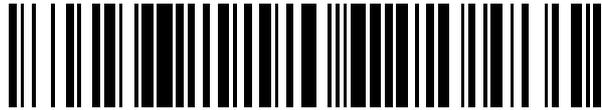


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 625**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2008 E 08712576 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2118314**

54 Título: **Método para la detección de Chlamydia trachomatis y un kit para el mismo**

30 Prioridad:

06.02.2007 NL 1033345

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

07.10.2013

73 Titular/es:

**VERENIGING VOOR CHRISTELIJK HOGER
ONDERWIJS, WETENSCHAPPELIJK
ONDERZOEK EN PATIËNTENZORG (100.0%)
DE BOELELAAN 1105
1081 HV AMSTERDAM, NL**

72 Inventor/es:

**SAVELKOUL, PAUL HENDRIK MARIA;
CATSBURG, ARNOLD y
MORRÉ, SERVAAS ANTONIE**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 424 625 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 para la detección de *Chlamydia trachomatis* y un kit para el mismo

5 La presente invención se refiere a un método para la detección de *Chlamydia trachomatis* y a un kit para el mismo.

10 *Chlamydia trachomatis* es uno de los patógenos de uretritis no gonocócica que contiene un plásmido críptico [M. Commanducci *et al.*, Mol. Microbiol., 2, n.º 4 (1998), págs. 531-538]. Se conoce un método para detectar *Chlamydia trachomatis*, un método para amplificar una secuencia parcial del plásmido críptico mediante un procedimiento de amplificación génica (documentos JP 2719225 y JP 3127135).

15 Se ha descrito un ensayo de amplificación para *Chlamydia trachomatis*, que usa desplazamiento de cadena térmico (documento EP 915170). Se ha descrito un ensayo de detección basado en la fluorescencia que usa una sonda detectora (documento EP 915173). Se ha descrito un ensayo para la detección de infección por *Chlamydia trachomatis*, basado en polipéptidos que comprenden un antígeno de *Chlamydia trachomatis* (documento WO 01-4074). Se ha descrito un método para llevar a cabo una detección por PCR de *Chlamydia trachomatis* (documento EP 1598431). Se ha descrito un método de amplificación de ADN y un kit para el mismo, basado en la tecnología de amplificación por PCR (documento EP 1602734).

20 Se ha encontrado que surgen problemas con la observación y/o detección de *Chlamydia trachomatis* en determinadas condiciones. Un artículo de Söderblom *et al.* (Euro Surveill. 7 de diciembre de 2006; 11 (12)): E061207.1) titulado "Impact of a genetic variant of *Chlamydia trachomatis* on national detection rates in Sweden" informa de que parte de las infecciones de transmisión sexual por *Chlamydia trachomatis* no pudieron observarse en Suecia mediante las pruebas de laboratorio convencionales producidas por Abbott y Roche, y de que no se observaron bacterias *Chlamydia* con una variación en la región genética a la que se habían dirigido los cebadores.

25 Por lo tanto, hay una necesidad de alternativas a las pruebas convencionales mediante la cual, por ejemplo, puedan observarse de hecho tales variantes genéticas de *Chlamydia trachomatis*.

30 El objetivo de la presente invención es por tanto proporcionar un método para la detección rápida de *Chlamydia trachomatis*, que tenga una buena sensibilidad y especificidad, y un kit para el mismo.

35 El objetivo de la invención se consigue mediante un método para la detección de *Chlamydia trachomatis*, comprendiendo el método la realización de una amplificación de ADN que implica el uso de un par de cebadores mediante el empleo de ADN derivado a partir de una muestra como molde, y la detección de un producto de amplificación, caracterizado porque el par de cebadores empleado para la amplificación de ADN se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 (es decir están en la región ORF3 del plásmido críptico mencionado anteriormente, como conoce bien el experto en la técnica).

40 Los inventores han encontrado que cuando se lleva a cabo una amplificación de ADN, tal como por ejemplo PCR (siempre que se menciona PCR en el contexto de la presente solicitud, el significado pretendido es el de amplificación de ADN, de la que PCR es una realización) con cebadores que se diseñan basándose en tales regiones específicas en el plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*, puede observarse rápidamente *Chlamydia trachomatis*, y también pueden observarse por ejemplo las variantes conocidas de *Chlamydia trachomatis*, tales como las encontradas por ejemplo en Suecia. Otro método de amplificación de ADN adecuado para la determinación de patógenos se describe en el documento WO 2005/060725 y se incorpora en el presente documento como referencia.

45 El par de cebadores para la amplificación de ADN, tal como PCR, se diseña preferiblemente basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391, más preferiblemente a los números de nucleótidos de 4291 a 4320 y 4355-4385 y lo más preferiblemente a los números de nucleótidos de 4296 a 4318 y de 4361 a 4382 de SEQ ID No. 1.

50 Se ha encontrado que los resultados mejoran a medida que aumenta la preferencia para las regiones de nucleótidos basándose en los cuales se diseñan los cebadores independientes para el par de cebadores. Dicho de otro modo, la preferencia dada anteriormente se basa en los mejores resultados obtenidos con el par de cebadores en las regiones preferidas especificadas.

55 Dicho de otro modo, el par de cebadores con la mayor preferencia se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones en SEQ ID No. 1: GGATT GACTCCGACA ACGTATTC y TGCCCTTTCT AATGGCAATGAT, que corresponden respectivamente a la región de 4296 a 4318 y de 4361 y de 4382 en SEQ ID No. 1. Un primer cebador se dirige preferiblemente a toda la región GGATT GACTCCGACA ACGTATTC, y el segundo cebador del par de cebadores se dirige a toda la región TGCCCTTTCT AATGGCAATGAT. El experto en la técnica comprenderá que las otras regiones descritas anteriormente pueden establecerse basándose en lo que se ha dicho anteriormente.

5 El experto en la técnica comprenderá que el ADN derivado de una muestra significa el ADN que está aislado o se obtiene a partir de un organismo, tal como una persona, que va a someterse a prueba, pero también incluye copias, replicados y formas procesadas de tal ADN, obtenidas por ejemplo mediante síntesis química o PCR, partiendo del ADN original aislado del organismo.

10 La muestra usada no se somete a limitaciones particulares, siempre que contenga o pueda contener *Chlamydia trachomatis*. Ejemplos de esta comprenden orina, raspado uretral (conducto urinario), frotis de cuello uterino, etc. El ADN puede extraerse a partir de estas muestras mediante el método conocido por el experto en la técnica, mediante el cual puede prepararse ADN, incluyendo ADN del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*. Se prefiere particularmente emplear el kit de preparación de ADN de CT COBAS de Roche, porque se ha encontrado que proporciona resultados particularmente ventajosos. Será obvio para el experto en la técnica que el ADN puede ser o bien ADN puro aislado o bien ADN que está presente en un lisado sin procesar.

15 Por tanto, los pares de cebadores que pueden emplearse en la invención pueden elegirse en las regiones descritas anteriormente y en particular de tal manera que la región de nucleótidos puede amplificarse/replicarse entre las dos regiones

20 El par de cebadores usado en la presente invención se diseña basándose en una secuencia de nucleótidos de la región que corresponde a los números de nucleótidos de 4261 a 4320, preferiblemente de 4291 a 4320 y más preferiblemente de 4296 a 4318 (primera región) y de 4351 a 4391, preferiblemente 4355-4385 y más preferiblemente de 4361 a 4382 (segunda región), tal como se mencionó anteriormente y en SEQ ID No. 1, de modo que la secuencia de nucleótidos puede amplificarse (replicarse) entre estas dos regiones con la ayuda del par de cebadores.

25 Según la invención, la longitud de los cebadores es por ejemplo de entre 10 y 40 nucleótidos. Además, la posición de cada región y la longitud de los cebadores se eligen preferiblemente de modo que el valor de Tm del cebador en cuestión y el molde de ADN correspondiente se encuentra entre 50 y 70°C, y por tanto la temperatura de hibridación usada en PCR puede fijarse a un valor relativamente alto. El valor de Tm usado aquí es un valor que se calcula mediante el análisis del par de bases vecino más cercano. Los cebadores pueden tener básicamente el mismo valor de Tm.

