sup> -13.10 <sup>8</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -2,2.10 <sup>9</sup> )	0,0054
<i>U. urealyticum</i>	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -3,4.10 <sup>5</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -5.10 <sup>6</sup> )	0,3344
<i>C. albicans</i>	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -1,7.10 <sup>3</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> -7.10 <sup>6</sup> )	0,0991

**Tabla 4.** Impacto de la cuantificación bacteriana mediante PCR en tiempo real para la identificación de las vaginosis bacterianas.

10 El grupo de floras normales y de vaginosis bacterianas definidas por la puntuación de Nugent son utilizados como referencia

Microorganismos	Umbral de cuantificación (bacterias/ml)	FN identificadas*	VB identificadas*	Sensibilidad**	Especificidad**	VPP***	VPN***
<i>A. vaginae</i>	> 10 <sup>3</sup>	116 (69%)	19 (95%)	0,95	0,31	0,14	0,98
	> 10 <sup>4</sup>	65 (39%)	19 (95%)	0,95	0,61	0,23	0,99
	> 10 <sup>5</sup>	25 (15%)	19 (95%)	0,95	0,85	0,43	0,99
	> 10 <sup>6</sup>	13 (7,8%)	19 (95%)	0,95	0,92	0,59	0,99
	> 10 <sup>7</sup>	6 (3,6%)	19 (95%)	0,95	0,96	0,76	0,99
	> 10 <sup>8</sup>	1 (0,6%)	18 (90%)	0,90	0,99	0,95	0,99
	> 10 <sup>9</sup>	0	13 (65%)	0,65	1,00	1,00	0,96
<i>G. vaginalis</i>	> 10 <sup>3</sup>	79 (47%)	19 (95%)	0,95	0,53	0,19	0,99
	> 10 <sup>4</sup>	59 (35%)	19 (95%)	0,95	0,65	0,24	0,99
	> 10 <sup>5</sup>	39 (23%)	19 (95%)	0,95	0,77	0,33	0,99
	> 10 <sup>6</sup>	25 (15%)	19 (95%)	0,95	0,85	0,43	0,99
	> 10 <sup>7</sup>	12 (7%)	18 (90%)	0,90	0,93	0,60	0,99
	> 10 <sup>8</sup>	7 (4%)	16 (80%)	0,80	0,96	0,70	0,98
	> 10 <sup>9</sup>	0	10 (50%)	0,50	1,00	1,00	0,94
<i>M. curtisii</i>	> 10 <sup>3</sup>	21 (12,6%)	13 (65%)	0,65	0,87	0,38	0,95
	> 10 <sup>4</sup>	2 (1,2%)	9 (45%)	0,45	0,99	0,82	0,94
	> 10 <sup>5</sup>	0	9 (45%)	0,45	1,00	1,00	0,94
	> 10 <sup>6</sup>	0	1 (5%)	0,05	1,00	1,00	0,90
	> 10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0	0
<i>M. bominis</i>	> 10 <sup>3</sup>	22 (13%)	10 (50%)	0,50	0,87	0,31	0,94
	> 10 <sup>4</sup>	13 (7,8%)	7 (35%)	0,35	0,92	0,35	0,92
	> 10 <sup>5</sup>	6 (3,6%)	7 (35%)	0,35	0,96	0,54	0,93
	> 10 <sup>6</sup>	2 (1,2%)	6 (30%)	0,30	0,99	0,75	0,92
	> 10 <sup>7</sup>	2 (1,2%)	6 (30%)	0,30	0,99	0,75	0,92
	> 10 <sup>8</sup>	2 (1,2%)	1 (5%)	0,05	0,99	0,33	0,90
	> 10 <sup>9</sup>	1 (0,6%)	0	0	0,99	0	0,89
<i>U. urealyticum</i>	> 10 <sup>3</sup>	22 (13%)	5 (25%)	0,25	0,87	0,18	0,91
	> 10 <sup>4</sup>	17 (10%)	5 (25%)	0,25	0,90	0,23	0,91
	> 10 <sup>5</sup>	13 (7,8%)	3 (15%)	0,15	0,92	0,19	0,90
	> 10 <sup>6</sup>	7 (4,2%)	0	0	0,96	0	0,89

(continuación)

El grupo de floras normales y de vaginosis bacterianas definidas por la puntuación de Nugent son utilizados como referencia

Microorganismos	Umbral de cuantificación (bacterias/ml)	FN identificadas*	VB identificadas*	Sensibilidad**	Especificidad**	VPP***	VPN***
<i>Lactobacillus spp.</i>	> 10 <sup>3</sup>	141 (84%)	12 (60%)	0,60	0,16	0,08	0,76
	> 10 <sup>4</sup>	134 (80%)	7 (35%)	0,35	0,20	0,05	0,72
	> 10 <sup>5</sup>	116 (69%)	4 (20%)	0,20	0,30	0,03	0,76
	> 10 <sup>6</sup>	106 (63%)	4 (20%)	0,20	0,36	0,04	0,79
	> 10 <sup>7</sup>	97 (58%)	3 (15%)	0,15	0,42	0,03	0,80
	> 10 <sup>8</sup>	74 (44%)	0	0	0,55	0	1
	> 10 <sup>9</sup>	13 (7,8%)	0	0	0,92	0	1

\*Número de FN y número de VB identificadas de 167 FN ensayadas (%) y 20 VB ensayadas (%) respectivamente.  
 \*\*Sensibilidad y especificidad del umbral de cuantificación para la identificación de las VB  
 \*\*\*VPP valor predictivo positivo y VPN valor predictivo negativo

5 **Tabla 5.** Impacto de la asociación de los criterios de cuantificación por PCR en tiempo real de *A. vaginae* y *G. vaginalis* para la identificación de las vaginosis bacterianas. Se utilizan como referencia el grupo de floras normales y de vaginosis bacterianas definidas por la puntuación de Nugent.

