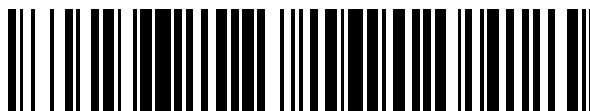


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 141**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05447160 .2**
96 Fecha de presentación: **30.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1612283**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54 Título: **DETECCIÓN ESPECÍFICA DEL GENOTIPO DE CHLAMYDOPHILA PSITTACI.**

30 Prioridad:
30.06.2004 US 584725 P

73 Titular/es:
**UNIVERSITEIT GENT
SINT-PIETERSNIEUWSTRAAT 25
9000 GENT, BE**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.02.2012

72 Inventor/es:
Vanrompay, Daisy

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.02.2012

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 375 141 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección específica del genotipo de *Chlamydophila psittaci*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la detección cualitativa y cuantitativa de genotipos de *Chlamydiaceae* así como a la detección y el diagnóstico de infecciones bacterianas en mamíferos, incluidos seres humanos y aves. La invención se refiere, además, a la detección de una nueva cepa de una bacteria infecciosa.

10

Antecedentes de la invención

Bacterias de la familia de las *Chlamydiaceae* son parásitos intracelulares obligados de células eucarióticas. En animales, las *Chlamydophilae* son capaces de inducir un amplio espectro de síntomas tales como enteritis, infección urogenital, aborto, neumonía, poliartritis, poliserositis, encefalitis y mastitis. *Chlamydophila (Cp.) psittaci* (anteriormente *Chlamydia psittaci*) provoca enfermedades respiratorias en aves y la psitacosis o fiebre del loro en hombres. Hasta ahora, la detección de *Cp. psittaci* en muestras de aves se ha llevado a cabo de forma rutinaria mediante visualización directa de los organismos utilizando tinciones citológicas, mediante el aislamiento en cultivo de células o huevos embrionados específicos, exentos de patógenos, mediante detección de antígenos de *Cp. psittaci* o mediante ensayos serológicos de medición de anticuerpos. Las tinciones citológicas tienen una deficiente sensibilidad y especificidad y solamente se pueden utilizar como un método de investigación preliminar rápido. La desventaja principal del aislamiento es la necesidad de bacterias viables. Esto significa requisitos especiales para la recogida y el almacenamiento de muestras, requisitos que no siempre se pueden cumplir cuando se recogen muestras en el campo. Además, el aislamiento es laborioso y costoso y únicamente se puede realizar en laboratorios con un nivel de bioseguridad específico, ya que *Cp. psittaci* es un agente zoonótico que se esparce mediante aerosol. Los actuales métodos de detección de antígenos rápidos no se recomiendan para demostrar *Cp. psittaci* en aves individuales debido a defectos en la sensibilidad o especificidad. La serología no es particularmente útil para diagnosticar una infección activa por *Cp. psittaci* en aves, debido al alto predominio de esta infección en aves y a la persistencia durante largo tiempo (de hasta varios meses) de anticuerpos anti-*Cp. psittaci*. Además, la detección de anticuerpos basada en utilizar organismos completos, los LPS (lipopolisacáridos) o fracciones de la membrana externa, pueden generar falsos positivos debido a la presencia de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con los LPS de *Cp. psittaci* o proteínas de choque térmico. De manera importante, los actuales ensayos de detección de anticuerpos de *Cp. psittaci* no pueden utilizarse para demostrar una infección por *Cp. psittaci* en hombres, dado que los seres humanos también pueden verse infectados con otros miembros de las *Chlamydiaceae* tal como *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, (anteriormente *Chlamydia pneumoniae*) y *Chlamydophila abortus* (anteriormente *psittaci* serotipo 1) que pueden provocar resultados falsos positivos. El diagnóstico de la infección con *Cp. psittaci* ha sido difícil y engorroso. Hasta ahora, la detección de *Cp. psittaci* en muestras de aves se realiza con ensayos serológicos, proporcionando, tal como se ha indicado arriba, solamente información retrospectiva.

Cp. psittaci ha sido clasificada en seis serovares de aves (A a F) utilizando un panel de anticuerpos monoclonales específicos para serovares contra la proteína principal de la membrana externa (MOMP – siglas en inglés). La MOMP es codificada por el gen *OmpA*, y el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP – siglas en inglés) de *OmpA* revela seis genotipos correspondientes. Hasta ahora, los genotipos A, C, y D son los genotipos más comunes asociados con la psitacosis humana. SUDLER et al. ("Molecular characterisation of chlamydial isolates from birds". VETERINARY MICROBIOLOGY, 2004) describe un método in vitro para la identificación de ADN de los genotipos A, B, F y G de *C. psittaci*, utilizando 2 oligonucleótidos específicos para *OmpA*, seguido de una digestión por restricción. Las muestras proceden de aves. Mientras que el análisis de RFLP del gen *OmpA* que codifica la MOMP permite una detección específica de los genotipos de *Cp. psittaci*, patrones de restricción en el RFLP son a veces difíciles de analizar, y la amplificación de *OmpA* no siempre se puede llevar a cabo directamente en muestras clínicas. Además de ello, este método requiere la amplificación del gen *OmpA* de 1200 pb completo, la cual fracasa a menudo cuando está disponible una cantidad limitada de ADN. La micro-inmunofluorescencia indirecta (IMIF – siglas en inglés) con anticuerpos monoclonales requiere siempre un cultivo y, por lo tanto, es costosa y laboriosa y, en definitiva, es menos sensible que la determinación del genotipo por medio de RFLP o el análisis de la secuencia de *OmpA* completa. Aparte de los problemas de diagnóstico entre especies en los ensayos serológicos y las dificultades dentro de la misma especie cuando se trata con infecciones mixtas en RFLP o el serotipado, estos ensayos tienen todos el problema de que no proporcionan información sobre el número real de partículas infecciosas en la muestra, haciendo también difícil o imposible seguir un tratamiento o averiguar el origen de una infección. La presente perspectiva ilustra la necesidad de un ensayo diagnóstico específico para determinar el genotipo de *Cp. psittaci* en aves y mamíferos, incluido el hombre. Un ensayo de este tipo debería ser rápido y sensible.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para la identificación de la presencia de uno o más genotipos de *Cp. psittaci* en una muestra. Así, la presente invención proporciona un método para la determinación de la presencia de *Cp. psittaci* en una muestra, así como un método para identificar específicamente entre los diferentes genotipos de *Cp. psittaci*, qué genotipo está presente en la muestra, permitiendo así la determinación del agente activamente infeccioso, incluso cuando las muestras se toman de un animal o ser humano que ha sido previamente infectado con *Cp. psittaci*.

Una realización específica de la invención se refiere a un método para detectar un nuevo genotipo de *Cp. psittaci*, al que se alude como genotipo EB. Realizaciones adicionales de la invención se refieren a métodos para detectar e identificar la presencia de los genotipos A, B, C, D, E y F.

De acuerdo con una realización específica adicional, el método *ex vivo* o *in vitro* para la detección y/o identificación de la presencia de ADN de un genotipo de *Cp. psittaci* en una muestra comprende las etapas de (a) incubar la muestra con un primer oligonucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a ADN de un genotipo de *Cp. psittaci*, y (b) determinar la unión del primer oligonucleótido a ADN dentro de la muestra, unión que es indicativa de la presencia de ADN de un genotipo de *Cp. psittaci* en esa muestra. De acuerdo con realizaciones específicas de la invención, la detección y/o identificación se realizan utilizando un primer nucleótido que comprende una secuencia de al menos 15 nucleótidos del gen *OmpA* de uno de los genotipos de *Cp. psittaci*, más específicamente que comprende una secuencia de al menos 15 nucleótidos dentro de la región desde aproximadamente el nucleótido 450 a aproximadamente el nucleótido 600 o desde aproximadamente el nucleótido 900 hasta aproximadamente el 1100 de la secuencia de *OmpA* correspondiente al acceso de GB AF269281 [SEQ ID. NO: 54], que es esencialmente idéntica a una secuencia de 15 nucleótidos dentro del gen *OmpA*, más particularmente dentro de estas regiones del gen *OmpA*. Realizaciones más particulares de la invención comprenden métodos, en los que el primer oligonucleótido específico para el genotipo se selecciona del grupo que consiste en la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 1 para el genotipo A, la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 2 para el genotipo B, la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 3 para el genotipo C, la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 4 para el genotipo D, la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 5 para el genotipo E, la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 6 para el genotipo F y la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 25 para el genotipo EB o una secuencia esencialmente idéntica a ella, capaz de hibridarse específicamente al genotipo respectivo. Un oligonucleótido de este tipo se puede marcar, p. ej., con un grupo cromóforo en su extremo 5' y con un grupo extintor de fluorescencia en su extremo 3'. Una realización particular de la invención se refiere a la identificación de un genotipo particular de *Cp. psittaci* en una muestra. Se prevé, además, que en realizaciones alternativas, las sondas de la presente invención se puedan combinar para la detección simultánea de más de un genotipo de *Cp. psittaci* en una muestra.

Un aspecto adicional de la invención, se refiere a un método *es vivo* o *in vitro* para la identificación de la presencia de uno o más (primeros) genotipos de *Cp. psittaci* en una muestra según se describe arriba, en el que la especificidad de la detección se mejora adicionalmente mediante el uso de un segundo oligonucleótido que evita la hibridación no específica del primer oligonucleótido al ADN de otro genotipo de *Cp. psittaci*. Así, de acuerdo con esta realización de la invención, la muestra se incuba con al menos un segundo oligonucleótido además del primer oligonucleótido que es capaz de hibridarse específicamente al ADN de un primer genotipo de *Cp. psittaci*, en donde el segundo oligonucleótido es un competidor por la hibridación de este primer oligonucleótido a ADN de otro genotipo de *Cp. psittaci*. De acuerdo con realizaciones particulares de este aspecto de la invención, el primer y segundo oligonucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en (a) un segundo oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y un primer oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, (b) un segundo oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 y un primer oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID. NO: 2; (c) un segundo oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 y un primer oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID. NO: 2; (d) un segundo oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y un primer oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID. NO: 5, y (e) un segundo oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 y un primer oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID. NO: 5.

De acuerdo con una realización particular del método descrito tanto en el primero como en el segundo aspectos de la presente invención, la unión del primer oligonucleótido se determina mediante amplificación por PCR con un cebador directo y un cebador inverso. Más particularmente, los cebadores directo e inverso están situados aproximadamente 1 a 100 pb en 3' y 5' del primer oligonucleótido. Realizaciones específicas de los cebadores para uso en la detección del primer oligonucleótido en el contexto de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en (a) cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, cuando el primer oligonucleótido

comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1; (b) cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2; (c) cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3; (d) cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4; (e) cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5; (f) cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23, cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6; (g) cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24; o cebadores que tienen una secuencia esencialmente idéntica a los cebadores anteriores para la amplificación por PCR. tienen una secuencia esencialmente idéntica a los cebadores anteriores para la amplificación por PCR.

Realizaciones específicas del método de acuerdo tanto con el primero como con el segundo aspectos de la presente invención son métodos utilizados para la detección y/o identificación de un genotipo de *Cp. psittaci* en aves, más particularmente para la detección en aves que ya se encuentran en una fase de desarrollo en la que desaparece la inmunidad materna. Una realización particular de la invención es un método para detectar y/o identificar una infección con *Cp. psittaci* en un pato de aproximadamente seis semanas después de la eclosión.