35 El experto en la técnica comprenderá que el término "diseñado basándose en" significa que, con las estipulaciones especificadas para el cebador, tales como el valor de Tm y la longitud del cebador, que se describen en el presente documento, el cebador se diseña de modo que puede ser complementario a la secuencia o bien en la cadena sentido o bien en la cadena antisentido de la secuencia de nucleótidos de las regiones según la invención descritas anteriormente y de manera especial en las reivindicaciones. Por tanto, el diseño comienza con la secuencia a la que tiene que unirse el cebador, y con las estipulaciones y en el contexto de la presente invención, el cebador puede ser complementario a la secuencia a la que tiene que unirse.

40 PCR es el método de detección según la presente invención, y puede llevarse a cabo según el método de PCR normal, siempre que se use como molde el ADN obtenido a partir de la muestra, y que se use un conjunto de cebadores específicos según la invención. En particular, se emplea PCR en tiempo real en el método según la invención (ensayo TaqMan, véase el ejemplo), porque éste ha dado resultados particularmente buenos.

45 El par de cebadores puede diseñarse de tal manera que puede replicarse (amplificación) la secuencia de nucleótidos entre las dos regiones (es decir la región entre la ubicación en la que se unirá un primer cebador en las condiciones de PCR y la ubicación en la que se unirá un segundo cebador en las condiciones de PCR). Esto significa que un cebador puede ser un cebador sentido, y el otro puede ser un cebador antisentido.

50 La secuencia de nucleótidos reproducidas en SEQ ID No. 1 se deriva del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* (cepa L2), depositado en el GeneBank con el número de registro X07547, basándose en la publicación de Commanducci (véase anteriormente), y reproducida en la solicitud de patente holandesa número 103345, que es el documento de prioridad para la presente solicitud y que se incluye en el presente documento como referencia. El experto en la técnica comprenderá que una PCR llevada a cabo con un par de cebadores según la invención podrá conducir a la replicación del ADN en este plásmido cíclico. Ya que el plásmido críptico es un plásmido cíclico, tiene dos secuencias de nucleótidos entre las dos regiones basándose en las cuales se diseña el par de cebadores. Sin embargo, los cebadores se diseñan habitualmente de tal manera que pueda replicarse (amplificación) la secuencia de nucleótidos más corta.

60 Los ejemplos de los pares de cebadores preferidos según la presente invención comprenden una combinación de pares de cebadores que se diseñan basándose en una secuencia de nucleótidos de una región que corresponde a los números de nucleótidos de 3654 a 4320, preferiblemente de 4261 a 4320, más preferiblemente de 4291 a 4320 y lo más preferiblemente de 4296 a 4318 (primera región) y basándose en una secuencia de nucleótidos de una región que corresponde a los números de nucleótidos 4355-4385 y preferiblemente de 4361 a 4382 (segunda región).

Otro ejemplo preferido de los pares de cebadores según la presente invención implica una combinación de pares de cebadores diseñados basándose en una secuencia de nucleótidos de una región que corresponde a los números de nucleótidos de 4291 a 4320, preferiblemente de 4296 a 4318 (primera región) y una secuencia de nucleótidos de una región que corresponde a los números de nucleótidos de 4351 a 4391, preferiblemente de 4355 a 4385, más preferiblemente de 4361 a 4382 (segunda región).

El diseño de la secuencia de nucleótidos del par de cebadores es obvio para el experto en la técnica si conoce las secuencias correspondientes en SEQ ID No. 1, dadas a conocer en esta invención. La SEQ ID No. 1 es una de las cadenas de ADN del plásmido críptico bicatenario. Esta cadena se denomina en el presente documento cadena sentido. La cadena contraria, que es complementaria a esta cadena sentido, se denomina en el presente documento cadena antisentido. En cuanto a la amplificación, por ejemplo con ayuda de PCR, el experto en la técnica sabrá que debe basar la secuencia del cebador del par de cebadores que va a usarse en la secuencia descrita anteriormente, que corresponde a la secuencia de la cadena sentido del plásmido críptico (el denominado cebador "directo"). Basará la secuencia del otro cebador del par de cebadores en la secuencia de la cadena antisentido, denominado cebador "inverso".

Las secuencias de los cebadores en cuestión se eligen preferiblemente de modo que la amplificación completada conduce a un producto de amplificación que es específico para la secuencia del plásmido críptico prevista que va a amplificarse. Por tanto, no es necesario que la secuencia de los cebadores seleccionados sea completamente idéntica a dicha secuencia en SEQ ID No. 1 descrita anteriormente (ni tampoco se necesita que sea completamente complementaria a la misma). Los apareamientos erróneos son aceptables, siempre que se mantenga la especificidad de la amplificación. Preferiblemente, la secuencia de los cebadores concuerda completamente con la definida por SEQ ID No. 1 (o con la secuencia que es complementaria a la misma).

En los casos que se producen en la práctica en los que la especificidad es relevante, por ejemplo cuando puede esperarse polimorfismo en el ADN que va a amplificarse, especialmente en sitios en el ADN en los que uno de los cebadores que va a usarse debe hibridarse, es preferible usar más de un cebador cuya secuencia sea complementaria a los diversos polimorfismos. En un conjunto de cebadores de este tipo facilitado a continuación, hay dos cebadores directos (que sólo difieren uno del otro en un sitio de la secuencia) y un solo cebador inverso. Esto hace posible detectar un polimorfismo en G4307A de *Chlamydia trachomatis* en SEQ ID No. 1, cuya posición está ocupada por uno de los cebadores que van a usarse según la invención. Por supuesto, también es posible en tal caso usar un solo cebador directo y más de un cebador inverso. Si se quiere demostrar un número de polimorfismos en una región en la que se hibrida un cebador, puede emplearse el mismo número de cebadores diferentes, siendo cada uno específico a uno de tales polimorfismos.

El par de cebadores para la región específica mencionada anteriormente puede diseñarse con la ayuda de los métodos que conoce el experto en la técnica, teniendo en cuenta las condiciones de PCR. El par de cebadores puede diseñarse usando un programa informático.

El par de cebadores puede diseñarse como un cebador mixto obtenido mezclando dos o más cebadores para el cebador sentido o el antisentido, o para ambos. Cuando se produce una mutación de nucleótido en la región para la que se ha diseñado el cebador, la sensibilidad de la observación/detección puede aumentarse usando un cebador mixto (véase también a continuación).

Aunque las condiciones de PCR pueden determinarse según el método de PCR habitual, la temperatura de hibridación puede fijarse a un valor relativamente alto, debido a los pares de cebadores específicos mencionados en el presente documento. La temperatura de hibridación está habitualmente entre 50 y 70°C.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección de *Chlamydia trachomatis* mediante la realización de PCR en el que se usa el ADN obtenido a partir de una muestra como molde.

El kit que se considera particularmente en el presente documento para la detección de *Chlamydia trachomatis* mediante PCR, que usa el ADN obtenido a partir de una muestra como molde, comprende un par de cebadores diseñados basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391 en la secuencia de nucleótidos en SEQ ID No. 1.

Más particularmente, se obtuvieron buenos resultados con un kit según la invención que se caracteriza porque el par de cebadores se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391; preferiblemente a los números de nucleótidos de 4291 a 4320 y 4355-4385, y lo más preferiblemente a los números de nucleótidos de 4296 a 4318 y de 4361 a 4382 de SEQ ID No. 1.

