

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 804**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/GB2010/052130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073675**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10801244 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2513331**

54 Título: **Ensayo para la detección de Chlamydia trachomatis**

30 Prioridad:

17.12.2009 GB 0922097

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

20.11.2017

73 Titular/es:

**ATLAS GENETICS LIMITED (100.0%)
Derby Court Epsom Square, White Horse
Business Park
Trowbridge BA14 0XG, GB**

72 Inventor/es:

**PEARCE, DAVID y
ENRIGHT, MARK**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 642 804 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).

Ensayo para la detección de *Chlamydia trachomatis*

Descripción

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a ensayo de productos, usos y métodos, especialmente los que implican la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Más específicamente se refiere a ensayos para *Chlamydia trachomatis* y a los controles mejorados para PCR.

10

Antecedentes de la invención

[0002] *Chlamydia trachomatis* es un patógeno humano intracelular obligado. La infección por *Chlamydia* es una enfermedad común de transmisión sexual y la bacteria puede causar numerosos estados de enfermedad en los hombres y las mujeres. Los síntomas clínicos incluyen uretritis, proctitis, tracoma, infertilidad, prostatitis, epididimitis, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica (PID) y embarazo ectópico. También es un patógeno neonatal donde puede causar infección de los ojos y los pulmones.

[0003] La infección por *Chlamydia trachomatis* es una de las enfermedades de transmisión sexual más común en todo el mundo. Se estima que 2 - 3 millones de personas en los Estados Unidos están infectadas con *Chlamydia*. En el Reino Unido, se ha estimado que una de cada diez personas jóvenes sexualmente activas menores de 25 años están infectadas con *Chlamydia*.

[0004] La infección por *Chlamydia trachomatis* puede tratarse con éxito por los antibióticos, por ejemplo, tetraciclinas tales como doxiciclina o acrolidas tales como azitromicina. Con el fin de garantizar que el tratamiento adecuado se da en el momento oportuno, existe la necesidad de diagnosticar con precisión la infección por *Chlamydia trachomatis*. En algunos países como el Reino Unido, un programa nacional de detección de *Chlamydia* se ha puesto en marcha.

[0005] La unidad infecciosa de *Chlamydia trachomatis* es el cuerpo elemental (EB). El EB funciona como un cuerpo "parecido a esporas" cuyo propósito es permitir la supervivencia de *Chlamydia* en un entorno no favorable fuera de la célula huésped. Se cree que el EB es metabólicamente inerte hasta que se une y se endocitosa por una célula huésped susceptible. La detección de *Chlamydia trachomatis* es posible mediante métodos de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, reacción en métodos basados en cadena de polimerasa (PCR). La PCR tiene el potencial de amplificar el ácido nucleico de ambas células infectadas y EBs. *Chlamydia trachomatis* contiene material genético tanto en su cromosoma, que está presente como una sola copia, y en su plásmido que está presente en 6 a 10 copias por EB. Históricamente, el plásmido se ha utilizado como blanco preferido para las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos debido a sus múltiples copias por EB y la supuesta mayor sensibilidad que puede obtenerse detectando un blanco basado en plásmidos. Sin embargo, la idoneidad de los sistemas de detección de la prueba de amplificación de ácido nucleico de plásmido ha sido cuestionada tras el descubrimiento de la variante sueca de *Chlamydia trachomatis*. La variante sueca contiene una delección de 377 pares de bases en el plásmido y por lo tanto los sistemas de detección dirigidos a la región suprimida darán un resultado falso negativo cuando se enfrentan con la variante sueca *Chlamydia trachomatis*.

[0006] EP 0915172 da a conocer un método de detección de *Chlamydia trachomatis* basado en la detección de la secuencia cromosómica ltuB.

[0007] La presente invención se basa en la comprensión de que una secuencia de detección de ensayo presente en el cromosoma de *Chlamydia trachomatis* es potencialmente más estable debido a que los genes cromosómicos son en general menos mutables y porque en ciertas circunstancias puede ser posible que el plásmido se pierda enteramente. Se podría esperar que la orientación de un gen presente en el cromosoma sea desventajosa porque las dianas cromosómicas sólo están presentes como una sola copia por célula. Sin embargo, los inventores de la presente invención se sorprendieron al descubrir que las dianas cromosómicas son capaces de proporcionar límites de detección (LOD) comparables a las dianas de plásmidos.

55

Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT)

[0008] Un número de métodos de prueba de amplificación de ácido nucleico (NAAT) adecuados para su uso con la invención están disponibles. Incluyen la PCR conocida, la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA), amplificación por polimerasa de recombinación (RPA), amplificación mediada por transcripción, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación dependiente de helicasa y amplificación isotérmica mediada por bucle. Los métodos NAAT han desplazado en gran medida la detección basada en cultivo para los métodos de *C. trachomatis*, no menos porque los métodos basados en cultivo implicaban la complejidad añadida de requerir el uso de células de mamíferos o cultivo de tejidos. Involucran la detección de ácidos nucleicos en una secuencia altamente específica de secuencia específica que implica la amplificación de una o más secuencias diana utilizando enzimas.

65

[0009] Para detalles adicionales de NAAT, se remite el lector a lo siguiente:

Amplificación Basada en Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA)

5

Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification Nature 1991: 350 (6313): 91-2

Amplificación Mediada por Transcripción

10

Wroblewski J. et al. Comparison of Transcription Mediated Amplification and PCR Assay Results from Various Genital Specimen Types for Detection of Mycoplasma genitalium. J. Clin. Microbiol. 2006: 44 (9): 3306 - 3312

Reacción en cadena de ligasa

15

Wiedmann M. et al. Ligase chain reaction (LCR) overview and Applications. PCR Methods and Applications 1994 3(4):S51-64

Amplificación isotérmica mediada por bucle de ADN

20

Notomi et al. Loop-Mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids. Res. 2000 23 (12):E63.

Amplificación dependiente de Helicasa

25

Vincent M. et al. Helicase-dependent isothermal DNA Amplification EMBO Rep. 2004 5(8) 795-800

Amplificación del desplazamiento del filamento

30

Strand displacement amplification - an isothermal in vitro Amplification technique. Walker et al. Nucleic Acids Res. 1992. 20(7) 1691-1696

Amplificación recombinasa-polimerasa (RPA)

35

DNA Amplification and Detection Made Simple (Relatively). Hoff. M. Public Libr. Sic. 2006: 4(7): e222; y también patente de EE.UU. 7270981.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

40

[0010] La PCR es un método de detección de ácidos nucleicos de una manera muy sensible a la secuencia específica que implica la amplificación de una o más secuencias diana mediante el uso de una enzima de polimerasa termoestable y ciclando las condiciones de temperatura de la reacción.

45

[0011] En su forma más sencilla, los ciclos de reacción de PCR a través de tres etapas: i) una etapa de desnaturalización se produce a una temperatura de aproximadamente 90 - 100°C. A esta temperatura elevada, el ADN bicatenario se desnaturaliza o "se funde" para formar ADN de cadena sencilla, ii) el recocido del cebador a una temperatura típica de 50 - 65°C. En esta etapa, los cebadores directo e inverso se hibridan con las regiones complementarias de cualquier blanco presente en la solución, y iii) la extensión se produce típicamente a 50 - 80°C durante el cual la reacción en cadena de la polimerasa utiliza trifosfatos de desoxinucleótido en la solución para extender el extremo 3' final de los cebadores. Típicamente, el ciclo se lleva a cabo 25 - 45 veces. Según ciertos protocolos de PCR, la etapa de recocido y la etapa de extensión pueden combinarse de manera que la muestra pase por un programa de dos pasos de 90°C a 100°C luego 50°C a 80°C. Los cálculos teóricos muestran que una reacción de PCR de 30 ciclos puede amplificar una única molécula diana 268, 435, 456 veces. Debido a las ineficiencias en la reacción de amplificación, la amplificación real puede ser menor que esto, pero sin embargo la reacción de PCR es típicamente capaz de amplificar números únicos o muy bajos de moléculas diana millones de veces hasta un nivel en el que pueden detectarse mucho más fácilmente. Las reacciones de PCR se basan en una ADN de polimerasa termoestable, por ejemplo, polimerasa de Taq aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Otras polimerasas de ADN termoestables se pueden utilizar en lugar de Taq, por ejemplo, polimerasa de Pfu aislada de *Pyrococcus furiosus* que tiene una actividad de corrección de pruebas ausente de polimerasa de Taq y por lo tanto es una enzima de mayor fidelidad.