Aplicaciones específicas de las realizaciones descritas del método de acuerdo tanto con el primero como con el segundo aspecto de la presente invención son la detección y/o identificación de una infección por *Cp. psittaci* en una muestra, con el fin de determinar la eficacia de un tratamiento frente a una infección por *Cp. psittaci*. Así, la presente invención se refiere, además, a métodos para determinar la eficacia del tratamiento de una infección por *Cp. psittaci*, que comprende las etapas de método arriba descritas.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a kits de diagnóstico para la detección y/o identificación de un genotipo de *Cp. psittaci*, que comprenden uno o más oligonucleótidos capaces de hibridarse específicamente a una secuencia dentro del ADN de un genotipo de *Cp. psittaci*. Realizaciones particulares del kit de diagnóstico de la invención se refieren a kits en donde el uno o más oligonucleótidos son capaces de hibridarse específicamente a una secuencia dentro del gen *OmpA* de *Cp. psittaci*. Realizaciones específicas adicionales se refieren a kits en donde el uno o más oligonucleótidos son capaces de hibridarse específicamente a una secuencia dentro de la región desde aproximadamente el nucleótido 450 a aproximadamente el nucleótido 600, o desde aproximadamente el nucleótido 900 hasta aproximadamente el 1100 en la secuencia de un gen *OmpA* correspondiente al acceso de GB AF269281 [SEQ ID NO: 54]. Ejemplos particulares del kit de diagnóstico de la invención se refieren a kits de diagnóstico para la identificación de uno o más de los genotipos seleccionados del grupo que consiste en A, B, C, D, E, F y/o EB, en donde el genotipo EB es un nuevo genotipo de *Cp. psittaci* identificado en esta memoria.

que comprenden uno o más de los oligonucleótidos seleccionados del grupo que consisten en:

- oligonucleótidos específicos para el genotipo: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y 24; y

- cebadores específicos para el genotipo: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26

Sin embargo, se entenderá por parte de la persona experta que oligonucleótidos específicos para el genotipo y cebadores específicos para el genotipo, esencialmente idénticos a los oligonucleótidos y cebadores descritos en esta memoria, se pueden igualmente emplear en el contexto de la presente invención. Realizaciones particulares adicionales de los kits de diagnóstico de la presente invención se refieren a kits que comprenden dos oligonucleótidos seleccionados de los oligonucleótidos específicos para el genotipo SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y 24.

Todavía un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una nueva cepa de una bacteria *Cp. psittaci*, designada como *Cp. psittaci* genotipo EB, que se caracteriza porque comprende la secuencia *OmpA* representada en SEQ ID NO: 51.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar secuencias de oligonucleótidos útiles para la discriminación entre al menos dos genotipos de *Cp. psittaci*. Una realización particular de este aspecto de la invención se refiere a un método que comprende las etapas de a) proporcionar una alineación múltiple de una parte de la secuencia genómica de al menos dos genotipos de *Cp. psittaci*, b) identificar regiones que contengan diferencias de secuencias dentro de esa parte de la secuencia genómica, c) sintetizar uno o más oligonucleótidos

que comprenden una secuencia en donde se producen las diferencias de secuencia arriba identificadas. Lo más particularmente, una secuencia genómica de este tipo se producen las diferencias de secuencia arriba identificadas. Lo más particularmente, una secuencia genómica de este tipo codifica una proteína que provoca patogenicidad tal como la proteína OmpA. Una realización particular de este aspecto de la invención se refiere a un método, en el que la parte de la secuencia genómica que está alineada para identificar las diferencias de la secuencia comprende la secuencia desde aproximadamente el nucleótido 450 hasta aproximadamente el nucleótido 600, o desde aproximadamente el nucleótido 900 hasta aproximadamente el nucleótido 1100 de la secuencia OmpA correspondiente al acceso de GB AF269281 [SEQ ID NO: 54]. Realizaciones particulares de este aspecto de la invención se refieren a métodos para generar secuencias de oligonucleótidos útiles para la discriminación entre el genotipo EB y otro genotipo de *Cp. psittaci*.

Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona oligonucleótidos útiles en la detección y/o identificación de un genotipo de *Cp. psittaci*, lo más particularmente los oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26. Tal como se detalla arriba, la presente invención demuestra la forma en que estos oligonucleótidos pueden emplearse en métodos que permiten la detección y/o identificación específica de un genotipo de *Cp. psittaci*.

Los métodos y kits de la presente invención proporcionan varias ventajas frente a los actuales métodos de detección y/o identificación, tal como sencillos métodos de recogida de muestra, simples requisitos de transporte y almacenamiento de la muestra bacteriana, resultados rápidos, la posibilidad de una automatización y una elevada sensibilidad y especificidad.

La presente invención permite la detección específica del genotipo de *Cp. psittaci* que se basa en la identificación de la presencia de ADN de la bacteria. Permite la detección de la presencia o ausencia de bacterias de *Cp. psittaci* en una contra bacterias de una infección previa. Así, contrariamente a los métodos de detección serotípicos, los métodos y kits de la presente invención permiten la detección y/o identificación de una infección activa.

Además de ello, los métodos y kits de la presente invención permiten la detección específica para la especie y para el genotipo de *Cp. psittaci* en una muestra, p. ej. una muestra procedente de un ser humano que contiene al mismo tiempo una o más infecciones bacterianas provocadas por uno o más organismos seleccionados del grupo que consiste en *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* y *Chlamydophila abortus*.

La presente invención hace posible, además, determinar o confirmar y hacer un seguimiento de la relación entre la aparición de un determinado genotipo y la patogenicidad del mismo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

“**Genotipo**” tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la composición genética real de un organismo según se distingue de su aspecto físico (su fenotipo). Así, mientras que las bacterias pueden tener determinadas propiedades morfológicas que permiten la determinación del organismo hasta el nivel del género, pueden producirse diferencias más sutiles que pueden solamente ser atribuidas mediante la comparación de la secuencia del genoma completo o partes del genoma. Bacterias que pertenecen al mismo género, en esta invención *Cp. psittaci*, pueden tener diferencias en determinadas regiones del genoma (en una realización preferida, el gen *OmpA*) y, por consiguiente, se clasificarán en diferentes genotipos.

La bacteria “***Chlamydophila psittaci***” (abreviada como *Cp. psittaci*) pertenece a la clase de Chlamidiae y se describe en Skerman, V.B.D., McGowan, V., y Sneath, P.H.A. (editores). “Approved lists of bacterial names” *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1980) **30**, 225-420. Sinónimos que han sido utilizados para esta *Bacteriol.* (1980) **30**, 225-420. Sinónimos que han sido utilizados para esta bacteria son *Chlamydia psittaci*, *Chlamydozoon psittaci*, *Rickettsiaformis psittacosis*, *Ehrlichia psittaci* y *Rickettsia psittaci*. En los animales, las *Chlamydiaceae* son capaces de inducir un amplio espectro de síntomas tales como enteritis, infección urogenital, aborto, neumonía, poliartritis, poliserositis, encefalitis y mastitis. Se conocen varios genotipos, designados A a F. De estos genotipos, A, C y D han sido asociados con la mayor frecuencia a la psitacosis humana. Sin embargo, la aparición de psitacosis está subestimada, ya que no están disponibles herramientas rutinarias para determinar el genotipo.

“**Muestra**” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una sustancia sólida o líquida. En el contexto de la presente invención, la muestra es preferiblemente una muestra corporal, es decir, una muestra obtenida del cuerpo

animal o humano, p. ej. una parte del cuerpo, un fluido corporal o cualquier excreción o producto de desecho. De acuerdo con la presente invención, la muestra contendrá ADN de muestra, es decir, ADN que procede del cuerpo del que se obtiene la muestra.

Muestras incluyen, pero sin estar limitadas a sangre, cualquier parte celular del cuerpo, piel, esputo, boca, torundas de la faringe, de la conjuntiva de la nariz o vaginales, orina, muestras fecales, muestras de la respiración que comprenden aerosoles de bacterias o partículas bacterianas, cualquier tipo de muestras de tejido y biopsias tales como pulmones, sacos aéreos, bazo o hígado, u otros órganos. Igualmente, los métodos de la presente invención se pueden realizar en cultivos de células infectados por bacterias. El método se puede realizar en una muestra de bacterias vivas, pero también en una muestra que comprende bacterias muertas, siempre que esté disponible ADN del fragmento de gen a amplificar con el presente método. Debido a su sensibilidad, la muestra puede comprender menos de 10.000, menos de 1.000, menos de 100 o incluso aproximadamente 10 o menos de 10 bacterias *Cp. psittaci* o copias del ADN a amplificar de acuerdo con el método de la presente invención.

“OmpA” en la presente invención se refiere a la proteína A de la membrana externa de *Cp. psittaci*. Como una ilustración, el acceso a Genbank AF269281 [SEQ ID NO: 54] describe la secuencia de ADN y de proteínas de una cepa de *Chlamydophila psittaci*. En la Figura 1 se presentan secuencias parciales de OmpA de *Cp. psittaci* de diferentes cepas.

bajo condiciones rigurosas. La hibridación de ácidos nucleicos se verá afectada por condiciones tales como concentración salina, temperatura o disolventes orgánicos, además de por la composición de la base, la longitud de las cadenas complementarias y el número de desapareamientos de las bases de nucleótidos entre los ácidos nucleicos hibridantes, según se apreciará fácilmente por los expertos en la técnica. Condiciones de temperatura estrictas incluirán generalmente temperaturas superiores a 30°C, típicamente superiores a 37°C y, preferiblemente, superiores a 45°C. Condiciones salinas estrictas serán habitualmente menores que 1000 mM, típicamente menores que 500 mM y, preferiblemente, menores que 200 mM. Así, un oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente al ADN de un genotipo particular de *Cp. psittaci* se refiere a un genotipo capaz de hibridarse al mismo bajo condiciones estrictas.

“Esencialmente idéntica”, utilizada en esta memoria en el contexto de una secuencia que es esencialmente idéntica a una secuencia específica de un oligonucleótido primero (o competidor) proporcionado en esta memoria se refiere a una secuencia que difiere en uno a tres nucleótidos de la secuencia específica proporcionada. Los nucleótidos en los que difiere son nucleótidos seleccionados por la persona experta de modo que no afecten a la especificidad del oligonucleótido hacia su ADN del genotipo. Lo más particularmente, los nucleótidos seleccionados son nucleótidos que son idénticos dentro de la secuencia de ADN de los diferentes genotipos de *Cp. psittaci*. En el contexto de las secuencias de cebadores de PCR proporcionadas, “esencialmente idéntica” se refiere a una secuencia que difiere de la secuencia proporcionada como máximo en 5 nucleótidos, sin afectar a su capacidad de funcionar como un cebador de PCR para el respectivo primer oligonucleótido.

La presente invención se refiere a la detección y/o identificación específicas de un genotipo de *Cp. psittaci* en una muestra. De acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, la muestra procede de un ser humano o de un mamífero no humano tal como ganado, cerdos, gatos, perros, aves (tales como aves de corral ejemplificadas por patos, pollos, avestruces, pavos, palomas mensajeras y urbanas y aves mascota (p. ej. loros)). La presente invención proporciona un ensayo genético específico para el genotipo para el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento de infecciones por *Cp. psittaci* de muestras respiratorias de animales tales como se describen bien particularmente en aves (ornitosis) y seres humanos (psitacosis).