Se obtienen resultados particularmente favorables con un kit que se caracteriza porque el par de cebadores en el kit se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones en SEQ ID No. 1: GGATT GACTCCGACA ACGTATTC (SEQ ID No. 2) y TGCCCTTCT AATGGCAATGAT (SEQ ID No. 3). Como ya se explicó anteriormente,

todas las secuencias anteriores de los cebadores se reproducen basándose en la cadena sentido del plásmido críptico.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un par de cebadores diseñados basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 3654 a 4320 y de 4351 a 4448 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1, de acuerdo con el objetivo de la invención, tal como por ejemplo la detección de *Chlamydia trachomatis*. Esto significa que los pares de cebadores previstos según la invención son los que son adecuados para su uso para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

10 Más especialmente, los pares de cebadores según la invención se caracterizan porque se diseñan basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391, preferiblemente a los números de nucleótidos de 4291 a 4320 y 4355-4385, y lo más preferiblemente a los números de nucleótidos de 4296 a 4318 y de 4361 a 4382 de SEQ ID No. 1.

15 En el caso más preferido, el par de cebadores se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones en SEQ ID No. 1: GGATT GACTCCGACA ACGTATTC (SEQ ID No. 2) y TGCCCTTCT AATGGCAATGAT (SEQ ID No. 3).

En una realización preferida, se usa un par de cebadores con las siguientes secuencias:

20

CT directo 5'-GGA TTG ACT CCG ACA ACG TAT TC-3'

CT inverso 5'-ATC ATT GCC ATT AGA AAG GGC A-3'

25 Con respecto a su secuencia, el CT directo corresponde a los nucleótidos 4296-4318 de SEQ ID No. 1, y el CT inverso corresponde a la secuencia de nucleótidos antisentido 4361-4382 de SEQ ID No. 1.

30 En una realización ventajosa de la invención, también se proporciona un conjunto de cebadores que comprende un par de cebadores según la invención, junto con un cebador complementario que difiere en un solo nucleótido de uno de los cebadores del par de cebadores con respecto a su secuencia. Como ya se explicó anteriormente, esto ofrece la posibilidad de demostrar uno o más polimorfismos en las regiones en el plásmido críptico con los que se hibrida uno de los cebadores del par de cebadores.

35 Se prefiere incluso más añadir también un segundo cebador directo al par de cebadores con el fin de hacer posible detectar el polimorfismo G4307A:

CT directo 2 5'-GGA TTG ACT CCA ACA ACG TAT TC-3'

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una sonda de hibridación que puede hibridarse en la región replicada con la ayuda del par de cebadores según la invención. La sonda de hibridación contiene preferiblemente un oligonucleótido que se diseña basándose en la secuencia de nucleótidos de la región que corresponde a los números de nucleótidos de 4320 a 4355, diseñándose preferiblemente la sonda de hibridación basándose en la secuencia de nucleótidos TACGTGTAGG CGGTTTAGAA AGCGGGTGT (SEQ ID No. 4). En el caso más preferido, la sonda de hibridación tiene como objetivo la secuencia completa descrita anteriormente y da resultados de detección excepcionalmente buenos. En particular, la sonda de hibridación tiene la siguiente secuencia:

45 CT inverso 5'-ACA CCG CTT TCT AAA CCG CCT ACA CGT AA-3'

50 Una sonda de hibridación de este tipo se dota generalmente de una etiqueta para facilitar la detección. El experto en la técnica conoce las condiciones en las que se usa la hibridación; estas condiciones pueden ser por ejemplo las mismas que las descritas en el documento US 2006/0246447.

55 El experto en la técnica comprenderá que la sonda de hibridación usada para la detección puede ser complementaria o bien a una cadena sentido o bien a una cadena antisentido.

La longitud de cadena del oligonucleótido es normalmente de 15 a 30 nucleótidos, y su valor de Tm puede ser de 50 a 70°C.

60 Cuando se usa PCR en tiempo real, la sonda de hibridación tiene preferiblemente un valor de Tm que es de 1 a 5 grados C mayor que el valor de Tm de un cebador, de modo que la sonda puede hibridarse con la secuencia diana antes de que se hibride el cebador. La invención se explica en más detalle con la ayuda de los siguientes ejemplos y dibujos, en los que:

65 La figura 1 es un gráfico que muestra el límite de detección de *Chlamydia trachomatis* y la muestra de referencia interna (IR) en la prueba de PCR en tiempo real. El ADN usado se derivó a partir de diluciones en serie de *Chlamydia trachomatis* con 100, 10, 1, 0,1 y 0,001 UFI/PCR. La pendiente del gráfico es de -2,9, la ordenada en el

origen es de 29,4 y R^2 es de 0,994. El eje x del gráfico representa los valores de UFI iniciales de *Chlamydia trachomatis*, expresados como equivalentes de log UFI por reacción de PCR. El eje y representa el ciclo de umbral (C_T).

- 5 La figura 2 es un gráfico para: A) ADN aislado a partir de *Chlamydia trachomatis* (CT) pura, B) *Chlamydia trachomatis* mezclada con otra bacteria, y C) ADN mixto que no contiene ADN de *Chlamydia trachomatis*, todos realizados por duplicado. El eje x del gráfico representa el número de ciclos (número de ciclo) y el eje y representa la intensidad fluorescente tras la eliminación de la señal de fondo.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

Introducción

15 *Chlamydia trachomatis* es una bacteria Gram negativa intracelular estricta. En la actualidad se conocen quince serotipos diferentes de la misma, incluyendo ocho (D-K) que causan infecciones del aparato genitourinario. La infección es generalmente asintomática en mujeres y las infecciones no tratadas pueden conducir a endometritis, salpingitis y esterilidad. Se cree que la exploración de infecciones asintomáticas reduciría la transmisión de CT y el desarrollo de complicaciones graves¹ (los números en superíndice indican las referencias de bibliografía indicadas más adelante). Pruebas de replicación de ácido nucleico han sustituido ahora a la detección de antígeno y al cultivo celular para el diagnóstico de infecciones por CT. Se ha descrito un gran número de pruebas de replicación de ácido nucleico comerciales e internas. La mayor parte de pruebas de replicación anteriores²⁻⁸ tiene inconvenientes importantes, tales como procesamiento manual, sistemas abiertos, etapas independientes para replicación y análisis de amplicón, y sensibilidad a la contaminación. Se ha encontrado que la PCR en tiempo real es una alternativa sensible que es fácil de llevar a cabo. A pesar de las mejoras en la PCR en tiempo real, no siempre pueden extraerse de manera fiable las sustancias inhibitoras específicas del tipo presentes en algunas muestras clínicas de la muestra durante la preparación. Esta inhibición puede reconocerse mediante el uso de una referencia interna. Especialmente cuando se deben someterse a prueba muestras que no están aprobadas por la FDA, tales como frotis rectales, para detectar la presencia de *trachomatis*, un tipo de muestra que ha recibido mucha atención con los brotes recientes de LGV inducida por *Chlamydia trachomatis* entre hombres que tienen relaciones con hombres (MSM). Este estudio se ocupa del desarrollo y la validación de PCR en tiempo real con una referencia interna que tiene en cuenta tanto la inhibición como la extracción de ácido nucleico a partir de muestras clínicas.

35 Material y métodos

Desarrollo de PCR en tiempo real

40 Se ha desarrollado una PCR en tiempo real (ensayo de TaqMan) dirigida al plásmido críptico de *trachomatis*. Se desarrollaron los cebadores y la sonda se desarrollaron con Primer Express 1.0 (de Opliet Biedsystem). Se llevaron a cabo reacciones de PCR en tiempo real en un volumen de PCR de 30 μ l, que contenía 1x TaqMan Mastermix (de Applied Biosystems), 300 nM de cada cebador, 150 nM de cada sonda y 10 μ l del ADN extraído, aparte de las muestras que se prepararon con el kit de Roche (14 μ l). Se llevaron a cabo la replicación y detección con un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7000 (de Applied Biosystems) en condiciones de PCR convencional, estipuladas por el fabricante, usando 45 ciclos.