Microorganismos asociados	Umbral de cuantificación de <i>G. vaginalis</i> (bacterias/ml)	FN identificadas*	VB identificadas*	Sensibilidad**	Especificidad**	VPP***	VPN***
<i>A. vaginae</i> ≥ 10 <sup>6</sup> y <i>G. vaginalis</i>	≥ 10 <sup>6</sup>	5 (3%)	18 (90%)	0,90	0,97	0,78	0,99
	≥ 10 <sup>7</sup>	5(3%)	17 (85%)	0,85	0,97	0,77	0,98
	≥ 10 <sup>8</sup>	2(1,2%)	15 (75%)	0,75	0,99	0,88	0,97
	≥ 10 <sup>9</sup>	0	9 (45%)	0,45	1	1	0,94
<i>A. vaginae</i> ≥ 10 <sup>7</sup> y <i>G. vaginalis</i>	≥ 10 <sup>6</sup>	1 (06%)	17 (85%)	0,85	0,99	0,94	0,98
	≥ 10 <sup>7</sup>	1 (0,6%)	17 (85%)	0,85	0,99	0,94	0,98
	≥ 10 <sup>8</sup>	0	15 (75%)	0,75	1	1	0,97
	≥ 10 <sup>9</sup>	0	9 (45%)	0,45	1	1	0,94
<i>A. vaginae</i> ≥ 10 <sup>8</sup> y/o <i>G. vaginalis</i>	≥ 10 <sup>6</sup>	26 (15%)	20 (100%)	1	0,84	0,43	1
	≥ 10 <sup>7</sup>	13 (7,8%)	20 (100%)	1	0,92	0,61	1
	≥ 10 <sup>8</sup>	11 (6,6%)	20 (100%)	1	0,93	0,64	1
	≥ 10 <sup>9</sup>	6 (3,6%)	20 (100%)	1	0,96	0,77	1
<i>A. vaginae</i> ≥ 10 <sup>9</sup> y/o <i>G. vaginalis</i>	≥ 10 <sup>6</sup>	25 (15%)	20 (100%)	1	0,85	0,44	1
	≥ 10 <sup>7</sup>	12 (7,2%)	19 (95%)	0,95	0,93	0,61	0,99
	≥ 10 <sup>8</sup>	7 (4,2%)	19 (95%)	0,95	0,96	0,73	0,99
	≥ 10 <sup>9</sup>	1	19 (95%)	0,95	0,99	0,95	0,99

\*Número de FN y número de VB identificadas de 167 FN ensayadas (%) y 20 VB ensayadas (%)\* respectivamente  
 \*\*Sensibilidad y especificidad del umbral de cuantificación para la identificación de las VB  
 \*\*\*VPP valor predictivo positivo y VPN valor predictivo negativo

10 **Tabla 6.** Seguimientos bacteriológicos de 8 pacientes que presentan una vaginosis bacteriana o una flora intermedia por la puntuación de Nugent. Correspondencia entre la clasificación por la puntuación de Nugent y la identificación de la VB por criterios moleculares.

Sujeto	Plazo de la extracción vaginal	Clasificación por puntuación de Nugent	Tratamiento	VB por criterios moleculares	Plazo de parto	Peso del recién nacido (gramo)
1	24 SA	VB	Sí	Sí	39 SA	3420
	28 SA	FN				
	38 SA	FN				
2	27 SA	FI		Sí	40 SA	3090
	39 SA	FI				
3	6 SA	FN			40 SA	3490
	28 SA	FI				
	32 SA	FI				
4	6 SA	FI		Sí	38 SA	3580
	31 SA	FN				
	37 SA	FN				
	40 SA	FN				



(continuación)

Sujeto	Plazo de la extracción vaginal	Clasificación por puntuación de Nugent	Tratamiento	VB por criterios moleculares	Plazo de parto	Peso del recién nacido (grammo)
5	26 SA 31 SA	FI FI		Sí Sí	38 SA	2970
6	31 SA 39 SA	FN FI		Sí	39 SA	2700
7	25 SA 29 SA	VB FN	Sí	Sí	37 SA	4100
8	27 SA 30 SA 32 SA	VB FN FN	Sí	Sí	38 SA	2700

**Listado de secuencias**

- 5 <110> UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE (Aix-Marseille II)  
 <120> Método de diagnóstico y de seguimiento de una vaginosis bacteriana mediante cuantificación molecular
- 10 <130> H52 437 caso 19 FR  
 <160> 28  
 <170> PatentIn version 3.1
- 15 <210> 1  
 <211> 135  
 <212> ADN  
 <213> Albúmina humana
- 20 <400> 1  
 gctgtcatct cttgtgggct gtaatcatcg tttaagagta atattgcaaa acctgtcatg 60  
 cccacacaaa tctctccctg gcattgttgt ctttgcagat gtcagtgaaa gagaaccagc 120  
 agctcccatg agttt 135
- <210>2  
 <211> 81  
 25 <212> ADN  
 <213> *atopobium vaginae*
- <400> 2  
 ccctatccgc tcttgatacc ggcaggcttg agtctggtag gggaagatgg aattccaagt 60  
 gtgaaatgcg cagatatattg g 81
- 30 <210>3  
 <211> 86  
 <212> ADN  
 <213> *Gardnerella vaginalis*
- 35 <400> 3  
 cgcattctgct aaggatggtg aaacatcgtt taaggctact gcaactatct ctgcagcaga 60  
 tcctgaagtt ggcgaaaaga ttgctg 86
- 40 <210>4  
 <211> 90  
 <212> ADN  
 <213> *Lactobacillus sp.*