En una realización, la muestra es una muestra de un ave que se encuentra en una fase de desarrollo cuando desaparece la inmunidad materna del ave y es probable una infección con *Cp. psittaci*. En general, disminuyen los títulos de anticuerpos maternos contra una infección y casi están ausentes a las 3 a 4 semanas de edad. Los pavos experimentan normalmente dos ondas infecciosas por *Cp. psittaci*, una a las 3 a 4 semanas y la segunda a las 8 a 10 semanas de edad. Por consiguiente, el método de la presente invención se realiza ventajosamente en pavos en estos intervalos de tiempo. Dependiendo de las especies animales, este intervalo de tiempo en el que desaparece la inmunidad materna varía. Cuando el animal es un pato, el método se realiza ventajosamente aproximadamente 6 semanas después de la eclosión del huevo. Aplicaciones adicionales de los métodos y kits de la presente invención se refieren a la detección y/o identificación de un genotipo de *Cp. psittaci* en una muestra de un animal tomada durante o después del tratamiento contra una infección por *Cp. psittaci* o, en el caso de, p. ej., aves de corral, después de liberarlas del período de cuarentena. El método de la presente invención se puede utilizar, en general, para vigilar el estado infeccioso de una bandada de aves de corral durante la producción y para disminuir el riesgo de psitacosis en los granjeros de aves de corral. El método también se puede utilizar por parte de funcionarios de salud para vigilar la aparición de una infección en grupos de riesgo tales como veterinarios y granjeros de aves de corral. El método se puede realizar para evaluar la eficacia de tratamiento frente a una infección por *Cp. psittaci* tanto en aves como en seres humano. El método también se puede utilizar como un control de diagnóstico antes de liberar a las aves del período de cuarentena o para vigilar el tratamiento obligatorio durante el período de cuarentena. El

método también se puede utilizar para trazar posibles fuentes de infección en el caso de brotes de psitacosis en seres humanos. El método se puede utilizar como herramienta taxonómica, ya que permite la detección de nuevos genotipos. El método también se puede utilizar como una herramienta epidemiológica para evaluar la relación entre la aparición de un genotipo dado en aves y el riesgo de transmisión al hombre, así como la relación entre la aparición de un genotipo y la virulencia del mismo tanto en aves como en mamíferos (especialmente en seres humanos).

Realizaciones particulares del método de la invención son métodos que comprenden las etapas de incubar una muestra de la que se sospecha una infección con *Cp. psittaci* con un primer oligonucleótido, siendo el primer oligonucleótido complementario a la secuencia de ADN de un genotipo de *Cp. psittaci* que permite la hibridación de un primer oligonucleótido a ADN de *Cp. psittaci* presente en una muestra, y determinar la unión del primer oligonucleótido dentro de la muestra. Esta última etapa asegura la identificación de uno o más genotipos de *Cp. psittaci*.

Realizaciones particulares de los métodos de la presente invención implican el uso de diferentes tipos de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos "específicos para el genotipo", a los que también se alude como "primeros oligonucleótidos" utilizados en los métodos y kits de la presente invención son oligonucleótidos complementarios a una secuencia de ADN de un genotipo de *Cp. psittaci* que es específica para este genotipo de *Cp. psittaci* y que es capaz de hibridarse específicamente a esta secuencia específica. En una realización de la invención, "capaz de hibridarse específicamente" se refiere a la capacidad del oligonucleótido a hibridarse específicamente bajo condiciones de hibridación que habitualmente se utilizan durante la etapa de alargamiento de una reacción de PCR.

Los (primeros) oligonucleótidos específicos para el genotipo utilizados en el contexto de la presente invención pueden variar en longitud, entre aproximadamente 12 y hasta 30 o incluso 40 nucleótidos, dependiendo la longitud adecuada para un experimento de la técnica utilizada, del contenido por CG de la sonda utilizada y de la posibilidad de unión no específica de una sonda con otra secuencia diana. Realizaciones específicas de la invención, tal como se ilustran en los ejemplos, se refieren a sondas de aproximadamente 30 a 40 nucleótidos. Se pueden prever diferencias en los casos en los que la sondas son más cortas o más largas en sus extremos 3' y/o 5' o están situadas más arriba y/o más abajo con respecto a su secuencia diana (5, 10, 15, 20 o más nucleótidos). Realizaciones particulares de los primeros oligonucleótidos adecuados para uso en el contexto de la presente invención comprenden o tienen las secuencias en la Tabla 2 con SEQ ID NO: 1 (para el genotipo A), SEQ ID NO: 2 (para el genotipo B), SEQ ID NO: 3 (para el genotipo C), SEQ ID NO: 4 (para el genotipo D), SEQ ID NO: 5 (para el genotipo E), SEQ ID NO: 6 (para el genotipo F) y SEQ ID NO: 24 (para el genotipo EB). Sin embargo, se entenderá que secuencias esencialmente idénticas a las secuencias descritas en esta memoria se pueden diseñar para uso en el contexto de la presente invención.

En una realización particular, el primer oligonucleótido está marcado con un grupo cromóforo en su extremo 5' con un grupo extintor de fluorescencia en su extremo 3', con el fin de que sea adecuado para uso en un método de PCR cuantitativa (p. ej., el así denominado "Taqman"). Marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, p. ej., las moléculas de indicador fluorescente seleccionadas del grupo que consiste en fluoresceína, rodamina, rojo Texas, FAM, JOE, TAMRA, ROX, HEX, TET, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, IRD40, IRD41 y BODIPY.

La unión de un oligonucleótido a ADN presente en una muestra se puede determinar a través de una diversidad de técnicas tales como la hibridación southern o northern y cromatografía bajo condiciones desnaturalizantes. En una realización de la invención, la unión de un oligonucleótido se puede determinar evaluando la unión de un oligonucleótido no marcado idéntico para el mismo sitio de unión, p. ej. reemplazo de una sonda cromogénica por una sonda no cromogénica, o viceversa. En una realización particular, el reemplazo de la sonda no cromogénica se produce durante una reacción de PCR en la que un grupo extintor de fluorescencia es separado de una sonda mediante ADN polimerasa.

De acuerdo con una realización específica, los métodos de la invención son ensayos de PCR a tiempo real cuantitativos. Se demuestra en esta memoria que los ensayos de la invención cumplen los criterios propuestos para un ensayo validado, dado que los dos nuevos ensayos de PCR en tiempo real fueron comparados con otros ensayos tales como la secuenciación de *ompA*, RFLP de *ompA* y serotipado por MOMP. La tecnología de PCR en tiempo real ofrece un nuevo enfoque diagnóstico que permite la cuantificación de un amplicón en una etapa a través de hibridación específica, sin la necesidad de abrir tubos, minimizando el riesgo de contaminación cruzada para posteriores experimentos de esta manera.

La presente invención presenta, además, un método para generar anticuerpos específicos para el genotipo, que se derivan de péptidos que tienen una secuencia situada dentro de una de las secuencias representadas en la Figura 1. Para la generación de anticuerpos se utilizan oligopéptidos que tienen una secuencia única para un determinado

genotipo.

De acuerdo con un aspecto específico de los métodos y kits de la presente invención, se utilizan sondas segundas o competidoras en combinación con los primeros oligonucleótidos específicos para el genotipo de la invención. Las sondas segundas o competidoras de la presente invención son sondas específicas para el genotipo dirigidas contra otro ADN del genotipo de *Cp. psittaci*, genotipo que es diferente del que está previsto detectar y que evita la unión no específica del primer oligonucleótido de acuerdo con la presente invención a dicho otro genotipo de *Cp. psittaci*. Así, de acuerdo con este aspecto, el método comprende incubar la muestra además del primer oligonucleótido con un segundo oligonucleótido (el denominado competidor) y determinar la unión del primer oligonucleótido a ADN dentro de la muestra. Dependiendo del primer oligonucleótido utilizado, pueden ser adecuados diferentes competidores para asegurar la especificidad incrementada de la detección. De acuerdo con una realización, el primer oligonucleótido corresponde a una de las secuencias seleccionadas de SEQ ID NO: 1 a 6 ó 24 descritas en esta memoria, y el oligonucleótido competidor corresponde a una secuencia que comprende la secuencia de oligonucleótidos en el gen *OmpA* que puede estar alineado con otra de las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 6 ó 24. Lo más particularmente, para la detección de genotipo A, el primer oligonucleótido corresponde a SEQ ID NO: 1, y el oligonucleótido competidor es una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 1 dentro de la secuencia del gen *OmpA* del genotipo B, C, D, E, F o EB (después de la alineación de la secuencia *OmpA* de genotipo A a la de genotipo B, C, D, E, F o EB). Las realizaciones siguientes representan ejemplos de combinaciones adecuadas de competidores y sondas:

- el segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8, y el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1;
- el segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7, y el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2;
- el segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, y en donde el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2;
- el segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9, y el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5;
- el segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11, y el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.

De nuevo, se comprenderá, sin embargo, que las secuencias esencialmente idénticas a las secuencias descritas en esta memoria pueden ser diseñadas para uso en el contexto de la presente invención. Además de ello, se comprenderá que por parte de la persona experta pueden diseñarse oligonucleótidos competidores adicionales para evitar la hibridación no específica de un primer oligonucleótido de la invención con una secuencia de ADN de un genotipo distinto al genotipo contra el cual está dirigido.

Tal como se detalla anteriormente, de acuerdo con una realización particular, el método de detección de la unión es una PCR. En una realización preferida, la unión de un primer oligonucleótido y/o la unión de un segundo oligonucleótido se determina mediante amplificación por PCR con un cebador directo y un cebador inverso, en donde los cebadores directo e inverso están situados aproximadamente 1, 5, 10, 20, 50, 100 pb en 3' y 5' del primer o segundo oligonucleótido. La PCR puede ser una PCR en tiempo real. Para reducir el tiempo, se puede utilizar un multiplexado.