60

[0012] Una revisión de la reacción en cadena de la polimerasa se encuentra en la mayoría de los libros de texto de biología molecular, véase, por ejemplo, "Principles of Gene Manipulation - An Introduction to Genetic Engineering" por Old y Primrose, Blackwell Science Ltd que se incorpora aquí por referencia. Hay una serie de diferentes "formatos de PCR". Como requisito básico, una reacción de PCR requiere un cebador directo y un cebador inverso diseñado para hibridar cualquier lado de la secuencia diana. La reacción de amplificación ocurre con respecto a la secuencia intermedia entre los dos cebadores. La detección de productos de PCR amplificados puede llevarse a cabo de una manera no específica que simplemente detecta la presencia de ácido nucleico bicatenario (por ejemplo,

65

mediante el uso de un tinte intercalante de ADN de doble hebra, tal como bromuro de etidio o SYBR verde). Alternativamente, se puede llevar a cabo una detección semiespecífica del producto resolviendo el peso molecular aproximado del producto, por ejemplo, realizando una electroforesis de los productos de reacción antes de la detección. Alternativamente, hay una serie de métodos de detección específicos de secuencia que típicamente implican la hibridación de una sonda de ácido nucleico específica de secuencia a la región amplificada o que miden la degradación de la sonda concomitante con la amplificación de la secuencia diana y hacen uso de la actividad de la exonucleasa de ácido nucleico de la polimerasa de ácido nucleico. Los métodos de detección basados en PCR para agentes patógenos ofrecen típicamente la ventaja de resultados más rápidos que los métodos más tradicionales que suelen implicar el cultivo y la incubación durante varios días. Un resultado de la PCR puede estar disponible en pocas horas o menos.

Resumen de la invención

[0013] Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar en un material genético de muestra clínica que se deriva de *Chlamydia trachomatis* que comprende la detección específica de secuencia de un ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico al menos 15 residuos de nucleótidos contiguos contenidos en la SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 1: atgaattcaa atatagaata taggcaatat cgtatagata tactgagctg tttatctgc ttgctaata
 tggtttggac actagtcagc atcaagctag gagattctct aggaggcatc attcctggat gcttaggata cttactggct
 aaaaggaagc atcgccgtcc tgtccgctgg ttcttcctta ctttttctt tggcattgcc tctggaatct tccttgcct tcttcatcct
 aagcaaaagt aa

o su complemento.

[0014] De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un cebador de PCR directo que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 17 y 34 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 15
 SEQ ID NO: 15: tgatg - g/ct/at/at/ag/c -g/ca/t cactagtc agcatcaagc taggagatt.

[0015] Alternativamente, la secuencia del cebador que se deriva de SEQ ID NO: 15 puede ser más corta (preferiblemente entre 12 y 22 o 19 y 29 residuos de longitud) si se toman medidas para aumentar la temperatura de hibridación del cebador.

[0016] De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un cebador de PCR inverso que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 31 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 16
 SEQ ID NO: 16: aaggaagatt ccagaggcaa tgccaagaa aaaagt.

[0017] Alternativamente, la secuencia del cebador se deriva de SEQ ID NO: 16 puede ser más corta (preferiblemente entre 10 y 20 o 16 y 26 residuos de longitud) si se toman medidas para aumentar la temperatura de hibridación del cebador.

[0018] De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico entre 18 y 28 residuos de ácido nucleico contiguos dados en SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 4 ccgtcctgtc cgctggttct tcctacttt ttt o su complemento.

[0019] Alternativamente, la secuencia de la sonda derivada de SEQ ID NO: 4 puede ser más corta (preferiblemente entre 13 y 23 residuos de longitud) si se toman medidas para aumentar la temperatura de hibridación de la sonda.

[0020] De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona una composición de cebador de avance e inversa de PCR que comprende un cebador de PCR hacia adelante de acuerdo con la invención y un cebador de PCR inverso según la invención.

[0021] De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende una composición de avance e inversa de cebadores de PCR de acuerdo con la invención e instrucciones para llevar a cabo un método de acuerdo con la invención.

[0022] De acuerdo con un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un método de la invención, que comprende además detectar en la muestra un control positivo interno que comprende material genético que se deriva de *Pectobacterium atrosepticum* que comprende la detección de secuencia específica de una secuencia de

ácido nucleico, contenida en el cromosoma de *Pectobacterium atrosepticum*.

[0023] Las composiciones de avance e inversa de cebadores de PCR de la invención pueden comprender además un "cebador de PCR segundo de avance"; un "segundo cebador de PCR inversa"; y/o una "segunda sonda PCR".

[0024] También se describen composiciones de avance e inversa de cebadores de PCR que comprenden cualquier cebador de PCR de avance, cebador de PCR inversa o la sonda de PCR de acuerdo con la invención en combinación con uno o más componentes de una reacción de PCR.

Breve descripción de los dibujos

[0025]

Las Figuras 1a a 1c muestran los resultados de los experimentos de determinación de Límite de Detección (LOD) llevados a cabo para los amplicones de diana plasmídicos 3, 5 y 7 como se describe en los ejemplos.

Las Figuras 2a a 2c muestran los resultados de los experimentos de determinación de Límite de Detección (LOD) llevados a cabo para los amplicones cromosómicos diana 9, 17 y 18 como se describe en los ejemplos.

La Figura 2d muestra los resultados del experimento de optimización de amplificación cromosómica 17 [Mg^{2+}] como se describe en los ejemplos.

La Figura 3 muestra los resultados de los experimentos de amplicón cromosómico 17 descritos en el ejemplo 8.

La Figura 4 muestra el efecto de cebadores de control interno y el ADN en la detección electroquímica de amplicón *Chlamydia trachomatis* generado usando duplex PCR (Ejemplo 9). Las barras de error muestran el SD ($n = 3$). La leyenda para cada barra dentro de cada grupo de 4 es como en la Figura 5. La leyenda "cebadores ME17 + 20 pg IC DNA" corresponde a la primera barra en cada grupo de 4. La leyenda "cebadores ME17, no IC ADN" se refiere a la segunda barra en cada grupo de cuatro. La leyenda "ME 17 y cebadores IC + 200 μ g de ADN IC" se refiere a la tercera barra en cada grupo de cuatro. La leyenda "ME17 y cebadores IC, no IC ADN" se refiere a la cuarta barra en cada grupo de cuatro.

La Figura 6a muestra un gel electroforético de productos de amplificación de *Chlamydia trachomatis* sin el conjunto de cebadores de control interno. Pista 1 = escala de 100 pb; pistas 2 a 4 = 10.000 reacciones IFU; pistas 5 a 7 = 1.000 reacciones IFU; pistas 8 a 10 = 100 reacciones IFU; pistas 11 a 13 = 10 reacciones IFU; pistas 14 a 16 = reacción 1 IFU.

La Figura 6b como Figura 6a, pero pista 1 = escala de 100 pb y pistas 2 a 4 = reacción no IFU.

La Figura 7a y Figura 7b como Figuras 6a y 6b pero para reacciones que contienen el conjunto de cebadores de Control Interno.

La Figura 8 muestra los resultados de la detección electroquímica de muestras amplificadas en dúplex utilizando cebadores *Chlamydia trachomatis* (CT, primera barra de cada par) de SEQ ID NOS: 17 y 19 y el conjunto de cebadores de control interno (IC, segunda barra de cada par). Se añadieron 200 μ g de ADN de Control Interno en todos los casos. Las barras de error muestran el SD ($n = 3$).

La Figura 9 muestra los resultados de los experimentos dúplex comparativos descritos en el Ejemplo 10.

Definiciones

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

[0026] Como se describe en la sección de antecedentes, la PCR es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para amplificar un segmento de ADN por la replicación enzimática *in vitro*. A medida que avanza la reacción, el ADN generado por las replications anteriores se utilizan como plantillas para las replications posteriores. Esto pone en marcha una reacción en cadena en la que la plantilla de ADN es exponencialmente o aproximadamente amplificada exponencialmente. Con la PCR es posible amplificar copias únicas o muy pocas copias de ácido nucleico a través de varios órdenes de magnitud generando un millón o más copias que pueden detectarse más fácilmente. La configuración básica de PCR requiere los siguientes componentes: i) una plantilla de ADN o un objetivo a amplificar; ii) un par de cebadores; el cebador directo que es complementario a la región de ADN en el extremo principal 5' de la región diana y el cebador inverso que es complementario a la región de ADN en el extremo principal 3' de la región diana; iii) una ADN de polimerasa termoestable, por ejemplo polimerasa de Taq; iv) trifosfatos desoxinucleósidos (dNTPs). Éstos se usan como bloques de construcción a partir de los cuales la ADN de polimerasa sintetiza la nueva hebra de ADN; v) una solución de tampón adecuada; vi) iones de magnesio u otros cationes adecuados; vii) iones de potasio monovalentes u otros cationes adecuados.

[0027] Existe un número de variantes de PCR, por ejemplo, PCR multiplex implica la amplificación simultánea de más de un objetivo en un solo recipiente de la muestra. La PCR multiplex incluye reacciones de PCR dúplex y triplex que implican hasta una docena de series de cebadores que actúan independientemente.

[0028] PCR anidada es una técnica que puede ser utilizada para aumentar la especificidad de una reacción de amplificación PCR. Dos conjuntos de cebadores se utilizan en dos reacciones sucesivas. En el primero, se utiliza un par de cebadores para generar productos de ADN de una manera menos que completamente específica. Sin embargo, la primera reacción aumenta la instancia de la secuencia diana. La segunda reacción es más específica y amplifica una secuencia anidada dentro del primer conjunto de cebadores.