ES 2 371 202 T3

	<400> 4		
	tacatcccaa ctccagaacg tgatactgac aagccattct taatgcagtt gaagacgtat		60
	ttactatcac tggtcgtggt actgttgctt		90
5	<210>5 <211> 20 <212> ADN <213> <i>atopobium vaginae</i>		
10	<400> 5		
	ccctatccgc tctgatacc	20	
15	<210>6 <211> 20 <212> ADN <213> <i>atopobium vaginae</i>		
20	<400> 6		
	ccaaatatct ggcattca	20	
25	<210>7 <211> 23 <212> ADN <213> <i>atopobium vaginae</i>		
30	<400> 7		
	gcaggcttga gtctgtagg gga	23	
35	<210>8 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Gardnerella vaginalis</i>		
40	<400> 8		
	cgcatctgct aaggatgtg	20	
45	<210>9 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Gardnerella vaginalis</i>		
50	<400> 9		
	cagcaatctt ttcccaact	20	
55	<210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> <i>Gardnerella vaginalis</i>		
	<400> 10		
	tgcaactatt tctgcagcag atcc	24	
60	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Lactobacillus sp.</i>		
	<400> 11		

ES 2 371 202 T3

	tacatcccaa ctccagaacg	20
	<210> 12	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Lactobacillus sp.</i>	
	<400> 12	
10	aagcaacagt accacgacca	20
	<210> 13	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Lactobacillus sp.</i>	
	<400> 13	
20	tgacaagcca ttctaatgc a	21
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> Albúmina humana	
	<400> 14	
30	gctgtcatct cttgtgggct gt	22
	<210> 15	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Albúmina humana	
35	<400> 15	
40	aaactcatgg gagctgctgg ttc	23
	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Albúmina humana	
45	<400> 16	
50	cctgtcatgc ccacacaaat ctctcc	26
	<210> 17	
	<211> 141	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Fragmento del exón 12 del gen de la albúmina humana de las posiciones 16283 a 16423 modificado por inserción del sitio de escisión XhoI	
	<400> 17	
	gctgtcatct cttgtgggct gtaatcatcg tctcgagtta agagtaatat tgcaaaacct	60
	gtcatgccca cacaaaatctc tccttggcat tgttgtcttt gcagatgtca gtgaaagaga	120
	accagcagct cccatgagtt t	141
60	<210> 18	
	<211>939	
	<212> ADN	

ES 2 371 202 T3

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia que combina unas secuencias de *Mobilincus curtisii*, *Mobilinc us mulieris*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus sp*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Candida albic ans* y albúmina humana

<400> 18

```

gccatggaaa aggtgggtca agagggcgtc atcaccgtgg aagaacatcg tctcgagtta      60
aggagcctcg aagtcaccga aggtatgcgt ttcattatgg atatgcgtgt ggatggatta      120
ctcgagctgc ctgttttggg tgggggcgct atcggggttt gggcttacat gcctggccct      180
cgcacatctgct aaggatgttg aaacatcgtc tcgagttaag gctactgcaa ctatttctgc      240
agcagatcct gaagttggcg aaaagattgc tgaatacatc ccaactccag aacgtgatac      300
tgacaagcca ttcttaatgc cagttgaaga cgtatttact atcactggtc gtggtactgt      360
tgcttctata ctggtgaccg tcctatccaa gttggatcac atcgtctcga gttaagaaca      420
aatagtgcac tagtattctt tgatgaaaaa ggaaacgaag acaaagaacg taaagttgct      480
tatggacgtc gtttcgatat tccatcaggt aattgattgc tgcaggtgat acatttagag      540
cagcggcagt tgaacaattc atcgtctcga gttaaggagt tggggctgat attgtaacac      600
10 caaaccctta tccgctcctg ataccggcag gcttgagtct ggtaggggaa gatggaattc      660
caagtctcga ggtgaaatgc gcagatattt ggaagccaac gccaacgaag acaaggcact      720
tcaaaaagcc gatggtagta gaaaactgcg acatcgtctc gagttaagtt ggttgatgca      780
aacaaagctg gtagttgctg tcatctcttg tgggctgtaa tcatcgtctc gagttaagag      840
taatattgca aaacctgtca tgcccacaca aatctctccc tggcattggt gtctttgcag      900
atgtcagtga aagagaacca gcagctccca tgagtttgg      939

```

<210> 19

<211>178

15 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de *Mobilincus curtisii* y *Mobilincus mulieris*

<400> 19

```

gccatggaaa aggtgggtca agagggcgtc atcaccgtgg aagaacatcg tctcgagtta      60
aggagcctcg aagtcaccga aggtatgcgt ttcattatgg atatgcgtgt ggatggatta      120
ctcgagctgc ctgttttggg tgggggcgct atcggggttt gggcttacat gcctggcc      178

```

<210> 20

25 <211> 183

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia de *Gardnerella vaginalis* y *Lactobacillus sp*