Las siguientes realizaciones representan ejemplos de pares adecuados de cebadores directo e inverso para respectivos primeros oligonucleótidos:

- cebadores que comprenden o contienen la secuencia de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 cuando el primer oligonucleótido comprende o contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.
- cebadores que comprenden o contienen la secuencia de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 cuando el primer oligonucleótido comprende o contiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.
- cebadores que comprenden o contienen la secuencia de SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 cuando el primer oligonucleótido comprende o contiene la secuencia de SEQ ID NO: 3.
- cebadores que comprenden o contienen la secuencia de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19 cuando el primer oligonucleótido comprende o contiene la secuencia de SEQ ID NO: 4.
- cebadores que comprenden o contienen la secuencia de SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 cuando el primer oligonucleótido comprende o contiene la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- cebadores que comprenden o contienen la secuencia de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 cuando el primer oligonucleótido comprende o contiene la secuencia de SEQ ID NO: 6.
- cebadores que comprenden o contienen la secuencia de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 cuando el primer oligonucleótido comprende o contiene la secuencia de SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto, la invención se refiere a oligonucleótidos aislados que comprenden o contienen una secuencia

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, y secuencias que son esencialmente idénticas a ellas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende uno o más oligonucleótidos capaces de hibridarse específicamente a una secuencia de ADN de un genotipo de *Cp. psittaci*. De acuerdo con una realización particular, los kits de diagnóstico comprenden uno o más de los primeros oligonucleótidos específicos para el genotipo capaces de hibridarse específicamente a un genotipo de la *Cp. psittaci*, lo más específicamente uno de los oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 6 y SEQ ID NO: 24. De acuerdo con una realización adicional, el kit puede comprender, adicionalmente, una o más sondas competidoras, más específicamente, uno o más de los oligonucleótidos competidores seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 a 11. Adicional o alternativamente, los kits de la presente invención pueden comprender dos cebadores, más particularmente pares de cebadores seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y 13, SEQ ID NO: 14 y 15, SEQ ID NO: 16 y 17, SEQ ID NO: 18 y 19, SEQ ID NO: 20 y 21, SEQ ID NO: 22 y 23, SEQ ID NO: 25 y 26. El kit se puede suplementar adicionalmente, p. ej., con cepas de referencia de bacterias *Cp. psittaci*, plásmidos que contienen una secuencia de ADN de *OmpA* completa o parcial de genotipos de referencia, o anticuerpos contra *Cp. psittaci*. Otros componentes pueden ser bacterias o muestras de ADN de bacterias estrechamente relacionadas con *Cp. psittaci*.

Otro aspecto de la invención se refiere a una nueva cepa de una bacteria *Cp. psittaci*, designada como *Cp. psittaci* genotipo EB. Esta nueva cepa se caracteriza porque su genoma comprende la secuencia específica del gen *OmpA* representado en SEQ ID NO: 51. Tal como se detalla en esta memoria, la identificación de esta nueva cepa permite una identificación más específica de las cepas genotípicas de *Cp. psittaci* en una muestra. La presente invención proporciona, además, la secuencia SEQ ID NO: 51 específica para el genotipo EB y el uso de esta secuencia y fragmentos (específicos para EB) de la misma en diferentes aplicaciones tales como, pero no limitadas a la detección específica del genotipo EB de *Cp. psittaci*, la generación de anticuerpos contra secuencias de aminoácidos correspondientes, etc.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para generar secuencias de oligonucleótidos útiles para la discriminación entre al menos dos genotipos en la detección de *Cp. psittaci*, comprendiendo el método las etapas de: a) proporcionar una alineación (múltiple) de una parte de la secuencia genómica de los al menos dos genotipos de *Cp. psittaci*, b) identificar regiones que contengan diferencias en la secuencia dentro de dicha parte de la secuencia genómica y c) sintetizar uno o más oligonucleótidos que comprendan una secuencia en donde se produzcan dichas diferencias de secuencia. De acuerdo con una realización, la secuencia genómica utilizada comprende una secuencia para un gen que codifica una proteína que provoca patogenicidad. En otra realización, uno de los al menos dos genotipos de *Cp. psittaci* es del genotipo EB.

La presente invención se ilustra adicionalmente con las siguientes Figuras y Ejemplos que no pretenden limitar el alcance de la invención.

Leyendas de las Figuras

- Figura 1:** alineación de partes de la secuencia *OmpA* de diferentes de diferentes cepas (genotipos) de *Cp. psittaci* con sondas (doblemente subrayadas) y cebadores directo e inverso (subrayados) de acuerdo con una realización de la presente invención.
- Figura 2:** curvas patrón específicas para el genotipo, obtenidas con el aparato GeneAmp 5700.
- Figura 3:** resultados cuantitativos de la PCR de infecciones mixtas de estudio VS

Ejemplo 1: Metodología general

Materiales aislados y cultivos de células. Cepas 90/1051, 41A12, GD, 7344/2, 3759/2, 7778B15 y WS/RT/E30 de referencia de genotipos A a F más E/B de *Cp. psittaci* (Tabla 1) se hicieron crecer en células de mono verde Bufalo (BGM). Las monocapas infectadas se desorganizaron mediante congelación y descongelación, seguido de tratamiento ultrasónico durante 1 minuto en un procesador por ultrasonidos de mesa (Branson 12, BIOMEDevice, San Pablo, CA, EE.UU.). El material recolectado del cultivo de células se centrifugó durante 10 min (1.000 x g, 4°C) para separar fragmentos celulares y, subsiguientemente, se concentró mediante ultracentrifugación durante 1 hora (45.000 x g, 4°C). Sedimentos bacterianos se resuspendieron en tampón de sacarosa fosfato glutamato (SPG) (sacarosa 218 mM, KH₂PO₄ 38 mM, K₂HPO₄ 7 mM, ácido L-glutámico 5 mM) a un volumen de 1 a 100 del volumen original del cultivo y se almacenaron a -80°C hasta el uso

Extracción de ADN. ADN genómico se preparó como sigue. 200 µl de material recolectado del cultivo de células se centrifugaron durante 30 min a TA (16.000 x g). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 199 µl de tampón SET, pH 7,5 (Tris 0,05 M, EDTA 0,01 M, SDS al 1%) suplementado con de pro teinasa K (20 mg/ml, Promega, Madison, WI, EE.UU.). Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min y subsiguientemente se hirvieron durante 10 min para inactivar la enzima.

Construcciones de plásmidos de referencia específicas para el genotipo. Se amplificó el gen *OmpA* de las cepas de referencia de genotipo A a F más E/B (Tabla 1), dando como resultado un fragmento de 1065 a 1098 pb dependiendo del genotipo. Los cebadores se eligieron de las regiones muy conservadas de las secuencias *ompA* publicadas de *C. trachomatis* y *Cp. psittaci*. La amplificación del gen *ompA* se consiguió utilizando los cebadores genol [SEQ ID NO: 52] y genoll [SEQ ID NO: 53] (Tabla 2) sintetizados por Invitrogen. Treinta y cinco ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 2 min de re-asociación a 55°C y 3 min de extensión a 72°C se completaron en un dispositivo GeneAmp 9600 de Perkin Elmer después de una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, y seguido de re-asociación final durante 5 min a 72°C.

Tabla 1: Plásmidos de referencia de *Cp. Psittaci*

Plásmido	Cepa	País (año)	Hospedante	Genotipo
22A	90/1051	Bélgica (1990)	<i>Amazona sp.</i>	A
29B	41A12	Bélgica (2001)	<i>Meleagris gallopavo</i>	B
45A	GD	Alemania (1960)	<i>Anas platyrhynchos</i>	C
19A	7344/2	Italia (1997)	<i>Columba livia</i> *	D
17A	3759/2	Italia (1999)	<i>Columba livia</i> *	E
32B	7778B15	Bélgica (2001)	<i>Meleagris gallopavo</i>	F
35A	WS/RT/E30	Alemania (2001)	<i>Anas platyrhynchos</i>	EB

* Aislado de una paloma urbana

Tabla 2: Cebadores de PCR, sondas y competidores para la detección específica para el genotipo de *Cp. psittaci*

Oligo	Secuencia (5'-3')	Punto de fusión (°C)	SEQ ID NO:
Sonda genotipo A	Fam-CTACCGATCTTCCAACGCAAC-TTCCTAACG-Tamra (u otro grupo cromofórico y/o extintor de la fluorescencia)	69	1
Oligo	Secuencia (5'-3')	Punto de fusión (°C)	SEQ ID NO:
Directo genotipo A	5'-GGTTTTTCAGCTGCAAGCTCAA-3'	59	12
Inverso genotipo A	5'-CCACAACACCTTGGGTAATGC-3'	59	13
Sonda genotipo B	Fam-TCTACCGATCTTCCAATGCA-ACTTCCTAACGTA-Tamra (u otro grupo cromofórico y/o extintor de la fluorescencia)	69	2
Directo genotipo B	5'-AATAGGGTTTTTCAGCTACCAACTCAA-3'	59	14
Inverso genotipo B	5'-CCACAACACCTTGGGTAATGC-3'	59	15
Sonda	Fam-TCTGCTGTTATGAACTTGACCAC-	69	3

	genotipo C	ATGGAACC-Tamra (u otro grupo cromofórico y/o extintor de la fluorescencia)		
5	Directo genotipo C	5'-GCATCGCTCAACCTAAATTGG-3'	58	16
	Inverso <u>genotipo C</u>	5'-ATTGTGGCTTCCCCTAAAAGG-3'	58	17
10	Sonda genotipo D	Fam-AGGAAAGGCCACAACCTGTC- GACGG-Tamra (u otro grupo cromofórico y/o extintor de la fluorescencia)	68	4
15	Directo genotipo D	5'-AACCACTTGAACCCAACACTTT-3'	60	18
20	Inverso Genotipo D	5'-CGAAGCAAGTTGTAAGAAGTCAG- AGTAA-3'	60	15
	Sonda genotipo E	Fam-TACTTTGCCCAATAATGGTGG- TAAGGATGTTCTATC-Tamra	68	5
25	Directo genotipo E	5'-CCAAGCCTTCTAGGATCAAGGA-3'	59	20
	Inverso genotipo E	5'-CGAAGCAATTTGCAAGACATCA-3'	60	21
30	Sonda genotipo F	Fam-CATCGCTCAACCTAAATTAGCCGC- TGC-Tamra	68	6
35	Directo genotipo F	5'-GCAACTTTTGATGCTGACTCTATCC-3'	59	22
	Inverso genotipo F	5'-GTTCCATGTGGTCAAGTTCAAAAC-3'	58	23
40	Sonda genotipo EB	5'-CCAAGCCTTCTAGGATCAACCA-3'		24
	Directo genotipo EB	5'-TGCTTTGCCCAATAATGCTG-3'		25
45	Inverso genotipo EB	5'-AAGGATGTTCTATCTGATGTCTTGCA-3'		26
50	Competidor B genotipo B CpPsGAcomB	5'-CTACCGATCTTCCAATGCAACTT- CCTAACG-3'		8
	Competidor A genotipo B CpPsGBcomA	5'-TCTACCGATCCTTCCAACGCAAC- TTCCTAACGTA-3'		7
55	Competidor E + EB genotipo B CpPsGBcom E + EB	5'-TCTACCGAGCTTCCAATGCAA- CTTCCTAACGTA-3'		10
60	Competidor E/B	5'-TGCTTTGCCCAATAATGCTGGTAA-	69	9

genotipo E
CpPsGEcomEB

GGATGTTCTATC-3'