[0029] PCR cuantitativa (QPCR) se utiliza para medir o estimar la cantidad específica de ADN diana en una muestra. El proceso de PCR normal puede ser, en algunas circunstancias, aproximadamente cuantitativo, pero el objetivo de la PCR cuantitativa verdadera es ejecutar la reacción de amplificación o considerar los resultados de la reacción de amplificación sólo dentro de la fase de aumento exponencial verdadero de la cantidad del producto, evitando la posterior fase de meseta de amplificación. La cantidad de producto en la fase exponencial de amplificación es mucho más proporcional a la cantidad inicial de blanco. Se han desarrollado termocicladores que pueden monitorizar la cantidad de producto durante la amplificación. Un método utilizado actualmente es la PCR cuantitativa en tiempo real que utiliza un tinte fluorescente tal como SYBR-verde o fluoróforo que contiene las sondas de ADN, tales como el sistema patentado TaqMan™ para medir la cantidad de producto amplificado a medida que avanza la amplificación.

[0030] PCR de inicio en caliente evita un posible problema con lo que los cebadores son capaces de unirse a bajas temperaturas a ubicaciones no específicas e incluso entre sí. La PCR de inicio en caliente se basa en el principio de liberar los cebadores para la hibridación sólo cuando la temperatura de reacción es suficientemente alta para prevenir o reducir la unión de cebadores no específica. La técnica puede realizarse manualmente calentando los componentes de reacción a la temperatura de desnaturalización, por ejemplo 94°C antes de añadir la polimerasa o antes de añadir los cebadores. Alternativamente, se han desarrollado sistemas especializados que inhiben la reacción hasta que se eleva la temperatura, por ejemplo, uniendo uno o más de los componentes en una forma inactiva para liberarse al elevar la temperatura.

[0031] PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) es un método utilizado para amplificar ARN en la que una reacción de PCR es precedida por una reacción utilizando la transcriptasa inversa para convertir ARN en ADNc. Las dos reacciones son suficientemente compatibles para poder funcionar en el mismo tubo y llevarse a cabo en el mismo instrumento de ciclos térmicos.

[0032] PCR de metilación específica o (MSP) implica el tratamiento previo de ADN diana con bisulfito sódico que convierte unidades de citosina no metiladas en uracilo que es reconocido por los cebadores de ADN como timina. Se realizan dos amplificaciones sobre el ADN modificado usando conjuntos de cebadores que distinguen entre las plantillas modificadas y no modificadas. Un conjunto de cebadores reconoce el ADN con citosinas y amplifica el ADN previamente no metilado y el otro conjunto reconoce el ADN con uracilo o timina para amplificar las dianas metiladas. Las proporciones relativas de las dos amplificaciones se pueden utilizar para obtener información sobre el grado de metilación.

Descripción detallada

Selección de la secuencia diana de *Chlamydia*

[0033] *Chlamydia trachomatis* contiene información genética tanto en un cromosoma y un plásmido. El plásmido de *Chlamydia trachomatis* contiene 8 marcos de lectura abiertos y porque está presente en número de copia múltiple que es un objetivo privilegiado para los métodos de detección NAAT de la técnica anterior. Sin embargo, los inventores se dieron cuenta de que muchos de esos marcos de lectura abiertos contienen una gran variabilidad. Por lo menos, se detectaron polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP) en marcos de lectura abiertos 2, 4, 7 y 8. Se ha demostrado que los marcos de lectura abiertos 1 y 3 contienen tanto inserciones como deleciones. Por lo tanto, se decidió que la secuencia diana para la detección de ácido nucleico de acuerdo con la invención debe venir de la secuencia cromosómica de *Chlamydia trachomatis*. El gen putativo identificado en la SEQ ID NO: 1, referido aquí como secuencia cromosómica 17 y que se encuentra en el cromosoma de *Chlamydia trachomatis* se encontró que era más adecuado para su uso en métodos de la invención, ya que tiene baja variabilidad entre aislados de *Chlamydia trachomatis*, se ha bajo nivel de homología con aislados no de *Chlamydia trachomatis* y sorprendentemente puede detectarse por un ensayo de PCR que tiene un límite ventajoso de detección (LOD) al menos tan bueno como dianas de plásmido a pesar de su número de copia única. Otros detalles de la selección de cebadores de PCR para su uso de acuerdo con aspectos preferidos de la invención se dan en los ejemplos.

[0034] La secuencia cromosómica 17 ha sido sugerida para ser una proteína hipotética asociada a la membrana pero aún tiene que asignarse un nombre oficial. Su función en el organismo no es importante en cuanto a su aptitud probada para uso de acuerdo con la presente invención.

[0035] Se describe aquí un método para detectar en una muestra material genético derivado de *Chlamydia trachomatis* que comprende la detección específica de secuencia de una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos 10 residuos de ácido nucleico contiguos reivindicados en la SEQ ID NO: 1

5 SEQ ID NO: 1 : atgaattcaa atatagaata taggcaatat cgtatagata tactgagctg ttttatctgc ttgctaatga
 tggtttggac actagtcagc
 10 atcaagctag gagattctct aggaggcatc attcctggat gcttaggata
 cttactggct aaaaggaagc atcgccgtcc tgtccgctgg ttcttcctta
 cttttttctt tggcattgcc tctggaatct tccttgctcgt tcttcatcct
 15 aagcaaaagt aa

o su complemento; en el que la secuencia puede ser además mutada por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos.

20 **[0036]** De acuerdo con ciertas realizaciones, se prefiere que la secuencia de ácido nucleico comprende al menos 15 residuos de ácido nucleico contiguos de SEQ ID NO: 1. Se da a conocer en el presente documento que puede ser 1, 2, 3 o 4 deleciones de residuos, las sustituciones de residuos o adiciones de residuos. Se prefieren las sustituciones de residuos frente a supresiones de residuos o adiciones de residuos. De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas no hay sustituciones, deleciones o adiciones de residuos. Características similares preferidas con respecto a otras mutaciones se aplican a todos los demás aspectos de la invención.

25 **[0037]** Preferiblemente, dicha detección específica de secuencia comprende llevar a cabo una etapa de hibridación de ácido nucleico.

30 **[0038]** Preferiblemente, dicha detección específica de secuencia comprende llevar a cabo una etapa de hibridación de ácido nucleico seguido por una etapa para detectar la hibridación de ácido nucleico.

35 **Detección de la hibridación de ácidos nucleicos**

[0039] Los métodos para detectar la hibridación de ácido nucleico incluyen métodos de detección de hibridación de ácidos nucleicos de una manera específica no secuencia. Estos métodos incluyen el uso de un colorante de intercalación de ácido nucleico, por ejemplo, bromuro de etidio o SYBR-Verde. Estos colorantes aumentan su señal fluorescente cuando están unidos a ácido nucleico bicatenario y pueden detectarse mediante un sistema estándar de detección de fluorescencia. De acuerdo con realizaciones alternativas, el método de detección de hibridación de ácido nucleico puede ser un método específico de secuencia, por ejemplo, sondas marcadas. Una o más sondas marcadas pueden hibridarse con la secuencia diana de una manera específica de la secuencia o la secuencia de la diana se puede detectar después de la hibridación con una secuencia complementaria inmovilizada (por ejemplo, en una matriz de ADN o "chip"). Las sondas de ácido nucleico pueden marcarse de forma electroquímica, de forma fluorescente, radioactiva, enzimática o de acuerdo con ciertas realizaciones preferidas de la invención. Se prefiere particularmente el etiquetado electroquímico usando las etiquetas electroquímicas descritas en este documento.

40 **[0040]** De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, el método de detección en una muestra de material genético derivado de *Chlamydia trachomatis* comprende la hibridación de material genético que se deriva de *Chlamydia trachomatis* a una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos 15 residuos de ácido nucleico contiguos que contienen la SEQ ID NO: 4

SEQ ID NO: 4: ccgctcgtc cgctggttct tccttacttt ttt

55 o su complemento; se describe que la secuencia puede ser mutada por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos. También se describe que hay 1, 2, 3 ó 4 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos.

60 **[0041]** De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, el método comprende la hibridación de material genético que se deriva de *Chlamydia trachomatis* a una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia en la SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO: 5: ctgtccgctg gttcttcctt act

65 o su complemento; revelado en la presente memoria es que la secuencia puede ser mutada adicionalmente por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos.

[0042] De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, otras mutaciones son como se han definido anteriormente.

[0043] De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, la detección específica de la secuencia sigue a la amplificación del ácido nucleico para ser detectada utilizando PCR, amplificación mediada por transcripción, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación dependiente de helicasa, amplificación por polimerasa de recombinasa, amplificación por desplazamiento de cadena o amplificación isotérmica mediada por bucle. Mediante el uso de un método de detección en el que la detección específica de secuencia sigue a la amplificación del ácido nucleico a detectar, pueden obtenerse mayores sensibilidades y especificidades en el método de detección.