Determinación de la sensibilidad

50 Se determinó la sensibilidad llevando a cabo PCR en tiempo real en una dilución en serie de ADN descrita anteriormente a partir de la cepa L2 de LGV de *Chlamydia trachomatis* (región 10-0,001 UFI). Se compararon los resultados con la CT-PCR interna notificada anteriormente y una PCR disponible comercialmente (COBAS Amplicor de Roche).

Determinación de la especificidad

55 Se determinó la especificidad *in silico*, llevando a cabo una búsqueda de BLAST de todos los oligonucleótidos usados en este estudio. Se investigó adicionalmente la especificidad llevando a cabo una CT-PCR con diversas especies bacterianas, concretamente *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Protheus mirabilis* (ATCC 43071), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecium* (aislado clínico), *Moraxella catarrhalis* (aislado clínico), *Haemophilus influenza* (aislado clínico), así como un panel que contenía todos los serotipos de *Chlamydia trachomatis*.

Evaluación de PCR en tiempo real

65 Se sometieron a prueba muestras clínicas (frotis de cuello uterino), que habían sido positivas (N = 100) y negativas

(N = 100) en el método de PCR COBAS de Roche, en la nueva PCR en tiempo real tras 1) el aislamiento de ADN a partir de las muestras originales recogidas en 2 SP con el kit de HPPTP (de Roche), y 2) el kit de preparación de ADN de CT COBAS (CDPK) disponible comercialmente.

5 Validación de la referencia interna

La referencia interna usada en este estudio fue una muestra de referencia de la invención y particularmente adecuada que hace posible comprobar las pruebas para determinar un buen rendimiento. Usa los mismos sitios de unión a cebador que el nuevo ensayo de CT en tiempo real, pero tiene una secuencia artificial como sitio de unión a sonda para monitorizar el aislamiento de ADN, incluyendo la lisis de las muestras. Dicho de otro modo, la referencia interna es una secuencia de ADN diana que puede observarse usando los mismos cebadores que los que se usan para observar la *Chlamydia* descrita en el presente documento, pero también puede observarse con una sonda de hibridación que es diferente de la usada para observar la *Chlamydia* descrita en el presente documento. Por ejemplo, puesto que el ADN al que se dirige esta sonda de hibridación diferente es diferente del usado para la detección de *Chlamydia*. Se transfirió la diana de la referencia interna al genoma de una *E. coli* (cepa DH5 α) con la ayuda del vector suicida pBSL182. Mediante adición de cantidades conocidas de la cepa DH5 α de *E. coli* alterada en las muestras clínicas, se monitoriza el aislamiento de ADN y la inhibición específica de cebador en cada amplificación de PCR. Se determinó la cantidad exacta de DH5 α de *E. coli* añadida mediante el uso de una dilución en serie (0-20.000 ufc). Se llevó a cabo la adición de de cantidades conocidas en frotis de cuello uterino clínicos tanto negativos para COBAS como positivos para COBAS, antes del aislamiento de ADN con el fin de determinar la cantidad de la muestra de referencia interna necesaria para una recuperación fiable sin una disminución de la sensibilidad del ensayo de *Chlamydia trachomatis*. Se aisló ADN a partir de todas las muestras tal como se describió anteriormente, o bien mediante HPPTP o bien mediante CDPK.

25 Adición de cantidades conocidas de referencia interna a muestras clínicas

Se añadió a las muestras clínicas mencionadas anteriormente de manera conocida la cantidad óptima de IR con el fin de validar la referencia interna, lo que también se usa para comprobar el procedimiento de preparación de la muestra.

30 Resultados

Sensibilidad y especificidad de la nueva PCR en tiempo real

35 Se determinó el límite inferior de detección usando diluciones en serie de una cepa L2 de LGV de *Chlamydia trachomatis* y analizando los resultados mediante PCR en tiempo real, tal como se describió anteriormente⁶. Se encontró que la sensibilidad era de 0,01 UFI/PCR. Esta sensibilidad es idéntica a la de PCR que no es en tiempo real desarrollada previamente, mientras se notificó una sensibilidad de 1 UFI para la PCR disponible comercialmente de Roche y para LCr de Abbott. El ensayo puede detectar todos los serotipos de *Chlamydia trachomatis* presentes en el panel. Se investigó la especificidad del ensayo de CT en tiempo real comparando las cuantificaciones de *Chlamydia trachomatis* pura con las de ADN a partir de *Chlamydia trachomatis* mezclado con ADN aislado a partir de otros nueve tipos de bacterias. Tal como se muestra en la figura 2, la PCR no mostró ninguna reacción cruzada con ADN extraño.

45 Evaluación de PCR en tiempo real con muestras clínicas

Se sometieron a prueba todas las muestras clínicas, que se había encontrado que eran o bien positivas (N = 100) o bien negativas (N = 100) en la PCR COBAS de Roche, mediante el método de PCR en tiempo real nuevo tras el aislamiento de ADN o bien mediante el HPPTP o bien mediante el procedimiento de CDPK: todas las muestras dieron los mismos resultados que el método COBAS original.

Validación de la referencia interna

55 Antes de la preparación de las muestras con la ayuda del kit de HPPTP o del procedimiento de CDPK, se añadieron a diez muestras clínicas cantidades conocidas de diversas diluciones en serie de la cepa DH5 α de *E. coli* modificada, lo que mostró que la mejor cantidad de la muestra de referencia interna era de 200 ufc en el procedimiento de HPPTP y de 2000 ufc en el procedimiento de CDPK. Para determinar si la adición de IR da como resultado la misma sensibilidad, se sometieron a prueba las mismas diluciones en serie tras la adición de 200 ufc de IR. Tal como se muestra en la figura 1, el ensayo fue lineal entre 1000 y 0,01 UFI/PCR para el ensayo que incluyó la IR, lo que significa que 0,01 UFI/PCR siguió siendo el límite inferior de detección.

Validación de la referencia interna en muestras clínicas

65 Se replicaron muestras que fueron negativas para *Chlamydia trachomatis* y que contenían la muestra de referencia interna, y se calculó el promedio de los valores C_1 resultantes para hallar la variación analítica en los valores para *Chlamydia* y para el punto de corte de inhibición. Se fijó el valor de punto de corte de inhibición a $C_1 = 40,1$ para

HPPTP y a 37,1 para CDPK. Entonces se sometieron a prueba los frotis de cuello uterino para detectar infección por *Chlamydia trachomatis*, usando el ensayo que incluye IR. Si tanto la muestra de referencia interna como la muestra de *Chlamydia* eran negativas, se consideró que la muestra estaba inhibida, de modo que se examinó de nuevo (N = 6). Si la muestra resultó ser negativa de nuevo, se consideró imposible de interpretar (N = 3). No se consideró la muestra de referencia interna cuando se encontró que la muestra de *Chlamydia* era positiva. Las muestras se consideraron negativas si *Chlamydia* era negativa y la muestra de referencia interna era positiva. Se confirmaron los resultados de la prueba COBAS originalmente positivos y negativos.