5 Competidor AB 5'-TGCTTTGCCCAATAATAGTGGTA- 11
genotipo E AGGATGTTCTATC-3'
CpPsGEcomA
B

10 Genol 5'-ATGAAAAAAGCTCTTGAATCG-3' 55 52
Genoll 5'-ACAAGCTTTTCTAGACTTCAT-3' 55 53

PCR en tiempo real específica para el genotipo de *ompA* cuantitativa. Cebadores de PCR específicos para el genotipo de *Cp. psittaci* se seleccionaron de los segmentos variables del gen *ompA* con el software primer express (Applied Biosystems) y se sintetizaron por parte de Invitrogen. Los productos de la PCR generados oscilaban entre 78 y 85 pb, dependiendo del genotipo. En la Tabla 2 se presentan las secuencias de los cebadores y sondas TaqMan (sintetizadas por Applied Biosystems) para los diferentes genotipos. Las sondas específicas para el genotipo estaban marcadas en 5' con 5-carboxifluoresceína (FAM) en calidad de colorante informador y con 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3' en calidad del extintor de fluorescencia. Como alternativas se pueden utilizar otras combinaciones de colorante - extintor de fluorescencia. En la Figura 1 se muestra una alineación de la secuencia de partes del gen *OmpA* y las sondas que se utilizan. Para los genotipos A, B y E, los oligonucleótidos competidores se utilizaron para potenciar la especificidad de la sonda. Cebadores directo e inverso y sondas se sometieron a ensayo en concentraciones de 50, 150, 300 y 900 nM, con y sin adición del ADN competidor (50 nM o 150 nM) suplementado con ADN genómico purificado de las seis cepas de referencia del genotipo. Los mejores resultados se consiguieron con concentraciones del cebador directo e inverso de 300 nM, una concentración de la sonda de 300 nM y, en los casos en que era aplicable, una concentración del competidor de 50 nM. Las condiciones de la ciclación eran las sugeridas por el fabricante, y se utilizaron todas las estipulaciones por defecto del programa. La PCR se realizó en tubos ópticos ABI PRISM® (Applied Biosystems), consistiendo las mezclas de reacción en 25 de la mezcla Master universal TaqMan que incluía dUTP y uracil-N-glicosilasa (AmpErase UNG; Applied Biosystems), en un volumen total de la reacción de 50 µl. La amplificación y detección del producto de la PCR se realizaron con un instrumento de detección de la secuencia ABI GeneAmp 5700 (Applied Biosystems), utilizando todas las estipulaciones por defecto del programa. Las condiciones de ciclación eran como sigue: después de 2 min a 50°C y de 10 min a 95°C, las muestras se sometieron a 40 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 15 s, seguido de una etapa a 60°C para la re-asociación y extensión durante un minuto. Los productos de la PCR se detectaron como un incremento en la fluorescencia durante la fase de extensión por PCR cuando la sonda se escindió por parte de la actividad de 5' exonucleasa de la ADN polimerasa de Taq. Se construyeron gráficos patrón de los valores Ct obtenidos de diluciones en serie de plásmidos de referencia purificados (10^8 a 10^1). Valores Ct para muestras clínicas desconocidas se representaron frente a los gráficos patrón para los plásmidos. Finalmente, se calculó la cantidad de los diferentes genotipos de *Cp. psittaci* presentes en las muestras clínicas (N_0). Además, se sometió a ensayo ADN procedente de cada una de las muestras clínicas en presencia de ADN de *Cp. psittaci* (50 copias *ompA* para cada uno de los genotipos) para verificar los inhibidores de PCR comparando las gráficas de amplificación para las muestras con y sin estos controles internos.

Se pueden utilizar estipulaciones idénticas o similares en aparatos de otros fabricantes con el fin de reproducir la descripción de la presente invención.

Se pueden utilizar estipulaciones idénticas o similares en aparatos de otros fabricantes con el fin de reproducir la descripción de la presente invención.

Controles positivos y muestras de ensayo construidas. Mezclas de plásmidos con *OmpA* de concentración conocida se pueden utilizar como un modelo para cultivos mixtos de *Cp. psittaci*, dado que *OmpA* se produce como un gen de copia única en la bacteria.

Muestras clínicas. Estudio de ornitosis/psitacosis. En un experimento con cinco grupos de pavos SPF (5.07, 5.09, 5.10, 5.11 y 5.12), animales de cada uno de los grupos se estaban muriendo debido a una causa desconocida con síntomas respiratorios graves. Torundas faríngeas de cada uno de los grupos de animales se recogieron mediante el paso en serie a través de los cinco animales en cada uno de los grupos, así como del veterinario quien los tuvo al cuidado para verificar si *Cp. psittaci* era el agente causante. Una segunda torunda del veterinario se tomó dos semanas más tarde. Las torundas se sacudieron en 1 ml de tampón de sacarosa fosfato glutamato (SPG, sacarosa 218 mM, KH_2PO_4 38 mM, K_2HPO_4 7 mM, ácido L-glutámico 5 mM). Monocapas HeLa de un día de edad se inocularon con el sobrenadante y se examinaron con el kit Chlamydia Imagen (DakoCytomation) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. En paralelo, se centrifugaron 100 µl de suspensión (10 min, 2700 x g) y se utilizaron

para extracciones de ADN con el método SET.

Estudio longitudinal. Se llevó a cabo un estudio longitudinal en tres granjas de pavos con el fin de examinar la cinética de infecciones por pneumovirus aviar (APV), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), *M. gallisepticum*, *M. meleagridis* y *Cp. psittaci* desde el día uno hasta su sacrificio. Se utilizaron torundas faríngeas de las semanas 3, 6, 8, 12 y 15 después de la eclosión para la extracción del ADN con el método SET para cuantificar la presencia de *Cp. psittaci* y para comparar este resultado con la respuesta de anticuerpos de los animales durante la infección, según se determina mediante ELISA.

Estudio VS. En un estudio previo que realiza la secuenciación completa de ompA de varios clones por material aislado reveló la presencia de 5 infecciones de genotipo mixtas en un total de 21 materiales aislados. Extracciones de ADN genómico de estos materiales aislados se utilizaron para verificar la presencia de los genotipos encontrados mediante secuenciación con las reacciones de RP-PCR específicas para el genotipo.

Ejemplo 2. Identificación específica para el genotipo de *Cp. psittaci*

La presente invención demuestra por vez primera el uso de la tecnología de PCR en tiempo real para detectar siete genotipos diferentes de *Cp. psittaci* aviares en muestras humanas y animales, y ofrece la posibilidad de descubrir nuevos genotipos de *Cp. psittaci*.

Utilizando plásmidos de referencia específicos para el genotipo, todas las siete PCRs (A a EB) son capaces de detectar 10 copias de plásmido por μl . Se podrían trazar curvas patrón a partir de 10^8 a 10^5 copias por μl , casi con pendientes ideales en torno a -3,3 y coeficientes de correlación superiores a 98,5% (Figura 2). Las diluciones más elevadas no se tuvieron en consideración para la regresión, dado que la reproducibilidad era demasiado baja, alcanzaron el umbral en torno al mismo ciclo o sólo después del ciclo 40.

Los competidores que han sido utilizados en los métodos de PCR de la presente invención son oligonucleótidos sin una señal fluorescente que compiten con las sondas que se unen a la secuencia diana. En la hibridación in situ fluorescente (FISH – siglas en inglés), se utilizan frecuentemente para potenciar la unión específica de las sondas bloqueando los posibles sitios de las sondas en el ADN contaminante. Hasta ahora nunca se habían utilizado competidores en la RT-PCR. Este principio descrito en esta invención es aplicable a cualquier tipo de reacción de PCR en donde se utilice una sonda que resida entre los cebadores directo e inverso y en donde se utilice un oligonucleótido adicional que compita con la sonda por la unión al ADN del molde.

Cuando se investiga la especificidad del cebador y de la sonda de las reacciones al preparar una mezcla de diluciones 1/10 de extractos de ADN genómico de los diferentes genotipos más material no diluido y diluido al 1/100 y 1/1000 del genotipo específico, los resultados indicaban que los cebadores C, D y F y las sondas no realizaban reacción significativa alguna con la dilución a 1/10 de los otros extractos del genotipo, pero, por otra parte, las sondas A, B, E y EB reaccionaban con el otro material genómico presente. El desarrollo de competidores específicos para el genotipo permitió diferenciar los siete genotipos cuando se añadían a una concentración de 50 nM. En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los competidores.

Ejemplo 3: Determinación del genotipo

Genotipo A. El competidor específico para el genotipo A de *Chlamydophila psittaci* por la unión al genotipo B (CpPsGAScomB) [SEQ ID NO:8] ha de añadirse a la mezcla de reacción para prevenir resultados falsos positivos, si el genotipo B está posiblemente presente en la muestra. Cuando se añaden, el competidor se unirá al ADN del genotipo B, dejando a la sonda únicamente el sitio de unión en el genotipo A, si está presente. Dado que la secuencia del competidor es complementaria a la secuencia del genotipo B, la afinidad es mayor para este genotipo, mientras que la sonda se une, naturalmente, de forma preferencial al genotipo A.

Genotipo B. En la determinación del genotipo B, una temperatura elevada puede potenciar la especificidad de la sonda: reacciones no específicas con los genotipos E y EB desaparecen cuando la reacción se lleva a cabo a 63°C en lugar de 60°C. La adición del competidor para el material del genotipo A CpPsGBScomA [SEQ ID NO: 7] evitará reacciones falsas positivas si está presente material de genotipo A.

Genotipo E. La adición tanto de CpPsGEScomA/B [SEQ ID NO: 11] (competidor para evitar la unión de la sonda E al genotipo A y al genotipo B) y CpPsGEScomEB [SEQ ID NO: 9] (para prevenir la unión a EB) en concentraciones iguales de 50 nM evitan eficazmente la reacción con A y B, mientras que la señal EB falsa positiva llega varios ciclos más tarde y la intensidad de la misma se reduce a un 25% de la señal E específica.

Ejemplo 4: Detección específica para el genotipo de *Cp. psittaci* en muestras clínicas. Estudio de ornitosis/psitacosis.

Muestras 5.07, 5.09, 5.10, 5.11 y 5.12 procedentes de los pavos, así como las dos muestras del veterinario (V1 y V2) eran todas ellas positivas en DIF tres días después de la inoculación. Cuando se llevaron a cabo reacciones RT específicas para el genotipo directamente sobre la muestra resuspendida en SPG, no hubo reacción alguna. La adición de los controles internos (50 copias/ μl de los plásmidos de referencia) demostró que esto se debía a la inhibición de la reacción. Después de la extracción de ADN por SET, las reacciones se realizaron de nuevo y los resultados demostraron que todos los pavos estaban infestados con los genotipos D, F y EB. En ese mismo

momento, el veterinario ya parecía haberse infestado con los genotipos D y EB. La segunda muestra del veterinario demostró que estaban presentes los genotipos D, F y EB. Se realizaron curvas patrón con 10^7 , 10^5 y 10^3 plásmidos de referencia por μl en un ABI prism 7000 y se determinaron las Cts de las muestras y se representaron frente a las curvas patrón para determinar el número de partículas para cada uno de los genotipos. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Estos resultados muestran el efecto zoonótico de *Cp. psittaci*, a pesar de que no habían síntomas clínicos visibles, el veterinario se infestó con las mismas cepas de genotipo que los pavos. En el primer momento, el genotipo F no se había aún detectado, pero la muestra V2 demuestra que el genotipo F tenía la posibilidad de multiplicarse en un tiempo de incubación de dos semanas (Tabla 3).