[0044] Preferiblemente, el método de detección específica de secuencia sigue la amplificación del ácido nucleico a detectar - siendo la amplificación mediante el uso de una PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa

[0045] La reacción en cadena de la polimerasa implica el uso de un cebador de PCR directo y un cebador de PCR inverso. De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, dicha reacción en cadena de polimerasa implica el uso de un cebador de PCR directo y un cebador de PCR inversa en el que:

a) dicho cebador de PCR directo comprende una secuencia de nucleótidos que comprende entre 17 y 34 (por ejemplo, entre 24 y 34) residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 15;
tgatg - g/c-t/a-t/a-t/a-g/c -g/c-a/t-cactagtc agcatcaagc taggagatt
y

b) dicho cebador de PCR inversa comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 31 (por ejemplo, entre 21 y 31) residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 16;
SEC ID N° 16: aaggaagatt ccagagggcaa tgccaagaa aaaagt

o en el que dicho cebador de PCR directa comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador inverso como se define en la parte b) anterior y dicho cebador de PCR inversa comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador directo tal como se define en la parte a) anterior; se describe que las secuencias pueden ser mutadas adicionalmente por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos.

[0046] Por ejemplo, dicha reacción de cadena de la polimerasa puede implicar el uso de un cebador de PCR directa y un cebador de PCR inversa en la que:

a) dicho cebador de PCR directa comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 17 y 27 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 2;
SEQ ID NO: 2: ttggacacta gtcagcatca agctaggaga tt;
y

b) dicho cebador de PCR inversa comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 25 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de la SEQ ID NO: 3
SEQ ID NO: 3: gaagattcca gaggcaatgc caaagaaaa;

o en el que dicho cebador de PCR directa comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador inverso como se define en la parte b) anterior y dicho cebador de PCR inversa comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador directo como se define en la parte a) anterior; en el que las secuencias pueden ser además mutadas por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos.

[0047] Otras mutaciones pueden ser como se definió anteriormente. En ciertas realizaciones, el cebador de PCR directa puede ser tal como se ha definido con respecto al segundo aspecto de la invención y el cebador de PCR inversa puede ser tal como se ha definido con respecto al tercer aspecto de la invención.

[0048] De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, el cebador de PCR hacia adelante comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 6

SEQ ID NO: 6: cactagtcag catcaagcta gg;
SEQ ID NO: 17: caaacctcac tagtcagcat caagctagg;
SEQ ID NO: 18: gtttgacac tagtcagcat caagctagg;

y el cebador de PCR inversa comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 7

SEQ ID NO: 7: ttccagaggc aatgccaaag;
 SEC ID NO: 19 agattccaga ggcaatgcc aagaaa

5 [0049] De acuerdo con ciertas realizaciones uno o ambos de los cebadores de PCR se pueden marcar para ayudar a la detección de la hibridación. La etiqueta puede ser una etiqueta de fluorescencia, una etiqueta radiactiva, una etiqueta enzimáticamente activa o una etiqueta electroquímicamente activa. El cebador y el marcador pueden estar dispuestos de modo que su señal detectable aumente después de la hibridación o después de la degradación por la actividad de exonucleasa de la ADN de polimerasa usada en la reacción de PCR. Por ejemplo, la etiqueta puede aplicarse a un cebador de PCR al que también se ha añadido un resto de extintor. La degradación del cebador de PCR dará como resultado que el fragmento extintor y el marcador se separen entre sí y que disminuya la actividad de extinción del extintor en la etiqueta.

Sondas de ácido nucleico

15 Sondas

[0050] Una sonda de ácido nucleico puede ser utilizada para detectar de una manera específica de la secuencia de los productos de una reacción de PCR. Típicamente, una sonda de este tipo está diseñada para hibridar con la secuencia diana en una posición intermedia entre las posiciones en las que los cebadores se hibridan. La sonda puede marcarse para ayudar en su detección, por ejemplo, un fluoróforo, un marcador radioactivo, un marcador electroquímicamente activo o un marcador enzimático. El marcador puede estar enlazado directamente al ácido nucleico o por medio de un resto enlazador. Las sondas de la presente invención son particularmente adecuadas para el formato de PCR TaqMan. TaqMan es un método de PCR cuantitativa en tiempo real disponible de Life Technologies Inc. En el formato TaqMan se toman medidas en tiempo real de la acumulación del producto de PCR durante la fase experimental de la amplificación. Esto se lleva a cabo para determinar un ciclo de umbral, es decir, el número de ciclos de PCR a los que se detecta un nivel umbral de señal. Las sondas de PCR en un formato TaqMan están marcadas fluorescentemente y complementarias a un segmento de aproximadamente 20 a 60 nucleótidos dentro de la plantilla de ADN situada entre los dos cebadores. Las etiquetas fluorescentes adecuadas para su uso en un sistema TaqMan incluyen 6 carboxi-fluoresceína (FAM) o tetraclorofluoresceína (TET). La sonda TaqMan se marca típicamente con un fluoróforo tal y se marca también con una molécula de extinción, por ejemplo, tetrametilrhodamina (TAMRA). La estrecha proximidad entre el fluoróforo y el inhibidor inhibe la fluorescencia del fluorocromo. Sin embargo, durante la fase de extensión de cebador de la reacción de PCR, la polimerasa Taq también exhibe actividad exonucleasa 5' a 3' que degrada la porción de la sonda que ya está recocida a la plantilla. La degradación de la sonda libera fluorocromo de la misma. El fluorocromo ya no está en estrecha proximidad con el agente de extinción, por lo tanto el efecto de enfriamiento es disminuido y la señal fluorescente emitida por el fluorocromo se aumenta y puede ser detectado.

[0051] De acuerdo con ciertas realizaciones, la reacción en cadena de la polimerasa implica el uso de una sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico. Dicha secuencia de ácido nucleico que comprende entre 18 y 28 residuos contiguos de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 4
 SEQ ID NO: 4: ccgtcctgct cgctggttct tcttacttt tt
 o su complemento; descrito en este documento es que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos se definen anteriormente.

45 [0052] De acuerdo con ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende entre 19 y 27 residuos de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 4, más preferiblemente entre 20 y 26 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente entre 21 y 25 residuos de ácido nucleico, más preferiblemente entre 22 y 24 residuos de ácido nucleico, lo más preferiblemente 23 residuos de ácido nucleico.

50 [0053] Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 5
 SEQ ID NO: 5: ctgtccgctg gttcttctt act

[0054] De acuerdo con ciertas realizaciones, la sonda de ácido nucleico puede estar marcada, por ejemplo, con fluorescencia, radioactivamente, enzimáticamente o más preferiblemente con una etiqueta electroquímicamente activa. Las etiquetas electroquímicamente activas descritas son especialmente preferidas.

[0055] Se da a conocer en el presente documento un cebador de PCR directa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 17 y 34 (por ejemplo, 24 y 34) nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 15;
 SEQ ID NO: 15: tgatg - g/c-t/a-t/a-t/a-g/c -g/c-a/t-cactagtc agcatcaagc taggagatt
 el que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos de dichas mutaciones opcionalmente adicionales como se definió anteriormente.

65 [0056] De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un cebador de PCR directa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 17 y 27 residuos contiguos de nucleótidos seleccionados de SEQ

ID NO: 2;

SEQ ID NO: 2: ttggacacta gtcagcatca agctaggaga tt;

en el que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos de dichas mutaciones opcionalmente adicionales como se definió anteriormente.

5 **[0057]** De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un cebador de PCR directa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 24 y 34 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 20;

SEQ ID NO: 20: tgatgcaaac ctactagtc agcatcaagc taggagatt;

10 en el que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos de dichas mutaciones opcionalmente adicionales como se definió anteriormente.

15 **[0058]** De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un cebador de PCR directa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 24 y 24 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 21;

SEQ ID NO: 21: tgatggttg gacactagtc agcatcaagc tagg agatt;

en el que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos de dichas mutaciones opcionalmente adicionales como se definió anteriormente.

20 **[0059]** De acuerdo con ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende entre 18 y 26, entre 19 y 25, entre 20 y 24, entre 21 y 23, lo más preferiblemente 22 residuos o entre 25 y 33, entre 26 y 32, entre 27 y 31, entre 28 y 30 más preferiblemente 29 residuos. Según ciertas realizaciones preferidas, el cebador de PCR hacia adelante comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 6.

25 SEQ ID NO: 6: cactagtcag catcaagcta gg;

SEQ ID NO: 17: caaacctcac tagtcagcat caagctagg

SEQ ID NO: 18: gtttgacac tagtcagcat caagctagg.

30 **[0060]** Se da a conocer en el presente documento un cebador de PCR inversa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 31 (por ejemplo entre 21 y 31) residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 16: aaggaagatt ccagaggcaa tgccaaagaa aaaagt;

en donde la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos, mutaciones opcionalmente adicionales como se definió anteriormente.

35 **[0061]** De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un cebador de PCR inversa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 25 residuos de nucleótidos contiguos seleccionada de SEC NO: 3

40 SEQ ID NO: 3: gaagattcca gaggcaatgc caaagaaaa;

en el que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos de dichas mutaciones opcionalmente adicionales como se definió anteriormente.