<400> 20

ES 2 371 202 T3

	cgaccagtga tagtaaatac gtcttcaact ggcattaaga atggcttgtc agtatcacgt	60
	tctggagttg ggatgtattc agcaatcttt tgcccaactt caggatctgc tgcagaaata	120
	gttgcagtag ccttaactcg agacgatggt tcaacatcct tagcagatgc gagggccagg	180
	cat	183
	<210> 21	
	<211> 145	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Ureaplasma urealyticum</i>	
	<400> 21	
	tcactggtcg tggactggt gcttctatac tggtgaccgt cctatccaag ttggatcaca	60
	tcgctcgcag ttaagaacaa atagtgcatt agtattcttt gatgaaaaag gaaacgaaga	120
	caaagaacgt aaagttgctt atgga	145
10	<210> 22	
	<211> 188	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mycoplasma hominis</i>	
15	<400> 22	
	cttggaaattc catcttcccc taccagactc aagcctgccg gtatcaggag cggatagggg	60
	tttgggtgta caatatcagc cccaactcct taactcgaga cgatgaattg ttcaactgcc	120
	gctgctctaa atgtatcacc tgcagcaatc aattacctga tggaatatcg aaacgacgtc	180
	cataagca	188
	<210> 23	
20	<211> 150	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia de <i>Atopobium vaginae</i> y <i>Candida albicans</i>	
	<400> 23	
	gaattccaag tctcgaggtg aatgctgag atatttggaa gccaacgcca acgaagacaa	60
	ggcacttcaa aaagccgatg gtagtagaaa actgctgacat cgtctcgagt taagttggtt	120
	gatgcaaaca aagctggtag ttgctgtcat	150
	<210> 24	
30	<211> 145	
	<212> ADN	
	<213> Albúmina humana	
35	<400> 24	

# ES 2 371 202 T3

	ccaaactcat gggagctgct ggttctcttt cactgacatc tgcaaagaca acaatgccag	60
	ggagagattt gtgtgggcat gacaggtttt gcaatattac tcttaactcg agacgatgat	120
	tacagcccac aagagatgac agcaa	145
5	<210> 25 <211> 19 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador <400> 25	
	gccatggaaa agtgggct	19
15	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador <400> 26	
25	cctgatggaa tatcgaaacg a	21
30	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 27 actggtgacc gtcctatcca	20
40	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador <400> 28 ccaaactcat gggagctgct	20

## REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico y de seguimiento *in vitro* del estado de la flora bacteriana vaginal frente a la presencia de una vaginosis bacteriana y, llegado el caso, para el seguimiento de su tratamiento terapéutico, caracterizado porque

- 1/ se cuantifican las concentraciones de bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis*

\* determinando las concentraciones de secuencias específicas de dichas bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* presentes en una sola copia en el ADN de dichas bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* respectivamente, y de una secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica que contiene unas células humanas, en el ADN extraído de una muestra de secreción vaginal de paciente, presentando dichas secuencias específicas un tamaño inferior a 150 nucleótidos,

\* mediante co-amplificación enzimática de tipo PCR de dichas secuencias específicas contenidas, por un lado, en dicho ADN extraído de la muestra y, por otro lado, en unas muestras de fragmentos de ADN sintéticos que comprenden cada una de dichas secuencias específicas dichas bacterias y dicha secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica de células humanas, sirviendo dichas muestras de estándar de calibrado de cuantificación del ADN,

\* realizándose la detección y la cuantificación de dichos fragmentos con la ayuda de sondas marcadas de secuencias distintas de las de los cebadores de amplificación para cada una de dichas secuencias específicas de dichas bacterias *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* y dicha secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica que contiene unas células humanas,

\* siendo dichas secuencias específicas de dichas bacterias las secuencias siguientes, que incluyen unas secuencias de dichas sondas (subrayadas) flanqueadas por unas secuencias de dichos cebadores (en negrita) o sus secuencias complementarias:

- para *Atopobium vaginae*:

**Sec. n°2 = 5'-CCTATCCGCTCCTGATACCGGCAGGCTTGAGTCT  
GGTAGGGGAAGATGGAATTCCAAGTGTGAAATGCGCAGATATTTGG  
-3'**

- para *Gardnerella vaginalis*:

**Sec. n°3 = 5'-GCATCTGCTAAGGATGTTGAAACATCGTTTAAGG  
CTACTGCAACTATTTCTGCAGCAGATCCTGAAGTTGGCGAAAAGATT  
GCTG-3',**

y

- 2/ se determina la presencia de una vaginosis bacteriana o el fracaso del tratamiento terapéutico en curso, con un valor predictivo positivo de por lo menos 95% y un valor predictivo negativo de por lo menos 99%, si las concentraciones de fragmentos de ADN de las dos secuencias específicas de las bacterias *Atopobium vaginae* y respectivamente *Gardnerella vaginalis* en una muestra de extracción de secreciones vaginales de paciente que contiene por lo menos  $10^4$  células humanas/ml, son tales que se respeta una por lo menos de las 2 condiciones a) y b) siguientes:

a) la concentración Ca en dicho fragmento de ADN de *Atopobium vaginae* es superior o igual a  $10^8$  copias/ml, y  
b) la concentración Cg en dicho fragmento de ADN de *Gardnerella vaginalis* es superior o igual a  $10^9$  copias/ml.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque:

- a/ en la etapa 1/, se cuantifican además las bacterias *Lactobacillus sp.* que comprenden por lo menos las bacterias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus iners*,

\* determinando además la concentración de una secuencia específica de dichas bacterias *Lactobacillus sp.*, estando dicha secuencia específica de los *Lactobacillus sp.* presente en una sola copia en el ADN de dichas bacterias *Lactobacillus sp.*, y siendo de tamaño inferior a 150 nucleótidos,