Tabla 3: Análisis de la cuantificación del estudio de ornitosis/psitacosis en muestras de aves (5.07, 5.09, 5.10, 5.11, 5.12) y seres humanos (V1/V2)

geno- tipo	curva est. 3 puntos	5.07 C _T	valor X	copias/ μl	5.09 C _T	valor X	copias/ μl	5.10 C _T	valor X	copias/ μl
D	$Y = -2,74X + 37,62$	34,37	1,18	15	31,43	2,26	182	33,1	1,65	45
F	$Y = -3,20X + 40,89$	35,18	1,78	61	29,55	3,54	3497	32,22	2,70	512
EB	$Y = -2,7X + 37,37$	31,3	2,25	177	29,57	2,89	772	31,28	2,25	180
geno- tipo	curva est. 3 puntos	5.11 C _T	valor X	copias/ μl	5.12 C _T	valor X	copias/ μl	V1/V2 C _T	valor X	copias/ μl
D	$Y = -2,74X + 37,62$	32,97	1,70	50	34,69	1,07	12	34,49/ 35,99	1,14/ 0,59	14/6
F	$Y = -3,20X + 40,89$	35,27	1,76	57	35,88	1,57	37	-/33,4	-/2,34	-/220
EB	$Y = -2,7X + 37,37$	31,85	2,04	110	31,34	2,23	171	31,99/ 31,22	1,99/ 2,28	98/ 189

Estudio longitudinal. Extractos de ADN procedentes de torundas después de 3, 6, 8, 12 y 15 semanas después de la eclosión se rastrearon en la PCR específica para la especie en un aparato GeneAmp 9600 de Perkin Elmer (Wellesley, MA, EE.UU.) sin SybrGreen. Todas las muestras mostraron el característico amplicón de 151 pb, demostrando ya que los animales estaban infestados con una cepa de genotipo B de *Cp. psittaci*, y que en la granja se encontraron dos infecciones (semanas 6 y 12). Una curva patrón del genotipo B con 10^7 , 10^5 y 10^3 plásmidos de referencia por μl se trazó en un ABI prism 7000 y las Cts de las muestras de determinaron y representaron frente a las curvas patrón para determinar el número de partículas. La PCR en tiempo real específica del genotipo B pudo demostrar que las elevadas respuestas de los anticuerpos se correlacionaban de hecho con un incremento de diez veces en el genotipo B de *Cp. psittaci* (véanse las semanas 6 y 12 en la Tabla 4).

Tabla 4: Análisis de cuantificación del estudio longitudinal

Semana	0	1	2	3	4	5	6	7
Título	3072	768	768	1536	768	/	3072	/
Copias/ μl	/ ^a	/	24	/	/	/	217	/
Semana	8	9	10	11	12	13	14	15
Título	1536	/	768	/	3072	/	768	/
Copias/ μl	33	/	/	/	238	/	/	19

^a/ no disponible; el cálculo se realizó con la curva patrón del genotipo B $y = -2,92x + 39,53$, con $y = \text{Ct}$ y $x = \log(\text{copias}/\mu\text{l})$

Estudio VS: Materiales aislados que revelan infecciones mixtas se sometieron a reacciones PCR en tiempo real específicas para el genotipo para confirmar la presencia de los diferentes genotipos indicados por la secuenciación completa de *ompA*. La Tabla 5 demuestra que todas las infecciones mixtas se podían detectar fácilmente y, además de ello, cuantificar utilizando los valores Ct determinados en las gráficas presentadas en la Figura 3 y las curvas

patrón de la Figura 2. El genotipo que es menos abundante permanece sin detectar en cuatro de los cinco casos. Además de la especificidad del método PCR cuantitativo para discriminar genotipos, la especificidad también se sometió a ensayo en ADN extraído de otras especies bacterianas que se encuentran habitualmente en el tracto respiratorio de aves y seres humanos, así como en ADN extraído de células aviares (HD11) y (Hela). No se detectó producto de ADN amplificado alguno.

Tabla 5: Análisis de cuantificación del estudio VS

Material aislado	Secuenciación de <i>OmpA</i>	RFLP de <i>OmpA</i>	Serotipado de MOMP	Ct	X	N ₀ ^a
99	A (01B) + E/B	A + E	B	35,75 32,05	1,605046 2,957877	40 907
61/8	(01A + 01D) A (11D) +	A + E	A + B	26,26	4,575963	37667
7344/2	E/B (11C) B (19D) +	B + D	B	27,68 33,59	4,226493 3,075151	16846 1189
8615/1	D (19B) B (20A+20C) +	B + E	B	28,37 34	3,588211 2,954082	3874 900
7778B15	E/B (20D) B (32A) +	B + F	B	29,01 36,74	3,840392 2,144987	6925 140
	F (32D+32F)			36,96	1,886284	77

^a N₀ se calcularon utilizando las curvas de regresión presentadas en la figura 2

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Universiteit Gent Vanrompay, Daisy	
5	<120>	Detección específica del genotipo de Chlamydophila psittaci	
	<130>	R3380	
	<150>	US 60/584.725	
10	<151>	30.06-2004	
	<160>	53	
	<170>	PatentIn versión 3.3	
15	<210>	1	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
20	<220>		
	<223>	Sonda para el genotipo A de Cp. psittaci	
	<400>	1	
25		ctaccgatct tccaacgcaa cttcctaacg	30
	<210>	2	
	<211>	33	
30	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Sonda para el genotipo B de Cp. psittaci	
35	<400>	2	
		tctaccgatc ttccaatgca acttcctaac gta	33
	<210>	3	
40	<211>	31	
	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
45	<223>	Sonda para el genotipo C de Cp. psittaci	
	<400>	3	
		tctgctgtta tgaacttgac cacatggaac c	31
50	<210>	4	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
55	<220>		
	<223>	Sonda para el genotipo D de Cp. psittaci	
	<400>	4	
		aggaaaggcc acaactgtcg acgg	24
60	<210>	5	

	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
5	<220>		
	<223> Sonda para el genotipo E de Cp. psittaci		
	<400> 5		
	tactttgccc aataatggtg gtaaggatgt tctatc	36	
10	<210> 6		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
15	<220>		
	<223> Sonda para el genotipo F de Cp. psittaci		
	<400> 6		
	catcgctcaa cctaaattag ccgctgc	27	
20	<210> 7		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
25	<220>		
	<223> Sonda competidora		
	<400> 7		
30	tctaccgatc cttccaacgc aacttcctaa cgta	34	
	<210> 8		
	<211> 30		
	<212> ADN		
35	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Sonda competidora		
40	<400> 8		
	ctaccgatct tccaatgcaa cttcctaacg	30	
	<210> 9		
	<211> 36		
45	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Sonda competidora		
50	<400> 9		
	tgctttgccc aataatgctg gtaaggatgt tctatc	36	
	<210> 10		
55	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
60	<223> Sonda competidora		

	<400> 10 tctaccgagc ttccaatgca acttcctaac gta	33
5	<210> 11 <211> 36 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Sonda competidora	
	<400> 11 tgctttgccc aataatagtg gtaaggatgt tctatc	36
15	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Cebador directo genotipo A	
25	<400> 12 ggttttcagc tgcaagctca a	21
30	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador inverso genotipo A	
35	<400> 13 ccacaacacc ttgggtaatg c	21
40	<210> 14 <211> 26 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador directo genotipo B	
45	<400> 14 aatagggttt tcagctacca actcaa	26
50	<210> 15 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador inverso genotipo B	
55	<400> 15 ccacaacacc ttgggtaatg c	21
60	<210> 16 <211> 21	

	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
5	<223> Cebador directo genotipo C		
	<400> 16		
	gcatcgctca acctaaattg g		21
10	<210> 17		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador inverso genotipo C		
	<400> 17		
	attgtggctt cccctaaaag g		21
20	<210> 18		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador directo genotipo D		
	<400> 18		
30	aaccactgg aaccaaacac ttt		23
	<210> 19		
	<211> 28		
35	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso genotipo D		
40	<400> 19		
	cgaagcaagt tgtaagaagt cagagtaa		28
	<210> 20		
45	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador directo genotipo E		
	<400> 20		
	ccaagccttc taggatcaag ga		22
55	<210> 21		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
60	<220>		

	<223> Cebador inverso genotipo E	
5	<400> 21 cgaagcaatt tgcaagacat ca	22
	<210> 22 <211> 25 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador directo genotipo F	
15	<400> 22 gcaacttttg atgctgactc tatcc	25
20	<210> 23 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Cebador inverso genotipo F	
30	<400> 23 gttccatgtg gtcaagttca aaac	24
	<210> 24 <211> 22 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Sonda para Cp. psitacci genotipo EB	
40	<400> 24 ccaagccttc taggatcaac ca	22
45	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador directo genotipo EB	
50	<400> 25 tgctttgcc aataatgctg	20
55	<210> 26 <211> 26 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador inverso genotipo EB	
60	<400> 26 aaggatgttc tatctgatgt cttgca	26

<210> 27
 <211> 101
 <212> ADN
 5 <213> Chlamydophila psittaci

 <400> 27
 gttgggttaa tagggttttc agctgcaagc tcaatctcta ccgatcttcc aacgcaactt 60
 cctaacgtag gcattaccca aggtgttgtg gaattttata c 101

 10
 <210> 28
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Chlamydophila psittaci
 15
 <400> 28
 gttgggttaa tagggttttc agctaccaac tcaacctcta ccgatcttcc aatgcaactt 60
 cctaacgtag gcattaccca aggtgttgtg gaattttata c 101

 20
 <210> 29
 <211> 89
 <212> ADN
 <213> Chlamydophila psittaci
 25
 <400> 29
 gttggtttga ttggtgttaa aggaagctcc ttaacaaatg accaacttcc caacgtagcc 60
 atcactcaag gcgttggtga gttttacac 89

 30
 <210> 30
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Chlamydophila psittaci
 35
 <400> 30
 gttggtttga ttggtcttaa aggaactgat ttcaataatc aacttcctaaa cgtagccatc 60
 acccaaggcg ttgttgagtt ttacac 86

 40
 <210> 31
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Chlamydophila psittaci
 45
 <400> 31
 gttgggttaa tagggttttc agctaccagc tcaacctcta ccgagcttcc aatgcaactt 60
 cctaacgtag gcattaccca aggtgttgtg gaattttata c 101