Discusión

Una de las características que son importantes para la amplificación de microorganismos en las muestras clínicas es la monitorización y la comprobación del procedimiento con la ayuda de referencia internas. Para un ensayo de PCR en tiempo real específico de patógeno, tendría que añadirse la muestra de referencia interna ideal a las muestras clínicas antes del tratamiento, la recuperación durante la extracción de nucleína y la replicación o bien en una PCR de múltiplex o bien en una competitiva con detección directa mediante sondas fluorescentes. Ninguno de los ensayos de PCR en tiempo real descritos hasta ahora⁷⁻⁹ tiene tal referencia interna que pueda comprobar la preparación de la muestra y la inhibición en la etapa en la que se detecta *Chlamydia trachomatis*. La mayoría de los otros ensayos en tiempo real usan otros microorganismos para monitorizar la extracción de ADN, siendo un ejemplo el herpesvirus PhHV¹⁰. Aunque este método puede monitorizar la eficacia de la preparación de ADN, no puede monitorizar la inhibición específica de la ubicación primaria, y puesto que estos ensayos se basan principalmente en PCR de dúplex, puede suponerse que la competencia entre los dos amplicones conduce a una sensibilidad reducida de los ensayos. Las diferencias entre HPPTP con sólo 200 ufc de muestra de referencia interna en comparación con las 2000 ufc para el procedimiento de CDPK es lo más probablemente el resultado del hecho de que el ensayo de HPPTP conduce a ADN puro, mientras que CDPK sólo da una preparación que es lo suficientemente limpia para el ensayo. Es interesante que no se encontró ninguna diferencia en la sensibilidad de diagnóstico entre los dos procedimientos, lo más probablemente porque, en una célula epitelial positiva para *Chlamydia*, una sola inclusión de *Chlamydia* puede contener más de 10.000 de partículas de *Chlamydia*, teniendo cada una aproximadamente 10 dianas de plásmido. La referencia interna representada en este estudio puede monitorizar simultáneamente la eficacia de preparación de ADN y la inhibición de PCR específica de cebador en el mismo ensayo de PCR. Este hecho, en combinación con el kit de preparación de ADN de CT COBAS de Roche rápido y más fácil, proporciona un ensayo de *Chlamydia* mediante PCR en tiempo real en muy fiable, rápido y rentable que es altamente adecuado para el trabajo de rutina.

Bibliografía

1. S.A. Morre, R. Welte y M.J. Postma: "Major improvements in cost effectiveness of screening women for Chlamydia trachomatis using pooled urine specimens and high performance testing", *Sex. Transm. Infect.*, 78 (2002), págs. 74-75
2. N. DiDomenico, H. Link, R. Knobel, T. Caratsch, W. Weschler, Z.G. Loewy *et al.*: "COBAS AMPLICOR: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR", *Clin. Chem.*, 42 (1996), págs. 1915-23
3. H. Keegan, A. Malkin, M. Griffin, F. Ryan y H. Lambkin: "Validation of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis in cervical PreservCyt samples", *Clin. Chem.*, 51 (2005), págs. 1301-2
4. S.A. Morre, P. Sillekens, M.V. Jacobs, P. van Aarle, S. de Blok, B. van Gemen *et al.*: "RNA amplification by nucleic acid sequence-based amplification with an internal standard enables reliable detection of Chlamydia trachomatis in cervical scrapings and urine samples", *J. Clin. Microbiol.*, 34 (1996), págs. 3108-14
5. S.A. Morre, I.G. van Valkengoed, R.M. Moes, A.J. Boeke, C.J. Meijer y A.J. van den Brule: "Determination of Chlamydia trachomatis prevalence in an asymptomatic screening population: performances of the LCx and COBAS Amplicor tests with urine specimens", *J. Clin. Microbiol.*, 37 (1999), págs. 3092-6
6. R. Roosendaal, J.M. Walboomers, O.R. Veltman, I. Melgers, C. Burger, O.P. Bleker *et al.*: "Comparison of different primer sets for detection of Chlamydia trachomatis by the polymerase chain reaction", *J. Med. Microbiol.*, 38 (1993), págs. 426-433
7. M. Eickhoff, T. Laue, T. Ruckes, S.O. Cramer, G. Krupp y C. Tiemann: "Ultra-rapid detection of Chlamydia trachomatis by real-time PCR in the LightCycler using SYBR green technology or 5'-nuclease probes", *Clin. Lab.*, 49 (2003), págs. 217-225
8. H. Jalal, H. Stephen, M.D. Curran, J. Burton, M. Bradley y C. Came: "Development and validation of a rotor-gene real-time PCR assay for detection, identification and quantification of Chlamydia trachomatis in a single reaction", *J. Clin. Microbiol.*, 44 (2006), págs. 206-213

9. M.G. Koenig, S.L. Kosha, B.L. Doty y D.G. Heath: "Direct comparison of the BD ProbeTec ET system with in-house LightCycler PCR assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* from clinical specimens", *J. Clin. Microbiol.*, 42 (2004), págs. 5751-6

10. G.J. van Doornum, J. Guldemeester, A.D. Osterhaus y H.G. Niesters: "Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture", *J. Clin. Microbiol.*, 41 (2003), págs. 576-580

Ejemplo 2

Tal como se describió anteriormente, se encontró que se producen problemas con la observación de *Chlamydia trachomatis* en determinadas condiciones. Un artículo de Söderblom *et al.* (*Euro Surveill.* 7 de diciembre de 2006; 11 (12)): E061207.1) titulado "Impact of a genetic variant of *Chlamydia trachomatis* on national detection rates in Sweden" informa de que parte de las infecciones de transmisión sexual por *Chlamydia trachomatis* no pudieron observarse en Suecia mediante pruebas de laboratorio convencionales producidas por Abbott y Roche, y de que no se observaron bacterias *Chlamydia* con variación en la región genética a la que se habían dirigido los cebadores. Pruebas llevada a cabo mediante el método usado en el ejemplo 1 han mostrado que tales tipos de *Chlamydia trachomatis* de hecho pueden observarse usando pares de cebadores según la presente invención.

Lista de secuencias

<110> Dutch Association for Christian Higher Education, Scientific Research and Patient Care, Ámsterdam, Países bajos

<120> Método para la detección de *Chlamydia trachomatis* y un kit para el mismo

<130> Documento P28659NL00

<150> Documento NL1033345

<151> 06-02-2007

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 7499

<212> ADN

<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 1

ES 2 424 625 T3

ggtaagtcct ctagtacaaa cacccccaat attgtgatat aattaaatt atattcatat 60
 tctgttgcca gaaaaaacac ttttaggcta tattagagcc atcttcttg aagcgttgc 120
 ttctcgagaa gatttatcgt acgcaaatat catctttgcg gttgcgtgtc ctgtgacctt 180
 cattatgtcg gagtctgagc accctaggcg tttgtactcc gtcacagcgg ttgctcgaag 240
 cacgtgctgg gttatcttaa aagggattgc agcttgtagt cctgcttgag agaacgtgcg 300
 ggcgatttgc cttaacccca ccatttttcc ggagcagatt acgaagacaa aacctcttcg 360
 ttgaccgatg tactcttgta gaaagtgc ataaacttctga ggataagtta taataatcct 420
 ctttctgtc tgacggttct taagctggga gaaagaaatg gtagcttgtt ggaaacaaat 480
 ctgactaatc tccaagctta agacttcaga ggagcgttta cctccttgga gcattgtctg 540
 ggcgatcaac caatcccggg cattgatttt ttttagctct ttttaggaagg acgctgtttg 600
 caaactgttc atcgcactctg ttttactat ttccctgggt ttaaaaaatg ttcgactatt 660
 ttctgttta gaaggttgcg ctatagcgac tattccttga gtcactctgt ttaggaatct 720
 tgtaaggaa atatagcttg ctgctcgaac ttgtttagta ccttcggtcc aagaagtctt 780
 ggcagaggaa acttttttaa tcgcatctag aattagatta tgatttaaaa gggaaaactc 840
 ttgcagattc atatccaagg acaatagacc aatcttttct aaagacaaaa aagatcctcg 900
 atatgatcta caagtatggt tgttgagtga tgcggtccaa tgcataataa cttcgaataa 960
 ggagaagctt ttcattgctt tccaatagga ttcttggcga atttttaaaa cttcctgata 1020
 agacttttcg ctatattcta acgacatttc ttgctgcaa gataaaatcc cttaccat 1080
 gaaatccctc gtgatataac ctatccgtaa aatgtcctga ttagtgaaat aatcaggttg 1140
 ttaacaggat agcacgctcg gtattttttt atataaacat gaaaactcgt tccgaaatag 1200
 aaaatcgcat gcaagatatc gagtatgctg tgttaggtaa agctctgata tttgaagact 1260
 ctactgagta tattctgagg cagcttgcta attatgagtt taagtgttct catcataaaa 1320
 acatattcat agtatttaaa tacttaaaag acaatggatt acctataact gtagactcgg 1380
 cttgggaaga gcttttgcgg cgtcgtatca aagatatgga caaatcgtat ctcgggttaa 1440