- 5 \* mediante co-amplificación enzimática de tipo PCR adicional de dicha secuencia específica de las bacterias *Lactobacillus sp.* contenida, por un lado, en dicho ADN extraído de la muestra y, por otro lado, en una muestra de fragmentos de ADN sintético que comprende, además, dicha secuencia específica de dichas bacterias *Lactobacillus sp.*, comprendiendo dicho fragmento de ADN sintético dicha secuencia específica de dichas bacterias *Lactobacillus sp.* que sirven de estándar de calibración de cuantificación,
- 10 \* siendo la detección y la cuantificación de dichos fragmentos realizadas con la ayuda de sondas marcadas de secuencias distintas de las de los cebadores de amplificación para cada una de dichas secuencias específicas de dichas bacterias *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus sp.* y dicha secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica que contiene unas células humanas, y
- 15 - b/ en la etapa 2/, se determina una vaginosis bacteriana si, además, la concentración CI en fragmento de ADN específico de dichas bacterias *Lactobacillus sp.* es inferior o igual a  $10^8$  copias/ml, preferentemente inferior o igual a  $10^7$  copias/ml.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque se determina una vaginosis bacteriana si dichas concentraciones son tales que se respetan las 3 condiciones siguientes:
- a- concentración Ca en dicho fragmento de ADN de secuencia específica de *Atopobium vaginae* es superior o igual a  $10^8$  copias/ml,
- 25 b- concentración Cg en dicho fragmento de ADN de secuencia específica de *Gardnerella vaginalis* es superior o igual a  $10^9$  copias/ml, y
- c- concentración CI en dicho fragmento de ADN de secuencia específica de *Lactobacillus sp.* es inferior o igual a  $10^7$  copias/ml.
- 30 4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se realizan unas reacciones de amplificación y de cuantificación mediante PCR en tiempo real, utilizando unas sondas de hidrólisis específicas respectivamente de cada una de dichas secuencias específicas de dichas bacterias y secuencia específica de un gen humano presente en cualquier extracción biológica que contiene unas células humanas, en la muestra a ensayar.
- 35 5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque dichas secuencias específicas presentan un tamaño de 70 a 150 nucleótidos, preferentemente de 90 a 120 nucleótidos.
- 40 6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se utiliza un gran fragmento sintético de ADN que sirve de estándar de calibrado de cuantificación del ADN, agrupando dicho gran fragmento de ADN sintético dichas secuencias específicas respectivamente de cada una de dichas bacterias cuyas concentraciones son cuantificadas, y dicha secuencia de ADN humano específico de células humanas.
- 45 7. Método según la reivindicación 1 a 6, caracterizado porque dichas secuencias específicas de dichas bacterias comprenden para la bacteria *Lactobacillus sp.*, una secuencia común a las bacterias *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus acidophilus* en el seno del gen *tuf* que codifica para el factor de elongación en las posiciones 253 a 343 del gen de referencia Genbank AY 562191.1.
- 50 8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque dicha secuencia específica para *Lactobacillus sp.* es la secuencia siguiente que incluye una sonda (subrayada) flanqueada por unas secuencias de dichos cebadores (en negrita) o sus secuencias complementarias:
- Sec. n°4 = 5'-TACATCCCAACTCCAGAACGTGATACTGACAAGC**  
**CATTCTTAATGCAGTTGAAGACGTATTTACTATCACTGGTCGTGGTA**  
**CTGTTGCTT-3'**
- 55 9. Método según una de las reivindicaciones 6 y 8, caracterizado porque dicho gran fragmento de ADN comprende, como secuencia específica de ADN humano en la muestra a ensayar, una secuencia específica de la albúmina.
- 60 10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque dicha secuencia específica de ADN humano en la muestra a ensayar comprende el fragmento de las posiciones 16283-16423 del exón 12 del gen de la albúmina humana de referencia Genbank M12523.1 de secuencia del listado de secuencias siguiente o la secuencia complementaria:



Sec. n°1 = 5'-**GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGTTTA**  
 AGAGTAATATTGCAAAACCTGTCATGCCACACAAATCTCTCCCTGGC  
 ATTGTTGTCTTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGAACCAGCAGCTCCCAT  
**GAGTTT-3'**

- 5 11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicha secuencia específica de ADN humano en la muestra a ensayar comprende el fragmento de las posiciones 16283-16423 del exón 12 del gen de la albúmina humana de referencia Genebank M12523.1 modificada mediante inserción de un sitio de escisión, en particular el sitio XhoI (secuencia entre paréntesis), fuera de las secuencias que corresponden a los cebadores (secuencias en negrita) y secuencia sonda (secuencia subrayada) de secuencia del listado de secuencias siguiente o la secuencia complementaria:

Sec. n°17 = 5'-**GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGT**(CT  
 CGAG)TTAAGAGTAATATTGCAAAACCTGTCATGCCACACAAATCTC  
TCCCTGGCATTGTTGTCTTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGAACCAGCA  
**GCTCCCATGAGTTT-3'**

- 10 12. Método según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque se utilizan los juegos de cebadores y de sondas seleccionados, llegado el caso, de entre las secuencias siguientes del listado de secuencias o respectivamente sus secuencias complementarias:

- para *Atopobium vaginae*:

- 15 Cebador 5': Sec. n° 5 = 5'-CCCTATCCGCTCCTGATACC-3'  
 Cebador 3': Sec. n° 6 = 5'-CCAAATATCTGCGCATTTC-3'  
 Sonda: Sec. n° 7 = 5'-GCAGGCTTGAGTCTGGTAGGGGA-3'

20 - para *Gardnerella vaginalis*:

- Cebador 5': Sec. n° 8 = 5'-CGCATCTGCTAAGGATGTTG-3'  
 Cebador 3': Sec. n° 9 = 5'-CAGCAATCTTTTCGCCAACT-3'  
 Sonda: Sec. n° 10 = 5'-TGCAACTATTTCTGCAGCAGATCC-3'

25 - para *Lactobacillus sp.*:

- 30 Cebador 5': Sec. n° 11 = 5'-TACATCCCAACTCCAGAACG-3'  
 Cebador 3': Sec. n° 12 = 5'-AAGCAACAGTACCCACGACCA-3'  
 Sonda: Sec. n° 13 = 5'-TGACAAGCCATTCTTAATGCA-3',

- para la albúmina humana:

- 35 Cebador 5': Sec. n° 14 = 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'  
 Cebador 3': Sec. n° 15 = 3'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3'  
 Sonda: Sec. n° 16 = 5'-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-3'

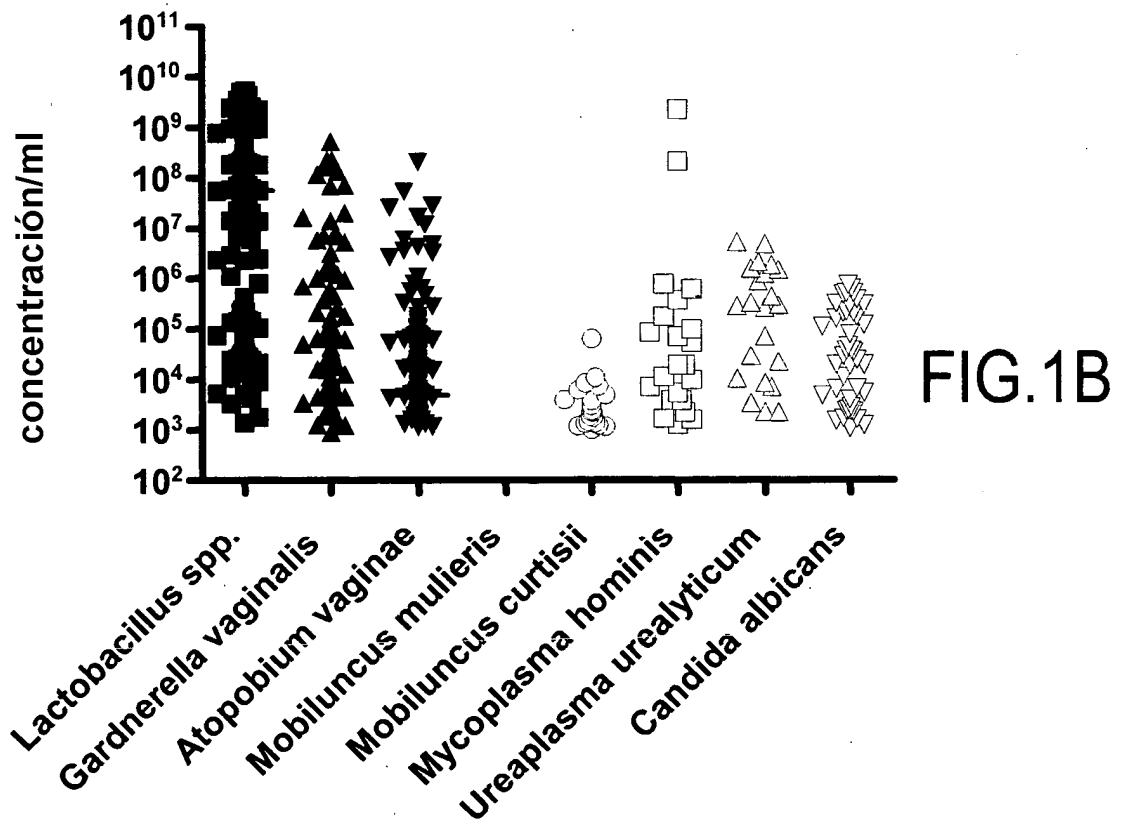
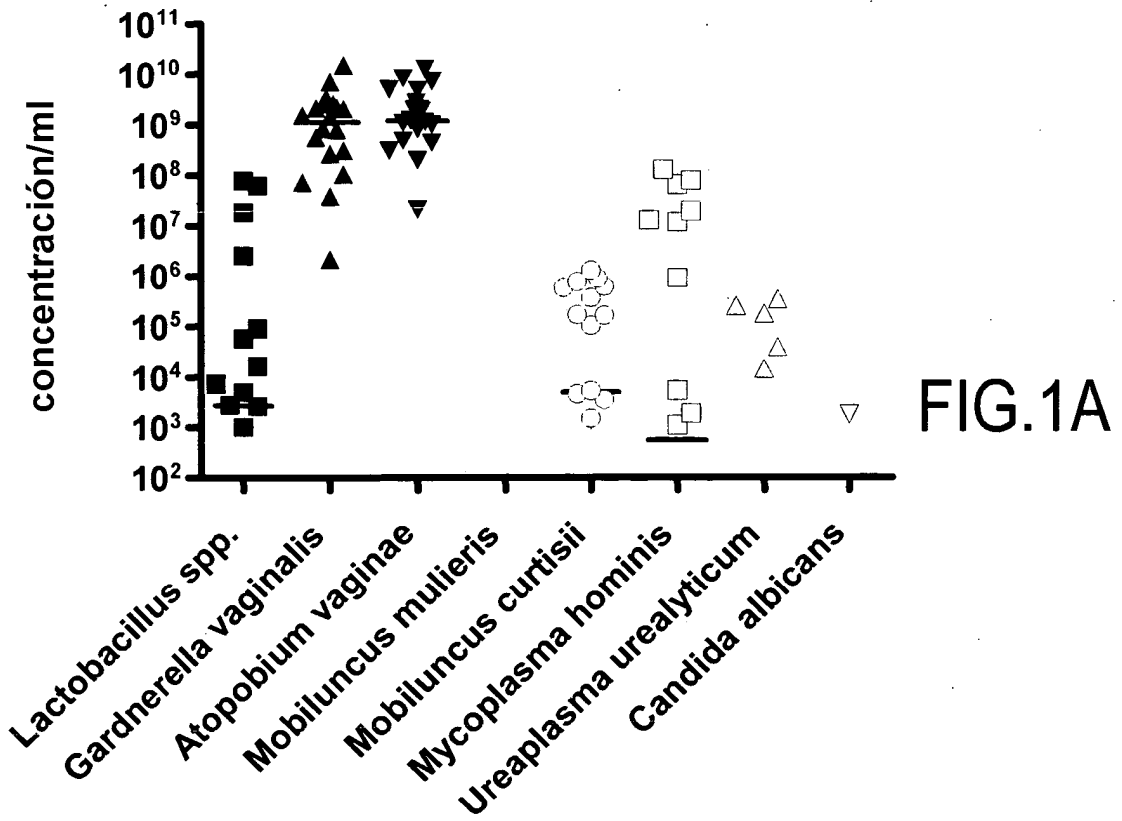
- 40 13. Método según una de las reivindicaciones 6 a 12, caracterizado porque dicho gran fragmento de ADN sintético constitutivo del ADN de la muestra estándar de calibrado de la cuantificación se inserta en un plásmido.