45 **[0062]** De acuerdo con ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende entre 22 y 30 residuos nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 16. Más preferiblemente entre 23 y 29, más preferiblemente entre 24 y 28, más preferiblemente entre 25 y 27, más preferible 26 residuos.

50 **[0063]** De acuerdo con ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende entre 16 y 24 residuos nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente entre 17 y 23 más preferiblemente entre 18 y 22, más preferiblemente entre 19 y 21, más preferiblemente 20 residuos.

55 **[0064]** De acuerdo con ciertas realizaciones, los números y tipos de adiciones, eliminaciones y sustituciones de residuos pueden ser como se define anteriormente en referencia al cebador de PCR hacia adelante.

[0065] De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, el cebador de PCR inversa comprende una secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 7

60 SEQ ID NO: 7: ttccagaggc aatgccaaag;

SEQ ID NO: 19: agattccaga ggcaatgcca aagaaa

[0066] Se da a conocer en el presente documento una sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, dicha secuencia de ácido nucleico que comprende entre 18 y 28 residuos de ácidos nucleicos dada en SEQ ID NO: 4

65 SEQ ID NO: 4: ccgtcctgtc cgctggttct tcctacttt ttt

o su complemento; en el que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de

residuos o sustituciones de residuos.

[0067] El número y el tipo de adiciones, deleciones, sustituciones de residuos puede ser como se define anteriormente en referencia a los cebadores de la invención. La sonda de ácido nucleico de acuerdo con ciertas realizaciones preferidas comprende entre 18 y 27, entre 19 y 26, entre 20 y 25, entre 21 y 24, entre 22 y 23, lo más preferiblemente 23 restos de SEQ ID NO: 4. De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, una sonda de ácido nucleico de la invención comprende la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 5: ctgtcgcgtg gttcttctt act.

[0068] Se da a conocer en el presente documento un componente de PCR que comprende un cebador de PCR inversa de la invención y un cebador de PCR inversa según la invención. Según ciertas realizaciones preferidas, el componente PGR comprende además una sonda de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Controles internos

[0069] Típicamente controles internos de ensayo para un ensayo de PCR o similares consisten en oligonucleótidos de ADN monocatenarios. Estos pueden ser simplemente fabricados e inmovilizados sobre un soporte de la muestra o añadirse a un componente de la reacción de PCR. Sin embargo, los métodos de la presente invención pueden estar precedidos por pasos de preparación de muestras que pueden implicar cuerpos elementales de purificación o clínicamente derivarse del material y la purificación de ADN genómico a partir de ellos que contiene *Chlamydia*. Un número de métodos y kits disponibles en el mercado de purificación de ADN están disponibles, por ejemplo, el Sistema de Asistente Promega. Estos sistemas de lisis y purificación de ADN bacterianos implican el uso de una solución de sal caotrópica con la unión del ADN a una membrana, por ejemplo que contiene una membrana a base de sílice seguido de la eliminación del lisado restante y el lavado para eliminar los contaminantes. El ADN genómico bacteriano purificado se recupera entonces de la membrana para su uso en el ensayo de detección de aguas abajo, por ejemplo, un ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. Es poco probable que tales métodos de purificación co-purifiquen secuencias de control interno basadas en oligonucleótido de ADN monocatenario corto. Por ejemplo, el Kit de Asistente Promega establece que su protocolo de purificación tiene un tamaño de 50 kb cortado. Por consiguiente, el inventor se da cuenta de que sería ventajoso proporcionar un control interno que se co-purifica con el ADN genómico de *Chlamydia* contenida en la muestra. Una posible solución consiste en usar como un control interno un ADN genómico de otras especies bacterianas usando la misma lisis en condiciones de aislamiento requeridas para aislar el ADN genómico de *Chlamydia*. Debido a consideraciones de seguridad, la fuente del control interno ideal sería que se deriva de una bacteria no patógena. También no debería normalmente encontrarse fácilmente en los seres humanos y debe ser fácilmente cultivables en un laboratorio. La presente invención implica el uso de ADN genómico como en el control interno que se ha derivado de *Pectobacterium atrosepticum*. Esto se debe a que *P. atrosepticum* es cultivable, ampliamente disponible y el ADN aislado se co-purifica con facilidad con el derivado de *Chlamydia*. Tiene sólo un cromosoma y posee muchos genes que aparecen únicos para la especie. Además, no se han reportado casos de infección en humanos con esta especie (que es un patógeno vegetal que causa la pudrición blanda y la pierna negra de las patatas en las regiones templadas) que significa que es poco probable que se encuentran en sitios anatómicos o en muestras clínicas. Para evitar la duda hay que señalar que *Pectobacterium atrosepticum* era conocido previamente como *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, de acuerdo con el quinto aspecto de la invención el componente de PCR comprende además ADN genómico derivado de *Pectobacterium atrosepticum* para su uso como un control positivo interno. Preferiblemente, es de la cepa ATCC BAA-672.

[0070] Una composición de cebador PCR de avance e inversa comprende preferentemente un segundo cebador de PCR y un segundo cebador de PCR inversa en el que dichos cebadores se diseñan para hibridarse a secuencias de ácidos nucleicos encontradas dentro de una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 8

```
SEQ ID NO: 8: ctaccgtgta gggcatagc cattgacctc atggctccac
ggaatcgtgc gatcgtcaac tgcgacgtgc cattcacagt gcgtaagagc
accgcgaatc tcggataaac actggcacca gtgctgtacg ccaatccaga
ttgcttcttc ctgcgtgtcg ggaagtgttg ttgaaccgga gagcacgatc
cctttcctaa agacgttacc gattttcaca ttgagggcga aatcaaagga
ttcccagttc aggcctgtac ccgtcgtcag atattttctca atttggtcat
taacagaatg gcggttgacg atctccttca cggcagatat ctctttctg
ctcagggatt ttttacgtcg agcgggtgtaa tagagcgaaa ttgccac;
```

o su complemento en el que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos según se define en número y tipo anteriormente en referencia a cebadores de PCR de acuerdo con un primer o segundo aspecto de la invención.

- 5 **[0071]** El segundo cebador directo PCR comprende preferentemente una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 13 y 23 residuos de ácido nucleico contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO: 9: ctcgctgctg ggaagttgg ttgaaccg;

- 10 **[0072]** El segundo cebador de PCR inversa comprende preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 25 residuos de ácido nucleico contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 10

SEQ ID NO: 10: acaggcctga actgggaatc cttgatttc;

- 15 **[0073]** Alternativamente, dicho segundo cebador de PCR de avance comprende una secuencia de ácido nucleico que es un complemento del cebador inverso como se define anteriormente y dicho segundo cebador de PCR inversa comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador directo tal como se define anteriormente; descrita en este documento es que las secuencias pueden mutarse adicionalmente por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos tal como se definen en número y tipo anteriormente en referencia a cebadores de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención. El segundo cebador de PCR comprende preferentemente entre 14 y 22 residuos contiguos de ácido nucleico seleccionado de SEQ ID NO: 9, más preferiblemente entre 15 y 21, más preferiblemente entre 16 y 20, más preferiblemente entre 17 y 19, lo más preferiblemente 18 residuos de ácido nucleico contiguos seleccionados de entre SEQ ID NO: 9.

- 25 **[0074]** El segundo cebador de PCR inversa comprende preferiblemente entre 16 y 24 residuos de ácido nucleico contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 10, más preferiblemente entre 17 y 23, más preferiblemente entre 18 y 22, más preferiblemente entre 19 y 21, lo más preferiblemente 20 secuencias contiguas de ácido nucleico seleccionadas de SEQ ID NO: 10.

- 30 **[0075]** De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, el segundo cebador de PCR comprende la secuencia de ácido nucleico como se da en SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 11: tttggtg tgcgggaag
y el segundo cebador de PCR inversa comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 12: gaatccttg cctgaactgg

- 35 **[0076]** La composición de cebador de avance e inversa de acuerdo con ciertas realizaciones contiene una segunda sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico entre 18 y 28, más preferiblemente entre 19 y 27, más preferiblemente entre 20 y 26, más preferiblemente entre 21 y 25, más preferiblemente entre 22 y 24, más preferiblemente 23 residuos de ácido nucleico contiguos dados en SEQ ID NO: 13

SEQ ID NO: 13: ggagagcagc atcccttcc taaagacgtt acc

o su complemento; se describe aquí que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos como se definen en tipo y número anteriormente en referencia a la primera sonda de ácido nucleico de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

- 45 **[0077]** De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, la sonda de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 14: gcacgatccc tttcctaaag acg

- 50 **[0078]** También descritos en el presente documento son los productos y métodos relacionados con un control interno que comprende *Pectobacterium atrosepticum* en ausencia de productos y métodos para la detección de *Chlamydia trachomatis* (es decir, para su uso como un control interno para la detección de ácidos nucleicos distintos de *Chlamydia trachomatis*). Específicamente, se describe un cebador de PCR hacia adelante y un segundo cebador de PCR en el que dichos cebadores se diseñan para hibridarse con una secuencia de ácido nucleico diana que se encuentra dentro del ADN genómico de *Pectobacterium atrosepticum*. Preferiblemente, los cebadores están diseñados para hibridizar la secuencia de ácido nucleico diana encontrado dentro de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 8

- 60 SEQ ID NO: 8: ctaccgtgta gggcatagc cattgacctc atggctccac ggaatcgtgc gatcgtcaac tgcgactgac
cattcacagt gcgtaagagc accgcgaatc tcggataaac actggcacca gtgctgtacg ccaatccaga ttgcttcttc
ctcgctgctg ggaagttgg ttgaaccgga gagcacgac ctttctctaa agacgttacc gattttcaca ttgaggcgca
65 aatcaaagga ttcccagttc aggcctgtac ccgtcgtcag atatttctca atttggtcat taacagaatg gcggtggacg
atctctctca cggcagatat ctctttctgg ctacgggatt ttttacgtcg agcgggtgtaa tagagcgaaa ttgccac;

5 o su complemento; en el que la secuencia puede mutarse además por hasta 5 adiciones de residuos, deleciones de residuos o sustituciones de residuos del tipo y número de adiciones, deleciones o sustituciones son como se define en esta especificación en otro lugar.