tgttgcatga tgctttatca aatgacaagc ttagatccgt ttctcatagc gttttcctcg 1500
 atgatttgag cgtgtgtagc gctgaagaaa atttgagtaa tttcatittc cgctcgttta 1560
 atgagtacaa tgaaaatcca ttgcgtagat ctccgtttct attgcttgag cgtataaagg 1620
 gaaggcttga cagtgcata gcaaagactt tttctattcg cagcgctaga ggccggtcta 1680
 tttatgatat attctcacag tcagaaattg gagtgctggc tcgtataaaa aaaagacgag 1740
 caacgttctc tgagaatcaa aattctttct ttgatgcctt cccaacagga tacaaggata 1800
 ttgatgataa aggagttatc ttagctaaag gtaatttcgt gattatagca gctaggccat 1860
 ctatagggaa aactgcttta gctatagaca tggcgataaa tcttgcggtt actcaacagc 1920
 gtagagttgg tttcttatct ctagaaatga ggcgaggtca aattgctgag cggattattg 1980
 ctaatttaac aggaatatct ggtgaaaaat tacaagagg ggatctctct aaagaagaat 2040
 tattccgagt agaagaagct ggagaaacag ttagagaatc acatttttat atctgcagtg 2100
 atagtcagta taagcttaat ttaatcgcga atcagatccg gttgctgaga aaagaagatc 2160
 gagtagacgt aatatttatc gattacttgc agttgatcaa ctcatcggtt ggagaaaatc 2220
 gtcaaaatga aatagcagat atatctagaa ccttaagagg tttagcctca gagctaaaca 2280
 ttcctatagt ttgtttatcc caactatcta gaaaagttga ggatagagca aataaagttc 2340
 ccatgctttc agatttgcga gacagcggtc aaatagagca agacgcagat gtgattttgt 2400
 ttatcaatag gaaggaatcg tcttctaatt gtgagataac tgttgggaaa aatagacatg 2460
 gatcggtttt ctcttcggta ttacatttcg atccaaaaat tagtaaattc tccgctatta 2520
 aaaaagtatg gtaaattata gtaactgcca cttcatcaa agtcctatcc acctgaaaa 2580
 tcagaagttt ggaagaagac ctggtcaatc tattaagata tctcccaa at tggctcaaaa 2640
 tgggatggta gaagttatag gtcttgattt tctttcatct cattaccatg cattagcagc 2700
 tatccaaaga ttgctgactg caacgaatta caaggggaac acaaaagggg ttgttttatc 2760
 cagagaatca aatagttttc aattgaagg atggatacca agaatccggt ttacaaaaac 2820
 tgaattctta gaggcttatg gagttaagcg gtataaaaca tccagaaata agtatgagtt 2880
 tagtggaaaa gaagctgaaa ctgctttaga agccttatac catttaggac atcaaccggt 2940
 ttaaatagtg gcaactagaa ctcgatggac taatggaaca caaatagtag accgttacca 3000
 aactctttct ccgatcatta ggatttacga aggatgggaa ggtttaactg acgaagaaaa 3060
 tatagatata gacttaacac ctttaattc accatctaca cggaaacata aagggttcgt 3120
 tntagagcca tgccttatct tggtagatca aatagaatcc tactttgtaa tcaagcctgc 3180
 aatgtatac caagaaataa aatgcgctt cccaaatgca tcaaagtatg ettacacatt 3240
 tatcgactgg gtgattacag cagctgcgaa aaagagacga aaattaacta aggataattc 3300
 ttggccagaa aacttgttct taaacgttaa cgtaaaagt cttgcatata ttttaaggat 3360
 gaatcggtag atttgtacaa ggaactggaa aaaaatcgag ttagctatcg ataaatgtat 3420
 agaaatcgcc attcagcttg gttggttatc tagaagaaaa cgattgaat tctggttc 3480
 ttctaaactc tctaaaaaag aaattctata tctaaataaa gagcgttttg aagaataaac 3540

taagaaatct	aaagaacaaa	tggaacaatt	agaacaagaa	tctattaatt	aatagcaaac	3600
ttgaaactaa	aaacctaatt	tatttaaagc	tcaaaaataaa	aaagagtttt	aaaatgggaa	3660
attctggttt	ttatttgtat	aacctcaaaa	actgctctt	tgctgataat	atcaaagttg	3720
ggcaaatgac	agagccgctc	aaggaccagc	aaataatcct	tgggacaaca	tcaacacctg	3780
tcgcagccaa	aatgacagct	tctgatggaa	tatctttaa	agtctccaat	aatccatcaa	3840
ccaatgcttc	tattacaatt	ggtttggatg	cggaaaaagc	ttaccagctt	attctagaaa	3900
agttgggaga	tcaaattctt	ggtggaattg	ctgatactat	tgttgatagt	acagtccaag	3960
atattttaga	caaaatcaca	acagaccctt	ctctaggttt	gttgaaagct	ttaacaact	4020
ttccaatcac	taataaaatt	caatgcaacg	ggttattcac	tcccaggaac	attgaaactt	4080
tattaggagg	aactgaaata	ggaaaattca	cagtcaacacc	caaaagctct	gggagcatgt	4140
tcttagtctc	agcagatatt	attgcatcaa	gaatggaagg	cggcgttggt	ctagctttgg	4200
tacgagaagg	tgattctaag	ccctacgcga	ttagttatgg	atactcatca	ggcgttccta	4260
atztatgtag	tctaagaacc	agaattatta	atacaggatt	gactccgaca	acgtattcat	4320
tacgtgtagg	cggtttagaa	agcgggtggt	tatgggttaa	tgccctttct	aatggcaatg	4380
atattttagg	aataacaaat	acttctaattg	tatctttttt	ggaggtaata	cctcaaacaa	4440
acgcttaaac	aatttttatt	ggatttttct	tataggtttt	atatttagag	aaaaaagttc	4500
gaattacggg	gtttgttatg	caaaataaaa	gcaaagtgag	ggacgatttt	attaaaattg	4560
ttaaagatgt	gaaaaaagat	ttccccgaat	tagacctaaa	aatacgagta	aacaaggaaa	4620
aagtaacttt	cttaaattct	cccttagaac	tctaccataa	aagtgtctca	ctaattctag	4680
gactgcttca	acaaatagaa	aactctttag	gattattccc	agactctcct	gttcttgaaa	4740
aattagagga	taacagttta	aagctaaaaa	aggctttgat	tatgcttata	ttgtctagaâ	4800
aagacatggt	ttccaaggct	gaatagataa	cttactctaa	cgttggagtt	gatttgcaca	4860
ccttagtttt	ttgctctttt	aaggaggaa	ctggaaaaac	aacactttct	ctaaacgtgg	4920
gatgcaactt	ggcccaattt	ttagggaaaa	aagtgttact	tgctgacctt	gacccgcaat	4980
ccaatttatc	ttctggattg	ggggctagtg	tcagaagtaa	ccaaaaaggc	ttacacgaca	5040
tagtatacac	atcaaacgat	ttaaaatcaa	tcatttgcga	aacaaaaaaa	gatagtgtgg	5100
acctaattcc	tgcatcattt	ttatccgaac	agtttagaga	attggatatt	catagaggac	5160
ctagtaacaa	cttaaagtta	tttctgaatg	agtactgcgc	tcctttttat	gacatctgca	5220
taatagacac	tccacctagc	ctaggagggt	taacgaaaga	agcttttggt	gcaggagaca	5280
aattaattgc	ttgtttaact	ccagaacctt	tttctattct	agggttacia	aagatacgtg	5340
aattcttaag	ttcggctcga	aaacctgaag	aagaacacat	tcttgggaata	gctttgtcct	5400
tttgggatga	tcgtaactcg	actaaccaaa	tgtatataga	cattatcgag	tctatttaca	5460
aaaacaagct	tttttcaaca	aaaattcgtc	gagatatttc	tctcagccgt	tctcttctta	5520
aagaagattc	tgtagcta	gtctatccaa	attctagggc	cgcagaagat	attctgaagt	5580
taacgcatga	aatagcaaat	attttgcata	tcgaatatga	acgagattac	tctcagagga	5640