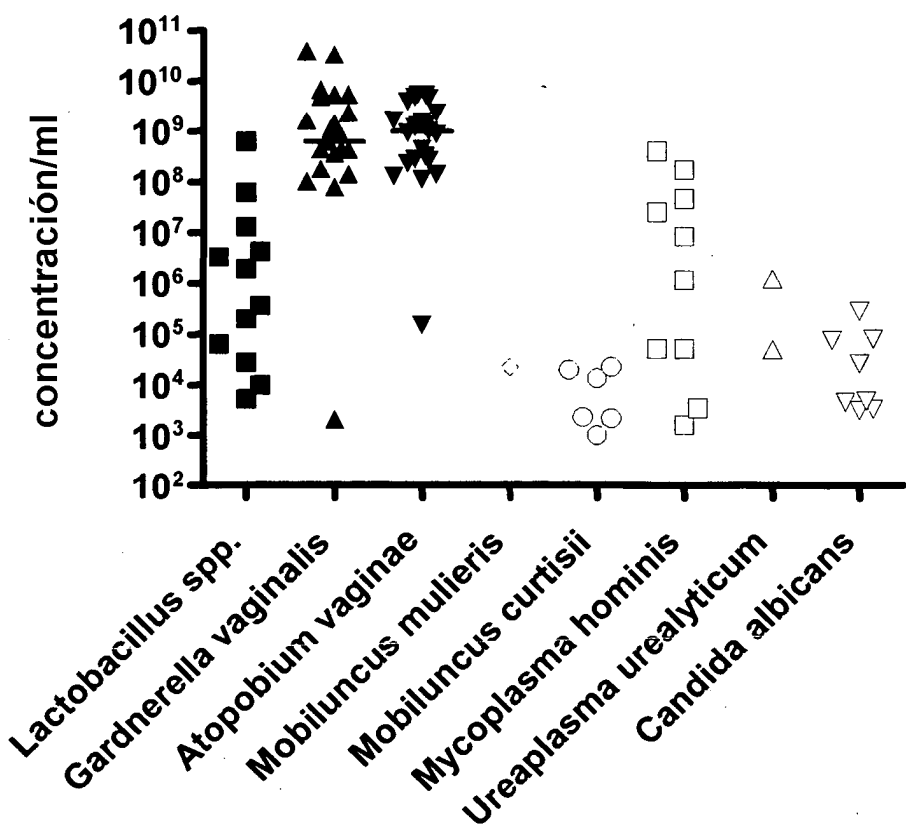
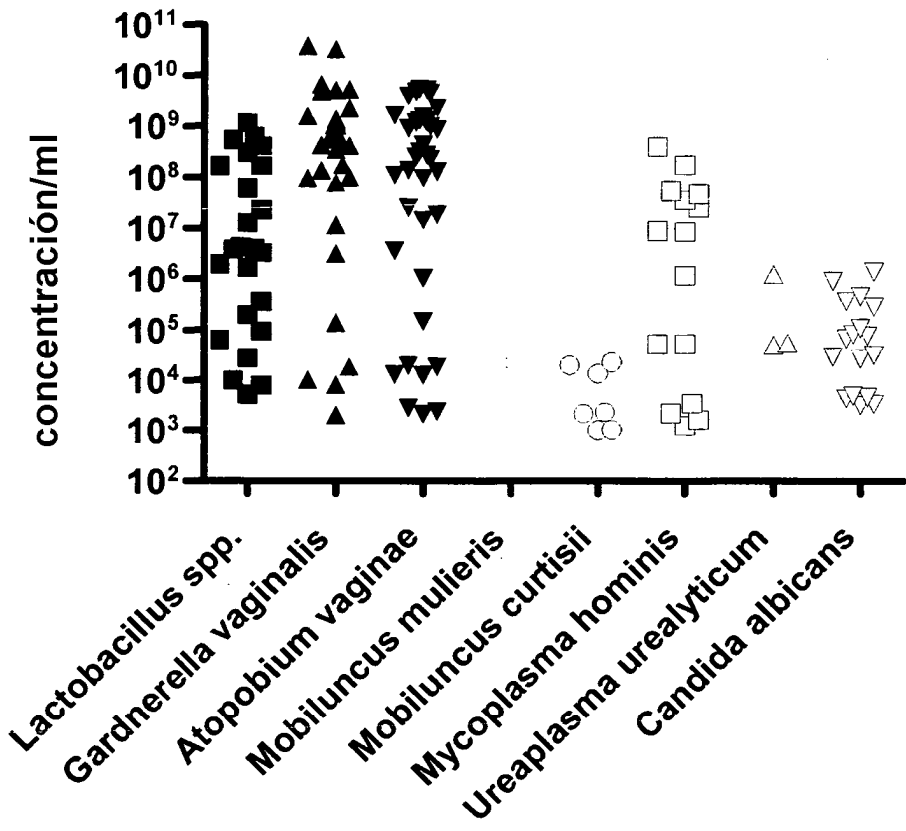
- 40 14. Estuche de diagnóstico útil para la realización de un método según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque comprende