 50
 <210> 32
 <211> 89
 <212> ADN
 <213> Chlamydophila psittaci

	<400>	32		
		gttgggtttga ttgggtgttaa aggaacctcc gtagcagctg atcaacttcc aaacgtaggc	60	
		atcactcaag gtattgttga gttttacac	89	
5	<210>	33		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
10	<400>	33		
		atactatccg cattgctcaa cctaaattaa aatcggagat tcttaacatt actacatgga	60	
		acccaagcct tataggatca accactgctt tgcccaataa t	101	
15	<210>	34		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
20	<400>	34		
		atactatccg cattgctcaa cctaaattaa aatcggagat tcttaacatt actacatgga	60	
		acccaagcct tctaggatca accactgctt tgcccaataa t	101	
25	<210>	35		
	<211>	95		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
30	<400>	35		
		acactatccg catcgctcaa cctaaattgg cctctgctgt tatgaacttg accacatgga	60	
		acccaaccct tttaggggaa gccacaatgc ttgat	95	
35	<210>	36		
	<211>	95		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
40	<400>	36		
		acactatccg cattgctcag cctaaattag ccactgctgt tttagattta accacttgga	60	
		acccaacact tttaggaaag gccacaactg tcgac	95	
45	<210>	37		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
	<400>	37		

	atactatccg cattgctcaa cctaaattaa aatcggagat tcttaacatt actacatgga	60
	acccaagcct tctaggatca accactactt tgcccaataa t	101
	<210> 38	
	<211> 95	
5	<212> ADN	
	<213> Chlamydophila psittaci	
	<400> 38	
	actctatccg catcgctcaa cctaaattag ccgctgctgt tttgaacttg accacatgga	60
10	acccaactct tttaggggaa gctacagctt tagat	95
	<210> 39	
	<211> 101	
	<212> ADN	
15	<213> Chlamydophila psittaci	
	<400> 39	
	acattactac atggaaccca agccttatag gatcaaccac tgctttgccc aataatagtg	60
	gtaaggatgt tctatctgat gtcttgcaaa ttgcttcgat t	101
20		
	<210> 40	
	<211> 101	
	<212> ADN	
25	<213> Chlamydophila psittaci	
	<400> 40	
	acattactac atggaaccca agccttctag gatcaaccac tgctttgccc aataatagtg	60
	gtaaggatgt tctatctgat gtcttgcaaa ttgcttcgat t	101
30		
	<210> 41	
	<211> 92	
	<212> ADN	
	<213> Chlamydophila psittaci	
35		
	<400> 41	
	acttgaccac atggaaccca acccttttag gggaagccac aatgcttgat acttccaata	60
	aattcagtga cttcttaca atcgcttcga tt	92
40		
	<210> 42	
	<211> 92	
	<212> ADN	
	<213> Chlamydophila psittaci	
45		
	<400> 42	
	atttaaccac ttggaaccca acacttttag gaaaggccac aactgtcgac ggtaccaata	60
	cttactctga cttcttaca cttgcttcga tt	92

	<210>	43		
	<211>	100		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
5	<400>	43		
		acattactac atggaaccca agccttctag gatcaaccac tactttgccc aataatggtg	60	
		gtaaggatgt tctatctgat gtcttgcaaa ttgcttcgat	100	
10	<210>	44		
	<211>	97		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
15	<400>	44		
		acttgaccac atggaaccca actcttttag gggaagctac agctttagat gctagcaaca	60	
		aattctgcga cttcttaca atcgccttca ttcagat	97	
20	<210>	45		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
	<400>	45		
25		taaactgggc aagagcaact tttgatgctg atactatccg cattgctcaa cctaaattaa	60	
		aatcggagat tcttaacatt actacatgga acccaagcct t	101	
30	<210>	46		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
	<400>	46		
35		taaactgggc aagagcaact tttgatgctg atactatccg cattgctcaa cctaaattaa	60	
		aatcggagat tcttaacatt actacatgga acccaagcct t	101	
40	<210>	47		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
	<400>	47		
		taaactgggc acgagcaact tttgatgccg acactatccg catcgctcaa cctaaattgg	60	
45		cctctgctgt tatgaacttg accacatgga acccaaccct t	101	
50	<210>	48		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		

	<400>	48		
			taaactggtc aagagcaact ttgatgctg acactatccg cattgctcag cctaaattag	60
			ccactgctgt tttagattta accacttgga acccaacact t	101
5	<210>	49		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
10	<400>	49		
			taaactggtc aagagcaact ttgatgctg atactatccg cattgctcaa cctaaattaa	60
			aatcggagat tcttaacatt actacatgga acccaagcct t	101
15	<210>	50		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
20	<400>	50		
			taaactggtc aagagcaact ttgatgctg actctatccg catcgctcaa cctaaattag	60
			ccgctgctgt ttgaacttg accacatgga acccaactct t	101
25	<210>	51		
	<211>	101		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
	<400>	51		
			acattactac atggaaccca agccttctag gatcaaccac tgctttgccc aataatgctg	60
30			gtaaggatgt tctatctgat gtcttgcaaa ttgcttcgat t	101
35	<210>	52		
	<211>	21		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
	<400>	52		
40			atgaaaaaac tcttgaaatc g	21
45	<210>	53		
	<211>	21		
	<212>	ADN		
	<213>	Chlamydophila psittaci		
	<400>	53		
50			acaagcttt ctagactca t	21

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método es vivo o *in vitro* para la identificación de la presencia de ADN de un genotipo de *Chlamydomophila psittaci* (*Cp. psittaci*) en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - 5 - incubar dicha muestra con un primer oligonucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a ADN de un genotipo de *Cp. psittaci*, incubar dicha muestra con al menos un segundo oligonucleótido que es un oligonucleótido competidor, que comprende una secuencia correspondiente a una secuencia dentro del ADN de un genotipo de *Cp. psittaci* distinto del genotipo al que está dirigido la primera sonda, que puede ser alineado con la secuencia de dicha primera sonda, y
 - 10 - determinar la unión de dicho primer oligonucleótido a ADN dentro de dicha muestra, unión que es indicativa de la presencia de ADN de un genotipo de *Cp. psittaci* en dicha muestra.
- 2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho primer nucleótido comprende una secuencia de al menos 15 nucleótidos del gen *OmpA* de uno de los genotipos de *Cp. psittaci*.
- 3.- El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho primer nucleótido comprende una secuencia de al menos 15 nucleótidos dentro de la región desde el nucleótido 450 al nucleótido 600 o desde el nucleótido 900 al 1100 de la secuencia *OmpA* correspondiente al acceso de GB AF269281 y representada en SEQ ID NO: 54.
- 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho genotipo de *Cp. psittaci* se selecciona de los genotipos A, B, C, D, E, F y EB, en donde el genotipo EB se caracteriza porque comprende la secuencia *OmpA* representada en SEQ ID NO: 51.
- 5.- El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho primer oligonucleótido se marca con un grupo cromóforo en su extremo 5' y con un grupo extintor de fluorescencia en su extremo 3'.
- 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra se incuba con más de un primer oligonucleótido, y en el que cada uno de dichos más de un primer nucleótido es capaz de hibridarse a ADN de un genotipo de *Cp. psittaci*.
- 7.- El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el primer oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en
 - secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 1 para el genotipo A,
 - secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 2 para el genotipo B,
 - 35 - secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 3 para el genotipo C,
 - secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 4 para el genotipo D,
 - secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 5 para el genotipo E,
 - secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 6 para el genotipo F, y
 - secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 24 para el genotipo EB, en el que el genotipo EB se caracteriza porque
 - 40 comprende la secuencia *OmpA* representada en SEQ ID NO: 51, o una secuencia que difiere en uno a tres nucleótidos de las secuencias proporcionadas, capaces de hibridarse específicamente a dicho genotipo.
- 8.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho primer y dicho segundo oligonucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en:
 - 45 - dicho segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y dicho primer oligonucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1,
 - dicho segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 y dicho primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID. NO: 2;
 - dicho segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO:10 y en el que dicho primer oligonucleótido
 - 50 comprende la secuencia de SEQ ID. NO: 2;
 - dicho segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y dicho primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID. NO: 5;
 - dicho segundo oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO:11 y dicho primer oligonucleótido
 - 55 comprende la secuencia de SEQ ID. NO: 5.
- 9.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la unión de dicho primer oligonucleótido se determina mediante amplificación por PCR con un cebador directo y un cebador inverso.
- 10.- El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dichos cebadores directo e inverso están situados
- 60 aproximadamente 1 a 100 pb de 3' y 5' de dicho primer oligonucleótido.

11.- El método de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en el dichos cebadores directo e inverso para dicha amplificación por PCR de dicho primer oligonucleótido se seleccionan del grupo que consiste en

- cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1;
- cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2;
- cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3;
- cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19 cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4;
- cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5;
- cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6;
- cebadores que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 cuando el primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24;

o cebadores que tienen una secuencia que difiere como máximo en 5 nucleótidos de dichos cebadores sin afectar a su capacidad de actuar como un cebador para amplificación por PCR.

12.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha muestra es de un ave.

13.- El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho ave se encuentra en la fase de desarrollo en la que desaparece la inmunidad materna de dicho ave.

14.- El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho ave es un pato de aproximadamente 6 semanas después de la eclosión.

15.- El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, que es un método para identificar específicamente el genotipo de *Cp. psittaci* presente en la muestra.

16.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para determinar la eficacia de un tratamiento contra una infección por *Cp. psittaci*.

17.- Un kit de diagnóstico para la identificación de la presencia de ADN de un genotipo de *Chlamydophila psittaci* (*Cp. psittaci*) en una muestra, que comprende las sondas específicas para el genotipo y sondas competidoras:

- oligonucleótido específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, y oligonucleótido competidor específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8;
- oligonucleótido específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, y oligonucleótido competidor específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7;
- oligonucleótido específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, y oligonucleótido competidor específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10;
- oligonucleótido específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, y oligonucleótido competidor específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9; y
- oligonucleótido específico para el genotipo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, y oligonucleótido competidor específico para el genotipo, dicho primer oligonucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11.

18.- El kit diagnóstico de la reivindicación 17, que comprende uno o más de los oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23.

19.- Uso de sondas específicas para el genotipo en combinación con sondas competidoras para la identificación *ex vivo* o *in vitro* de un genotipo de *Cp. psittaci*, en donde dicha sonda competidora comprende una secuencia correspondiente a una secuencia dentro del ADN de un genotipo de *Cp. psittaci* distinto del genotipo a la que está dirigido la sonda específica para el genotipo, que se puede alinear con la secuencia de dicha sonda específica para el genotipo.

20.- El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la identificación de dicho genotipo es para el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento de infecciones por *Cp. psittaci* de muestras respiratorias de seres humanos.

475		575
A [27] (475)	GTGGGTTAATAGGGTTTTCAGCTGCAAGCTCAATCTCTACCGATCTTCCAAACGCAACTCTCTAAGCTAGGCATTACCCAGGTTGTTCTGGAATTTTATAC	
B [28] (475)	A.C.A.....C.....T.....	
C [29] (463)	...T.G.T.TG.AA.G---CT.AA.A.AT.C.....C..C.T...C...T.G...C..	
D [30] (469)	...T.G.T.TC.AA.G---G.T.TC---ATA.....A.....C.C.....C...T.G...C..	
E [31] (475)	A.C.....C.....G.....T.....	
F [32] (463)	...T.G.T.TG.AA.G---C...CG.AG.AG.T.....A.....C.T...A...T.G...C..	
475		575
A [27] (475)	G.A.G.....T.....C.....	
B [28] (475)	GTGGGTTAATAGGGTTTTCAGCTACCAACTCAACCTCTACCGATCTTCCAACTGCAACTCTCTAAGCTAGGCATTACCCAGGTTGTTGGAATTTTATAC	
C [29] (463)	...T.G.T.TG.AA.GA.G.TC.T...AAA.G---C-----C.....C.C.T...C...T.G...C..	
D [30] (469)	...T.G.T.TC.AA.GA.TG.T.TC.ATAA.....A.....C.C.....C...T.G...C..	
E [31] (475)	G.....G.....	
F [32] (463)	...T.G.T.TG.AA.GA...TC.GT.G.AG.G---A.....A.....C.T...A...T.G...C..	
920		1020
A [33] (920)	...T.....T.....AAAA.G.AG.A.C.T...A.T.T.....G...A...ATC.A...TGCTT.GCCCA.A..	
B [34] (920)	...T.....T.....AAAA.G.AG.A.C.T...A.T.T.....G...C...ATC.A...TGCTT.GCCCA.A..	
C [35] (896)	ACACTATCCGATCGCTCAACCTAAATGGCTCTGCTGTATGAACTTGACCAATGGAACCCCAACCTTTTAGGGGAAGCCCAATGCT---TGAT	
D [36] (899)	...T.....G.....A...A...T.AG.T.A...T.....A...AA.G...CTG.---C..C	
E [37] (920)	...T.....T.....AAAA.G.AG.A.C.T...A.T.T.....G...C...ATC.A...T.CTT.GCCCA.A..	
F [38] (896)	...T.....T.....A...G.....T.....T.....T...GCTT.---A...	
965		1065
A [39] (965)	CA.T.T.A.....GC...A.....TCAA...TG.T.GCCCAATA.TA..GGT..GG.TG.T..AT...TG...G...A.....	
B [40] (965)	CA.T.T.A.....GC...C.....TCAA...TG.T.GCCCAATA.TA..GGT..GG.TG.T..AT...TG...G...A.....	
C [41] (941)	...C.G...A.....C.....GG.A...TGC-----T.TAC.T.....-AA.T.A-G.....A.C.....	
D [42] (944)	ATTTACCACTTGGNACCAACTTTTAGGAAAGCCCAACTGT---CGACGGTACCAAT-ACTTACT--CTGACTTCTTACAACCTGCTTCGATT	
E [43] (965)	CA.T.T.A.....GC...C.....TCAA...T...T.GCCCAATA.T...GGT..GG.TG.T..AT...TG...G...A.....	
F [44] (941)	...C.G...A.....T.....GG.A.T...G.T.-----A.T.C.G...C-AA.T.--GC.....A.C.....	