caacgtgaac aaactaaaaa aagaagcgaa tgtctttttt aaaaaaatc aaactgccgc 5700
 ttcttttagat ttttaagaaga cgcttccttc cattgaacta ttctcagcaa ctttgaattc 5760
 tgaggaaagt cagagtttgg atcaattatt tttatcagag tcccaaaact attcggatga 5820
 agaattttat caagaagaca tcctagcggg aaaactgctt actggtcaga taaaatccat 5880
 acagaagcaa cacgtacttc ttttaggaga aaaaatctat aatgctagaa aaatcctgag 5940
 taaggatcac ttctcctcaa caactttttc atcttgata gagttagttt ttagaactaa 6000
 gtcttctgct tacaatgctc ttgcatatta cgagcttttt ataaacctcc ccaaccaaac 6060
 tctacaaaaa gagtttcaat cgatccccta taaatccgca tatattttgg ccgctagaaa 6120
 aggcgattta aaaaccaagg tcgatgtgat agggaaagta tgtggaatgt cgaactcatc 6180
 ggcgataagg gtgttgatc aatttcttcc ttcattctaga aacaaagacg ttagagaaac 6240
 gatagataag tctgattcag agaagaatcg ccaattatct gatttcttaa tagagatact 6300
 tcgcatcatg tgttccggag tttctttgtc ctctataac gaaaatcttc tacaacagct 6360
 ttttgaactt ttttaagcaa agagctgatc ctccgtcagc tcatatata atctattata 6420
 tatatatatt tagggatttg attttacgag agagatttgc aactcttggg ggtagacttt 6480
 gcaactcttg gtggtagact ttgcaactct tggtggtaga ctttgcaact cttggtggtg 6540
 gacttgggtca taatggactt ttgttgaaaa atttcttaa atcttagagc tccgattttg 6600
 aatagctttg gttaagaaaa tgggctcgat ggctttccat aaaagtaggt tgttcttaac 6660
 ttttggggac gcgtcggaaa tttggttatc tactttatct catctaacta gaaaaaatta 6720
 tgcgtctggg attaactttc ttgtttcttt agagattctg gatttatcgg aaaccttgat 6780
 aaaggctatt tctcttgacc acagcgaatc tttgtttaa atcaagtctc tagatgtttt 6840
 taatggaaaa gtcgtttcag aggcctctaa acaggctaga gcggcatgct acatatcttt 6900
 cacaaagttt ttgtatagat tgaccaaggg atatattaaa cccgctattc cattgaaaga 6960
 ttttgaaac actacatttt ttaaaatccg agacaaaatc aaaacagaat cgatttctaa 7020
 gcaggaatgg acagtttttt ttgaagcgct ccggatagtg aattatagag actatttaat 7080
 cggtaaattg attgtacaag ggatccgtaa gttagacgaa attttgtctt tgcgcacaga 7140
 cgatctattt tttgcatcca atcagatttc ctttcgatt aaaaaaagac agaataaaga 7200
 aaccaaatt ctaatcacat ttctatcag cttaatggag gagttgcaa aatacacttg 7260
 tgggagaaat gggagagtat ttgtttctaa aatagggatt cctgtaacaa caagtcaggt 7320
 tgcgcataat tttaggcttg cagagttcta tagtgctatg aaaaaaaaaat tactcctaga 7380
 gtacttcgtg caagcgcttt gattcattta aagcaaatag gattaaaaga tgaggaaatc 7440
 atgcgtattt cctgtctttc atcgagacaa agtgtgtgtt cttattgttc tggggaaga 7499

<210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 2

10 ggattgactc cgacaacgta ttc 23

<210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Chlamydia trachomatis*
 5
 <400> 3
tgcccttct aatggcaatg at 22
 10
 <210> 4
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Chlamydia trachomatis*
 15
 <400> 4
tacgttagg cggttagaa agcgggt 28
 20
 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Chlamydia trachomatis*
 25
 <400> 5
ggattgactc cgacaacgta ttc 23
 30
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Chlamydia trachomatis*
 <400> 6
 35
atcattgcca ttagaagg ca 22
 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 40
 <213> *Chlamydia trachomatis*
 <400> 7
 45
ggattgactc caacaacgta ttc 23
 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Chlamydia trachomatis*
 50
 <400> 8
acaccgctt ctaaaccgcc tacacgtaa 29

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de *Chlamydia trachomatis*, comprendiendo el método la realización de una amplificación de ADN, usando un par de cebadores, mediante el uso de ADN que se deriva a partir de una muestra como molde, y la detección de un producto de amplificación, **caracterizado porque** el par de cebadores usados para la amplificación de ADN se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1, de modo que puede amplificarse la secuencia entre estas dos regiones.
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el par de cebadores se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4291 a 4320 y 4355-4385 y preferiblemente a los números de nucleótidos de 4296 a 4318 y de 4361 a 4382 de SEQ ID No. 1.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el par de cebadores se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones en SEQ ID No. 1: GGATT GACTCCGACA ACGTATTC y TGCCCTTCT AATGGCAATGAT.
4. Kit para la detección de *Chlamydia trachomatis* llevando a cabo PCR mediante el uso de ADN obtenido a partir de una muestra como molde, comprendiendo el kit un par de cebadores que se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1, de modo que puede amplificarse la secuencia entre estas dos regiones.
5. Kit según la reivindicación 4, **caracterizado porque** el par de cebadores se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391, preferiblemente a los números de nucleótidos de 4291 a 4320 y 4355-4385 y lo más preferiblemente a los números de nucleótidos de 4296 a 4318 y de 4361 a 4382 de SEQ ID No. 1.
6. Kit según las reivindicaciones 4-5, **caracterizado porque** el par de cebadores se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones en SEQ ID No. 1: GGATT GACTCCGACA ACGTATTC y TGCCCTTCT AATGGCAATGAT.
7. Par de cebadores diseñados basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1, de modo que puede amplificarse la secuencia entre estas dos regiones.
8. Par de cebadores según la reivindicación 7, **caracterizado porque** se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden a los números de nucleótidos de 4261 a 4320 y de 4351 a 4391, preferiblemente a los números de nucleótidos de 4291 a 4320 y 4355-4385 y lo más preferiblemente a los números de nucleótidos de 4296 a 4318 y de 4361 a 4382 de SEQ ID No. 1.
9. Par de cebadores según las reivindicaciones 7-8, **caracterizado porque** se diseña basándose en las secuencias de nucleótidos de las regiones en SEQ ID No. 1: GGATT GACTCCGACA ACGTATTC y TGCCCTTCT AATGGCAATGAT.
10. Par de cebadores según la reivindicación 7, **caracterizado porque** los cebadores tienen las siguientes secuencias: 5'-GGA TTG ACT CCG ACA ACG TAT TC-3' (SEQ ID No. 5) y 5'-ATC ATT GCC ATT AGA AAG GGC A-3' (SEQ ID No. 6).
11. Conjunto de cebadores que comprende un par de cebadores según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, junto con un cebador complementario que, con respecto a su secuencia, difiere de uno de los cebadores del par de cebadores en un nucleótido.
12. Conjunto de cebadores según la reivindicación 11, que comprende el par de cebadores mencionados en la reivindicación 10 y un cebador complementario con la secuencia 5'-GGA TTG ACT CCA ACA ACG TAT TC-3' (SEQ ID No. 7).
13. Sonda de hibridación que comprende un oligonucleótido diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos de una región que corresponde a los números de nucleótidos de 4320 a 4355 de SEQ ID No. 1.

14. Sonda de hibridación según la reivindicación 13, con la secuencia 5'-ACA CCG CTT TCT AAA CCG CCT ACA CGT AA-3' (SEQ. ID. No. 8).