10 **[0079]** Otras características del segundo cebador de PCR de avance y el segundo cebador de PCR inversa preferiblemente pueden ser como se definen en este documento en relación con otros aspectos de la invención. También se describe en el presente documento una sonda de ácido nucleico para la detección de características de *Pectobacterium atrosepticum* que tienen controles positivos internos como se define en referencia a otros aspectos de la invención. La invención también contempla un método para detectar una señal de un control positivo interno que comprende *Pectobacterium atrosepticum* comprendiendo el uso de cebadores de *Pectobacterium atrosepticum*,
15 una sonda opcional y calificación incorpora cualquiera de las características descritas en este documento en referencia a otros métodos de la invención. Un método de detección de la señal de un control positivo interno que comprende *Pectobacterium atrosepticum* preferiblemente precedido por un método de obtención de ADN genómico de *Pectobacterium atrosepticum* que comprende la lisis de células bacterianas de *Pectobacterium atrosepticum* entero utilizando sales caotrópicas y opcionalmente una membrana a base de sílice tal como se describe en el
20 presente documento.

Kit

25 **[0080]** De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende una composición de cebador de avance e inversa de acuerdo con el quinto aspecto de la invención o un cebador de PCR o la sonda de acuerdo con la invención e instrucciones para llevar a cabo un método según el primer aspecto de la invención. Un kit puede contener otros componentes de recipientes de muestras ejemplares, embalaje, enzimas de PCR, la amplificación de precursores, tubos de muestra o instrumentos de detección.

30 Controles positivos internos

[0081] De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas de una composición de cebador de PCR de avance e inversa del quinto aspecto de la invención comprende además ADN genómico derivado de *Pectobacterium atrosepticum* para su uso como un control positivo interno. El método de detección puede ser como se describe en este
35 documento en referencia a otros aspectos de la invención, o puede implicar el uso de compuestos o productos descritos en este documento en referencia a otros aspectos de la invención.

[0082] De acuerdo con un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un método de la invención que comprende además la detección en una muestra de un control positivo interno que comprende material genético que se deriva de *Pectobacterium atrosepticum* que comprende la secuencia de detección específica de una secuencia de ácido nucleico, contenido en el cromosoma de *Pectobacterium atrosepticum*. Dicho método puede incorporar cualquier característica descrita en relación con otros aspectos de la invención y, opcionalmente, puede comprender además la extracción de ADN genómico de una muestra de dicho ADN genómico siendo de *Pectobacterium atrosepticum* (opcionalmente introducido a la muestra como un control interno). Dicha extracción puede ser
40 concomitante con la extracción de ADN genómico de un segundo organismo (por ejemplo, un patógeno bacteriano) de interés.

[0083] Las composiciones de cebadores de PCR de avance e inversa de la invención pueden comprender además un "segundo cebador de PCR de avance"; un "segundo cebador de PCR inversa"; y/o una "segunda sonda de PCR".
50

[0084] También se describen composiciones de avance e inversa de cebadores de PCR que comprenden cualquier cebador de PCR de avance, cebador de PCR inversa o sonda de PCR de acuerdo con la invención en combinación con uno o más componentes de una reacción de PCR.

55 **[0085]** Las características preferidas u opcionales descritas en relación con el primer a sexto aspecto de la invención se pueden incorporar opcionalmente en el séptimo a décimo y en otros aspectos de la invención también.

Etiquetas

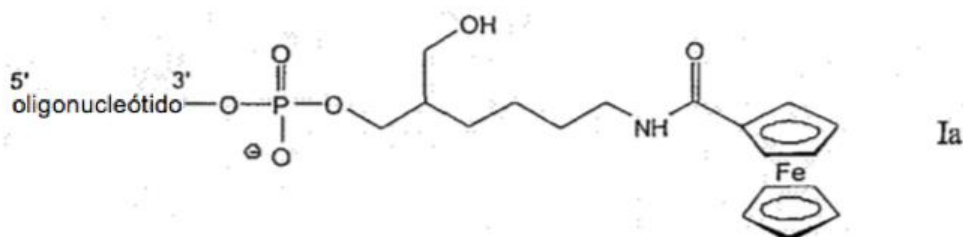
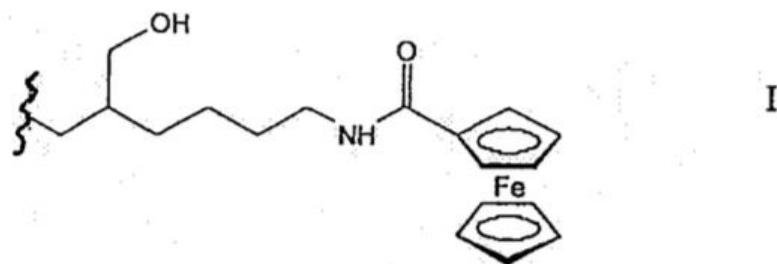
60 **[0086]** Las sondas y/o cebadores pueden estar unidos a una etiqueta para ayudar a su detección. Esa etiqueta puede ser radioactiva, enzimáticamente activa, fluorescentemente activa o electroquímicamente activa. De acuerdo con realizaciones en las que hay componentes para la detección de ácido nucleico que se derivan de *Chlamydia trachomatis* y también componentes para la detección de ácidos nucleicos derivados del control positivo interno o en los que hay un método de detección simultánea de los dos ácidos nucleicos, las etiquetas utilizadas para ayudar en la detección del control positivo interno y en la detección de ácido nucleico derivado de *Chlamydia trachomatis* son
65 preferiblemente distinguibles entre sí, por ejemplo, pueden ser diferentes fluorocromos o pueden ser diferentes

agentes electroquímicamente activos o etiquetas electroquímicamente activas proporcionando actividad electroquímicamente distinguible.

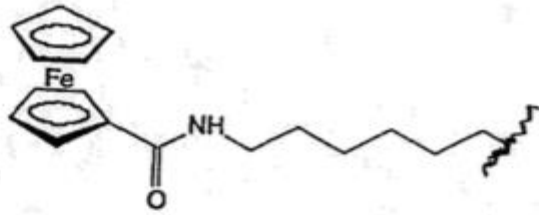
5 [0087] La presente invención es especialmente adecuada para su uso con sondas y/o cebadores electroquímicamente etiquetados. En particular, la etiqueta electroquímica puede incluir aquellos que comprenden complejos pi metalo-carbocíclicos, es decir complejos orgánicos con electrones pi parcial o totalmente deslocalizados. Los marcadores adecuados incluyen aquellos compuestos que comprenden compuestos de sándwich en los que dos anillos carbocíclicos son paralelos, y también sándwiches doblados (compuestos angulares) y monociclopentadienilos. Preferiblemente, los marcadores electroquímicamente activos son etiquetas de metaloceno. Más preferiblemente son etiquetas de ferrocenilo.

10 [0088] Etiquetas de ferrocenilo y metaloceno utilizadas en las sondas de acuerdo con la invención pueden ser ventajosamente carboxamidas de ferroceno o metaloceno sustituidas por TV. El anillo de ferroceno o metaloceno, que constituye el resto de marcaje, puede ser no sustituido. Si se desea, el anillo de ferroceno o metaloceno puede estar sustituido con uno o más sustituyentes, la naturaleza y ubicación de las cuales se selecciona a fin de influir de una manera deseada las características redox del resto ferroceno o metaloceno. El anillo de ferroceno o metaloceno puede, además, estar sustituido por cualquiera de los sustituyentes de anillo que no reducen sustancialmente la sensibilidad electroquímica del marcador. El resto de carboxamida de ferroceno o metaloceno puede estar ligado a través del nitrógeno de carboxamida al nucleótido u oligonucleótido. La vinculación al nucleótido u oligonucleótido es preferiblemente a través de un grupo fosfato o a través de la base del nucleótido. Ambos métodos de unión permiten que la etiqueta se una a través de cualquier nucleótido a lo largo de la longitud del oligonucleótido. Sin embargo, si la vinculación es a través de un grupo fosfato es ventajosamente a través de un grupo de fosfato terminal 3' o 5' a fin de minimizar la probabilidad de que tal vinculación se obstaculice estéricamente la hibridación de Watson-Crick del oligonucleótido o afectar a la actividad de nucleasa. La unión a través de una región de la base no implicada en la sincronización de base de Watson-Crick se prevé que sea menos perjudicial de tal apareamiento de bases. Por lo tanto la vinculación a través de la base puede ser más adecuada para el etiquetado en los sitios de oligonucleótidos no terminales. El oligonucleótido de etiqueta puede tener un resto conector entre el oligonucleótido y el resto de marcaje. Preferiblemente, los oligonucleótidos marcados tienen un resto de marcaje de ferrocenilo que está unido al oligonucleótido por un resto enlazador.