- 45 - unas muestras de ADN estándar de calibrado que comprende dichas secuencias específicas de cada una de dichas bacterias tales como las definidas en una de las reivindicaciones 1, 5, 7 y 8, preferentemente dicha secuencia específica del ADN humano tal como la definida en las reivindicaciones 1, 9, 10 y 11 y, más preferentemente, dicho gran fragmento de ADN sintético tal como el definido en las reivindicaciones 6 y 13, así como

- 50 - dichos juegos de cebadores específicos de dichos fragmentos de ADN sintéticos modificados específicos de dichas bacterias y más preferentemente, dichas sondas tales como las definidas en una de las reivindicaciones 1, 4, 8 y 12, y

- unos agentes reactivos de realización de una reacción de amplificación de ADN de tipo PCR.





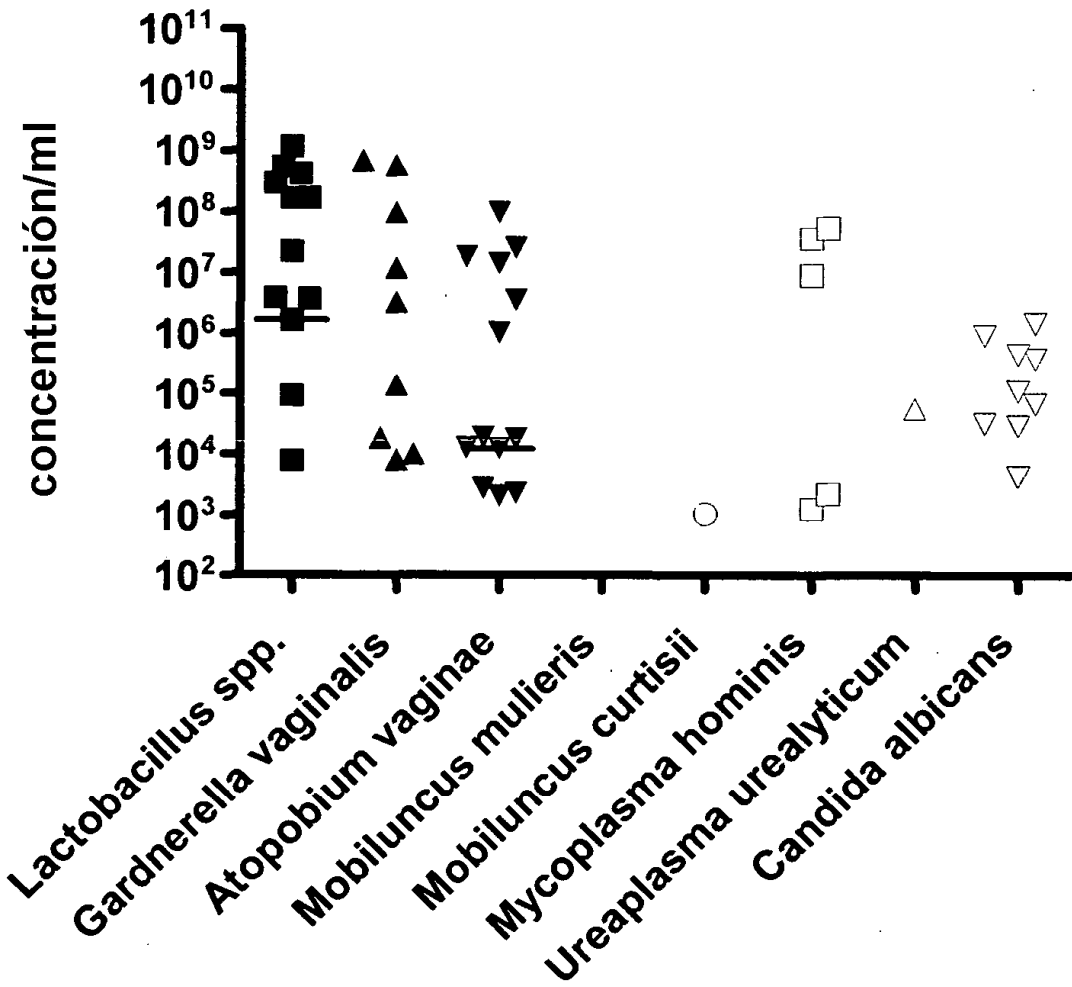


FIG.4