Figura 1

965		1065	
A [39] (965)	A.....G.....A.....	A.....	
B [40] (965)	G.....	A.....	
C [41] (941)	..T.G.C.....C...T...GGA.G...A.TGC.....G.AC.TCC.T-AA..A-G..CT...A...C.....	A.....	
D [42] (944)	..TT.A.C..T.....CA..T...AAGG...A..G.....CG.C...ACC.T-CT.A.--CT...A...C.....	A.....	
E [43] (965)	ACATTACTACATGGNACCCAGCCTTCTAGGATCAACCACCTACTTTGGCCCAATAATGGTGAAGATGTTCTATCTGATGCTGTTCGCAATTCGTTGGATT	A.....	
F [44] (941)	..T.G.C.....CT..T...GGA.G.T..AG.....AG...C.A.C..C-AA.....-GC..CT...A...C.....	A.....	
890		990	
A [45] (890)	TA.....T.....AAAT.G.AGA..C.T...A.T..T.....GC...	A.....	
B [46] (890)	TA.....T.....AAAT.G.AGA..C.T...A.T..T.....GC...	A.....	
C [47] (866)	C.....C..A.....G..T.....A.....C.....	A.....	
D [48] (869)	A.....T...G.....A.....AG.T..A...T.....A...	A.....	
E [49] (890)	TA.....T.....AAAT.G.AGA..C.T...A.T..T.....GC...	A.....	
F [50] (866)	TAACTGGTCAAGAGCACTTTTGATGCTGACTCTATCCGCTCAACCTAAATAGCCGCTGTTTGAACCTTGACCACATGGNACCCCACTCTT	A.....	
965		1065	
A [39] (965)	A.....AG.....	A.....	
B [40] (965)	GGA.G...AG.....AG.....	A.....	
C [41] (941)	..T.G.C.....C...T...GGA.G...A.TGCT..A.AC.TCCA..AAAT.CAG..CT...A...C.....	A.....	
D [42] (944)	..TT.A.C..T.....CA..T...AAGG...A.C.GTC.AC...CCA..AC.TAC...CT...A...C.....	A.....	
E [43] (965)	A.....G.....	A.....	
E/B [51] (965)	ACATTACTACATGGNACCCAGCCTTCTAGGATCAACCACCTACTTTGGCCCAATAATGGTGAAGATGTTCTATCTGATGCTGTTCGCAATTCGTTGGATT	A.....	
F [44] (941)	..T.G.C.....CT..T...GGA.G.T..AGC.TTA.A..C..GCA.CAAAT.C.GC..CT...A...C.....	A.....	

Los números entre [] se refieren a números de SEQ ID

Figura 1 (continúa)

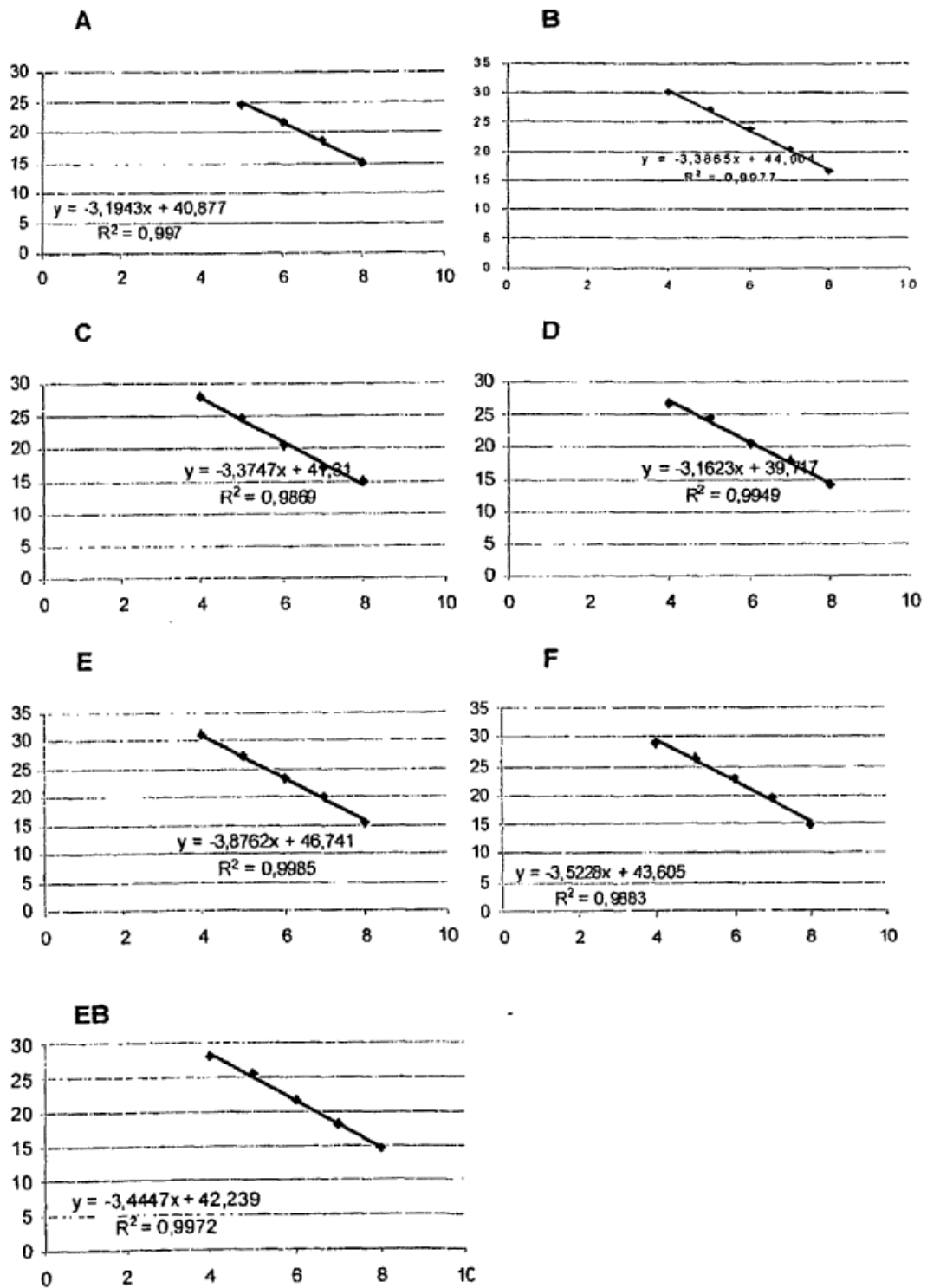
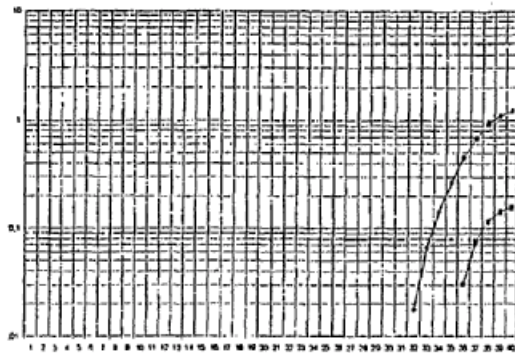
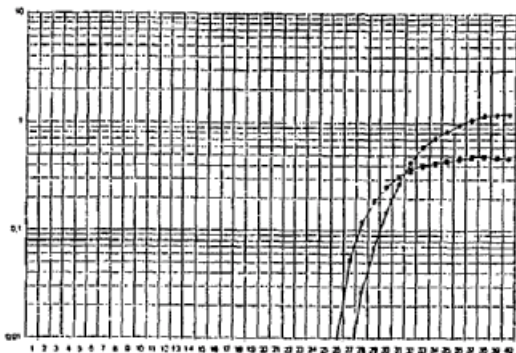


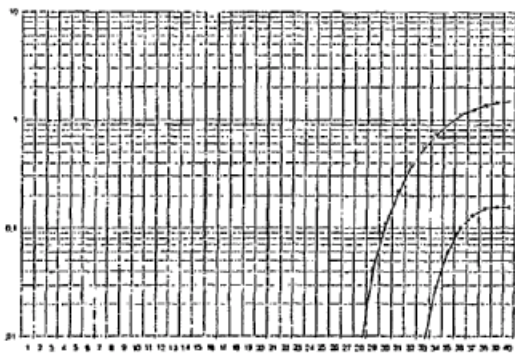
Figura 2



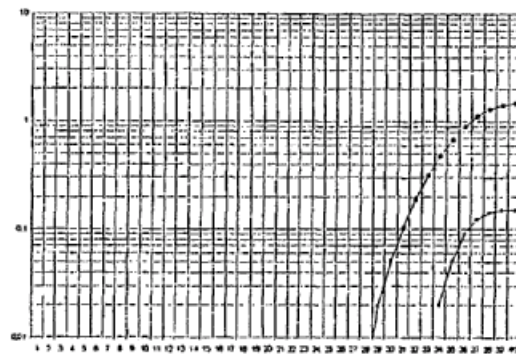
Material aislado **99**



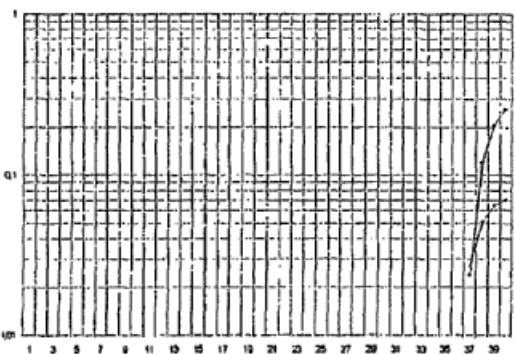
Material aislado **61/8**



Material aislado **7344/2**



Material aislado **8615/1**



Material aislado **778B15**

Figura 3