15 [0089] Puede usarse cualquier resto enlazador adecuado. Restos enlazadores adecuados pueden comprender una cadena alifática que puede ser lineal o ramificada, y saturada o insaturada. Ventajosamente, el resto conector es una cadena alifática lineal o ramificada que tiene de 4 a 20 átomos de carbono, y preferiblemente de 6 a 16, especialmente de 8 a 14 átomos, especialmente de 12 átomos de carbono. Las cadenas de alqueno pueden estar sustituidas con cualquier sustituyente o pueden estar interrumpidas por cualquier átomo o resto siempre que cualquier sustituyente tal, átomo o resto no reduce materialmente la sensibilidad electroquímica del marcador. Ilustrativas de las etiquetas de ferrocenilo que pueden usarse de acuerdo con la invención son aquellas en las Fórmulas I a III. Las moléculas de fórmula Ia a IIIa son oligonucleótidos marcados con las etiquetas de ferrocenilo correspondientes. Fórmula IV es ilustrativa de una etiqueta de ferrocenilo que puede estar unida a través de una base de nucleótidos, estando la base de timina amino-modificada incluida en la Fórmula IV para los fines de ilustración.

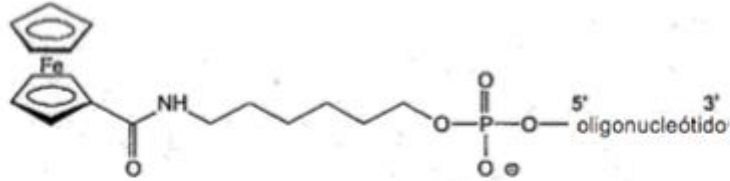


5



II

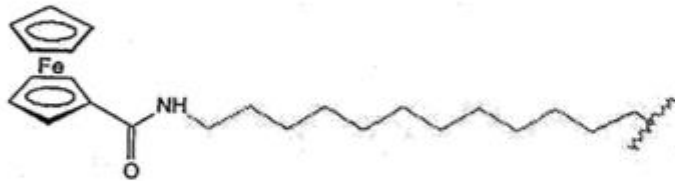
10



IIa

15

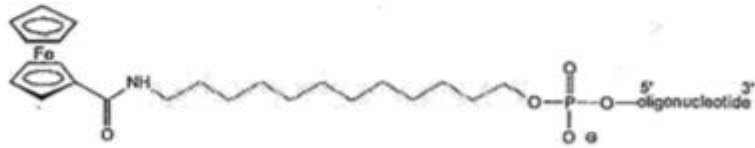
20



III

25

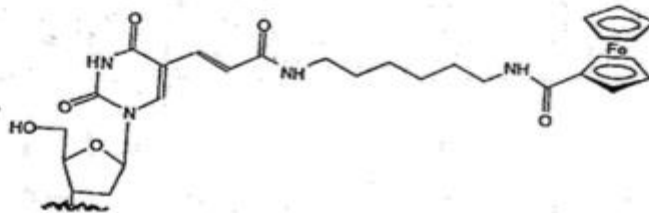
30



IIIa

35

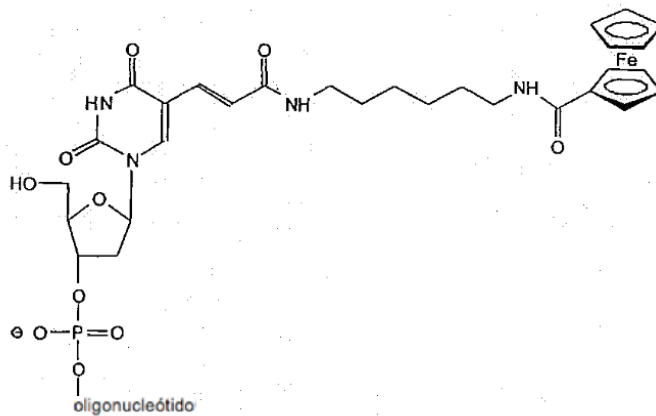
40



IV

45

50

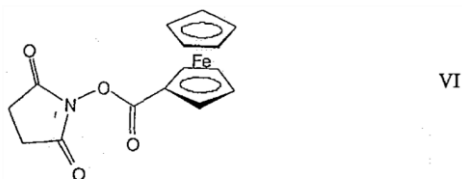
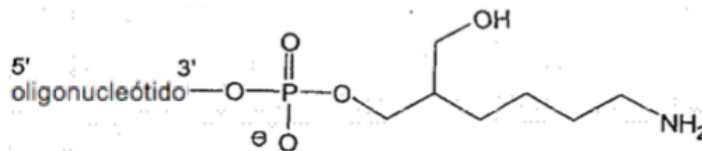


55

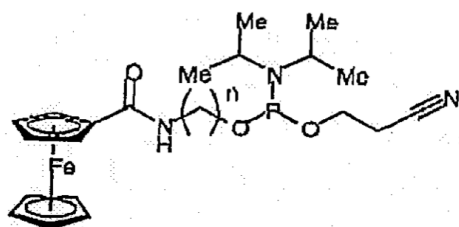
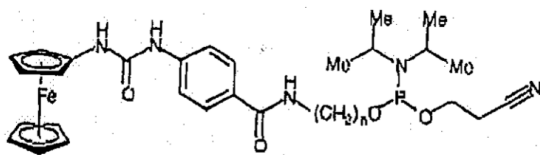
60

65

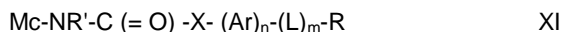
[0090] Sondas marcadas con ferroceno pueden hacerse por cualquier método adecuado. A modo de ejemplo, el oligonucleótido puede ser un oligonucleótido modificado mediante la introducción de un radical que tiene un grupo amino terminal. Ilustrativos de tales amino-nucleótidos modificados es el nucleótido modificado de fórmula V. El ferroceno puede entonces ser incorporado por reacción del nucleótido amino-modificado con el *N*-hidroxi-succinimida éster de ferroceno carboxílico (Fórmula VI) para obtener ferroceno oligonucleótido marcado.



[0091] En un método alternativo, los oligonucleótidos marcados con ferroceno pueden prepararse por adición del resto ferroceno durante la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Etiquetas de ferroceno pueden ser introducidas en un oligonucleótido durante la síntesis en fase sólida mediante dos métodos generales: en primer lugar, la adición del oligonucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido requiere el uso de una resina adecuada. Dicha resina es marcada con un derivado de ferroceno. La adición de ferroceno a un sitio interno, o al extremo 5' de un oligonucleótido requiere el uso de un reactivo de acoplamiento adecuado para el acoplamiento con un oligonucleótido unido a soporte sólido, por ejemplo una ferrocenilo derivado de fosoramidita, por ejemplo como se muestra como fórmula IX o X.



[0092] De acuerdo con ciertas realizaciones específicas, la etiqueta electroquímicamente activa puede ser un compuesto de:



[0093] En donde

- Mc es un grupo metalocenilo en el que cada anillo independientemente puede estar sustituido o no sustituido,
- El grupo metalocenilo comprende un ion metálico M seleccionado del grupo que consiste en hierro, cromo,

cobalto, osmio, rutenio, níquel o titanio,

- R' es H o alquilo inferior,
- X es NR' u O,
- Ar es un grupo sustituido o no sustituido de arilo,
- n es 0 o 1,
- L es un grupo enlazador,
- m es 0 o 1, y
- R representa un resto que ha de etiquetarse.

5

10 **[0094]** El grupo Mc puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de alquilo inferior (por ejemplo alquilo C1 a C4), alquilo inferior sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, amido éster o un grupo metaloceno, inferior alqueno, alqueno inferior sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster, amido o un grupo metaloceno, arilo, arilo sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster, amido o un grupo metaloceno. El grupo metaloceno puede estar sustituido de la misma manera como el grupo Mc con la excepción de que los grupos totales número Mc en la molécula de la invención preferiblemente no exceden de cuatro. Preferiblemente, el grupo Mc no está sustituido.

15

20 **[0095]** Preferiblemente, M es un ion seleccionado entre hierro, osmio o rutenio. Lo más preferiblemente, M es un ion de hierro. Cuando M es un ion de hierro, Mc es un ferroceno.

25

30 **[0096]** El alquilo inferior es preferiblemente alquilo C1 a C4. Preferiblemente, R' es H. Cada R' tiene una identidad separada de la otra R'.