Figura 1

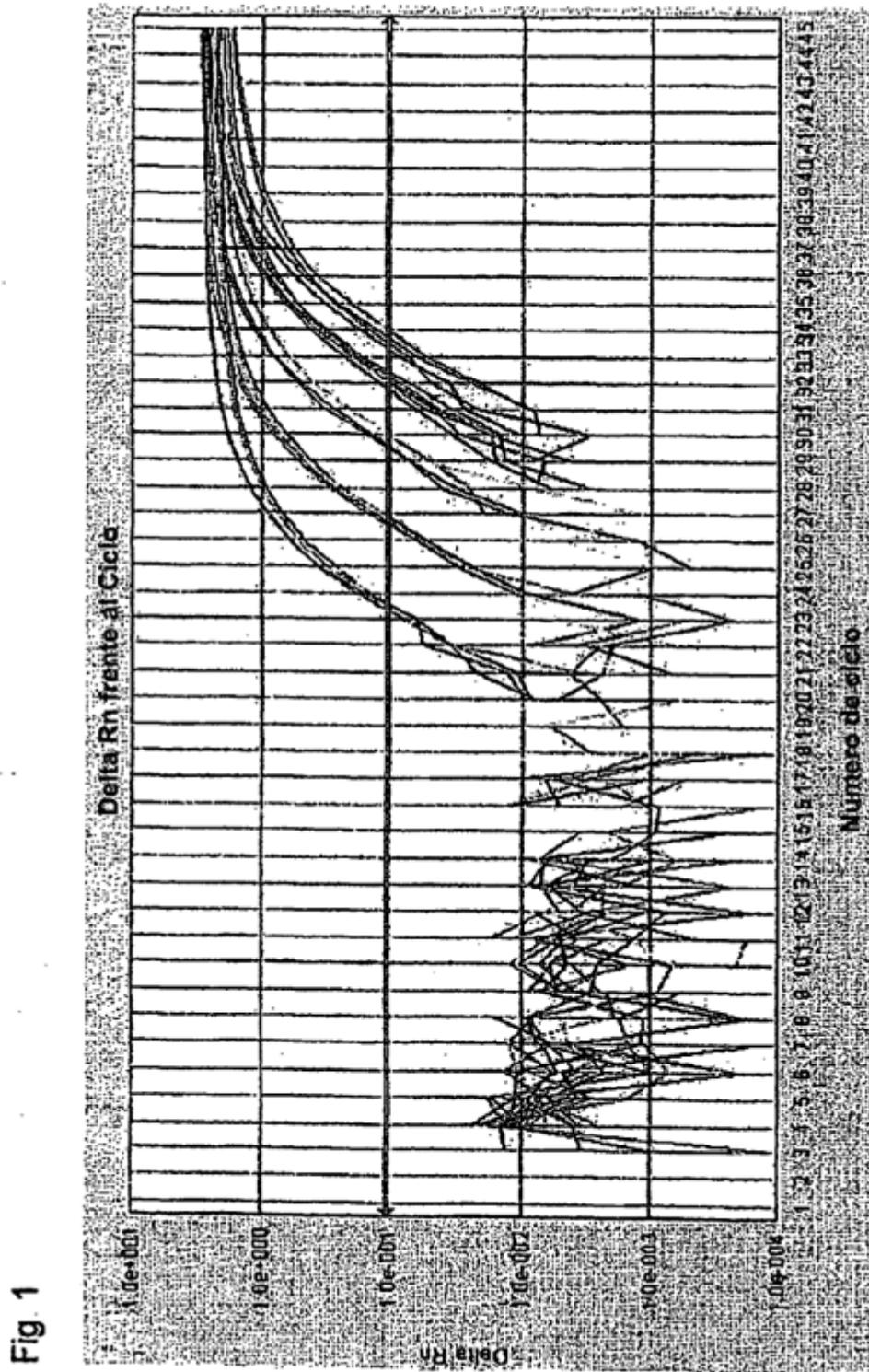


Fig. 1

Figura 2

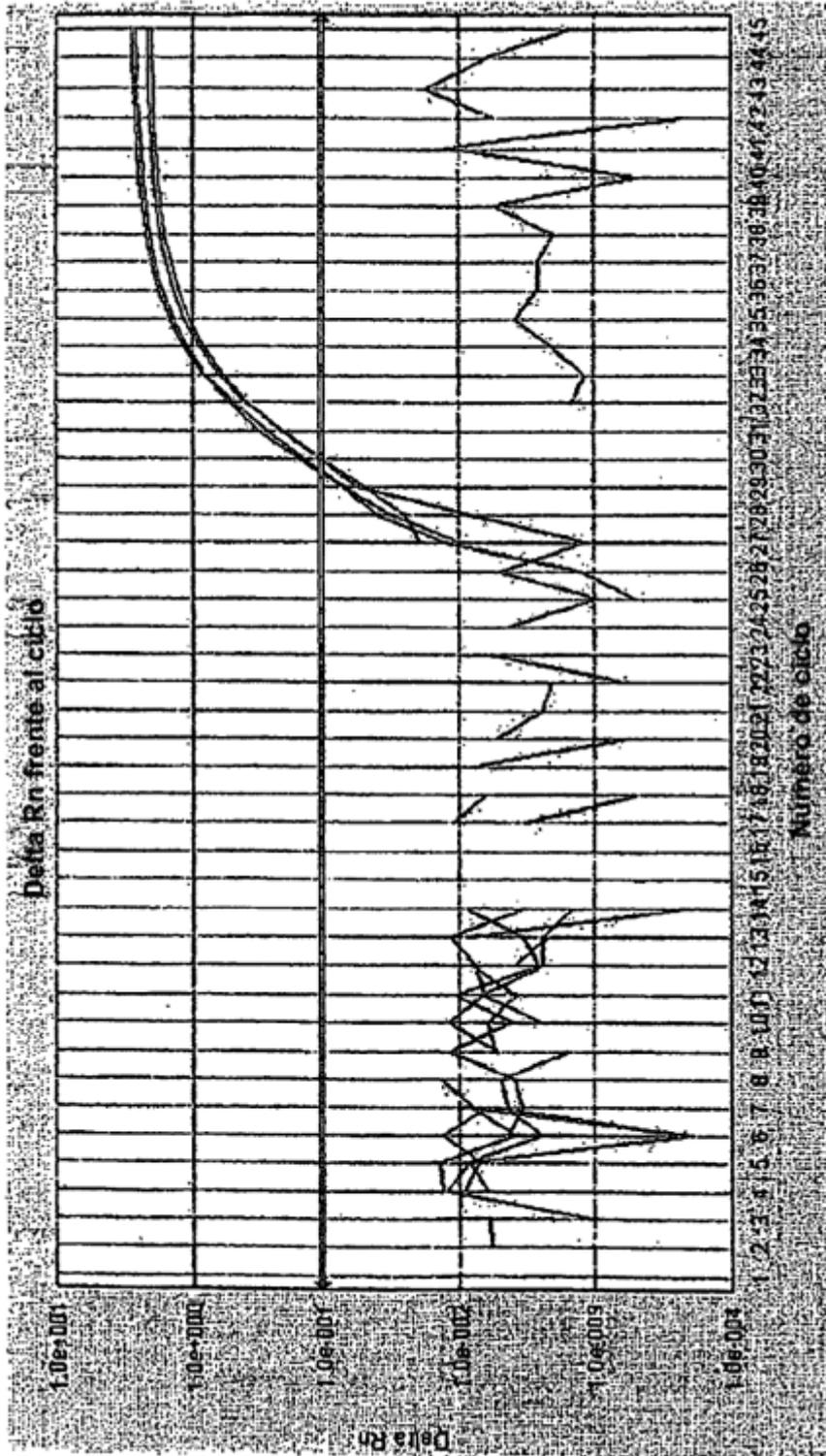


Fig. 2