35

[0097] Preferiblemente X es NH.

40

45 **[0098]** El grupo Ar puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de alquilo inferior (por ejemplo C₁ a C₄ alquilo), alquilo inferior sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido, alqueno inferior, alqueno inferior sustituido con un hidroxilo, un grupo halo, ciano, oxo, amino, éster o amido, arilo o arilo sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido. Preferiblemente, el grupo Ar no está sustituido.

50

[0099] Preferiblemente, n = 1. Preferiblemente, m = 1.

55

60 **[0100]** Grupos adecuados enlazadores L pueden comprender una cadena alifática que puede ser lineal o ramificada, y saturada o insaturada. Ventajosamente, el resto conector es una cadena alifática lineal o ramificada que tiene de 4 a 20 átomos de carbono, y preferiblemente de 6 a 16, especialmente de 8 a 14 átomos, más especialmente 12 átomos de carbono. Las cadenas de alqueno pueden estar sustituidas con cualquier sustituyente o pueden estar interrumpidas por cualquier átomo o resto siempre que cualquier sustituyente, átomo o resto no reduce materialmente la sensibilidad electroquímica del marcador.

65

[0101] El compuesto de la invención puede comprender más de un grupo metaloceno. En el compuesto de la invención, el grupo metaloceno puede estar sustituido por cualquier otro grupo marcador electroquímicamente activo. El compuesto puede ser uno que sea electroquímicamente activo o se hace electroquímicamente activo después de la escisión parcial.

[0102] Preferiblemente, el resto que ha de etiquetarse es un aminoácido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido, un nucleósido, un azúcar, un carbohidrato, un péptido, una proteína o un derivado de cualquiera de esas moléculas. En una realización preferida, R es un nucleótido o un oligonucleótido. El nucleótido puede ser seleccionado entre adenosina, timidina, guanosina, citidina o uridina. Preferiblemente, el nucleótido está unido a través de un grupo unido al grupo ribosa o desoxirribosa del nucleótido, por ejemplo en la posición 2', 3' o 5'. Lo más preferiblemente, el nucleótido está unido en la posición 3' o 5', por ejemplo en la posición 5'. Preferiblemente, la unión en la la posición 2', 3' o 5' es a través de un oxígeno o un átomo de nitrógeno.

[0103] El reactivo de marcado se puede unir directamente o mediante un enlazador. El enlazador se puede unir primero al reactivo de marcación o a la molécula a etiquetar. Si el enlazador se une primero a la molécula a ser etiquetada puede comprender un grupo, por ejemplo, un amino o un grupo tiol, que ayudará en la reacción de marcaje. Se prefiere un grupo amino.

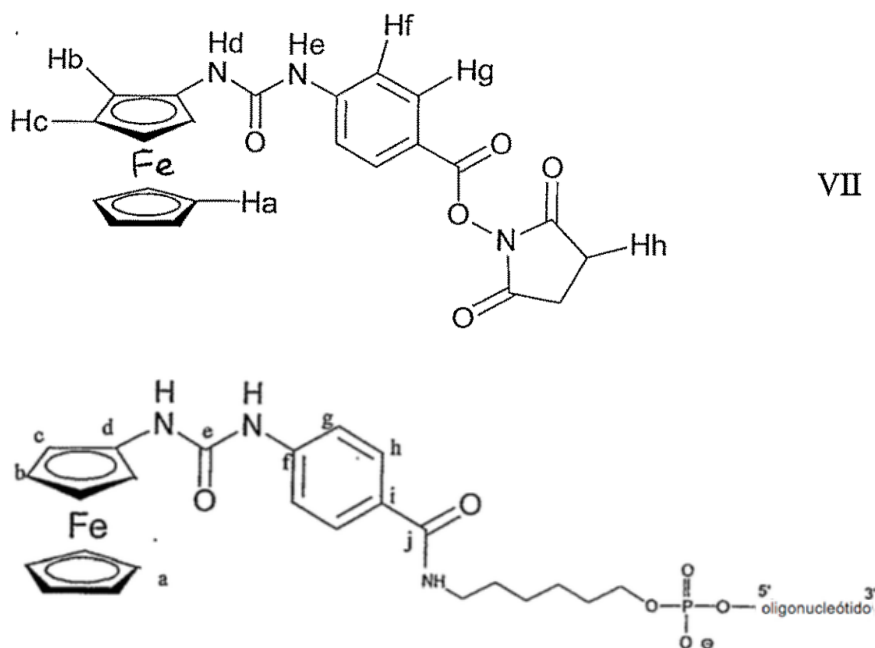
[0104] El nucleótido o un oligonucleótido se marca preferiblemente al extremo 3' o 5'. El oligonucleótido puede ser modificado con amino para ayudar con la reacción de marcaje. Oligonucleótidos modificados con amino pueden sintetizarse por técnicas convencionales y están disponibles en una amplia gama de fuentes comerciales, por ejemplo, de Oswel Scientific (Southampton, UK). El oligonucleótido modificado con amino puede también incorporar un motivo enlazador, por ejemplo, la modificación puede ser la adición de grupo de aminohexilo 5' o aminohexilo 3' o amino 5'-C12. Una molécula marcada de interés comprende preferiblemente un conector.

[0105] En el caso de un oligonucleótido, la secuencia de la porción de oligonucleótido de la molécula es preferiblemente tal que la molécula es capaz de hibridarse con una secuencia diana complementaria y, por tanto ser

utilizada como una sonda en una técnica biológica molecular, por ejemplo, una de las técnicas de detección o calificación de ácido nucleico descritas en esta especificación.

[0106] Moléculas biológicas etiquetadas de acuerdo con la invención pueden ser electroquímicamente activas en estados bien digeridos o no digeridos. Idealmente, el grado de actividad electroquímica variará en función de la extensión de la digestión.

[0107] Fórmula VIII ilustra un posible modo de fijación del nuevo marcador electroquímicamente activo a un oligonucleótido. La molécula de fórmula VIII puede obtenerse por reacción de un oligonucleótido modificado 5'-aminohexilo con la molécula mostrada en la fórmula VII.



[0108] Los detalles de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico y detalles del uso de dicho compuesto para marcar oligonucleótidos se proporcionan en los Ejemplos 7 y 8. No obstante, será evidente para la persona experta que tal etiqueta puede estar unida a un oligonucleótido en cualquier posición adecuada y que la unión no se limita al extremo 5' de dicho oligonucleótido. Para los detalles de la síntesis y la unión de las etiquetas electroquímicas anteriores, los lectores se denominan EP1481 083.

Uso de cebadores y sondas más cortas

[0109] De acuerdo con ciertas formas de realización de todos los aspectos de la descripción relativos a la hibridación, cebadores y sondas pueden ser más cortos que los especificados anteriormente en particular si se toman medidas para aumentar la temperatura de hibridación del cebador (y el solicitante contempla específicamente longitudes de 1, 2, 3, 4 o 5 restos nucleótidos más cortos que las longitudes y rangos descritos específicamente más arriba).

[0110] El uso de cebador y sondas más cortas puede ser facilitado por el uso de restos de unión al surco menor y también bloquear los ácidos nucleicos (también conocidos como ácidos nucleicos bloqueados o LNA) que aumentan la estabilidad térmica de cebadores y sondas y aumentar la temperatura de hibridación del cebador o sonda. El uso de tales modificaciones se contempla como parte de la presente descripción en relación con todos los aspectos de la descripción anterior y en particular en conjunción con sondas y cebadores como se describe anteriormente, pero con longitudes oligoméricas y rangos acortados por 5 restos de los especificados encima. La presente divulgación en todos sus aspectos contempla el uso de cebador y sondas más cortas en el que la estabilidad térmica aumentada se ve facilitada por el uso de restos de unión al surco menor y/o bloqueo de ácidos nucleicos en combinación con cebadores y sondas descritas en este documento que no tienen un aumento de la estabilidad térmica como se facilita por el uso de restos de unión al surco menor y/o bloquear los ácidos nucleicos, así como el uso exclusivo de cebadores y sondas que tienen mayor estabilidad térmica facilitado por el uso de restos de unión al surco menor y/o bloquear los ácidos nucleicos.

Ácidos nucleicos bloqueados

5 [0111] Para una revisión reciente de los ácidos nucleicos de bloqueo, el lector se dirige al boletín técnico de Devor (2005) Integrated DNA Technologies "Locked Nucleic Acids (LNA)" y las referencias en él.

10 [0112] Un LNA es un ácido nucleico que incorpora uno o más residuos de nucleótidos de ARN o ADN más modificados (en combinación con el ADN ordinario o residuos de ARN). En el residuo modificado, un puente covalente adicional conecta los átomos de carbono 2' y 3' y 'bloquea' el azúcar ribosa en la conformación estructural 3'-endo como se encuentra normalmente en la forma A de ARN y ADN.

15 [0113] El término LNA incluye todos los ácidos nucleicos que incorporan los residuos encerrados en algunas o todas las posiciones de los residuos. El bloqueo puede conseguirse por cualquier puente químico que conecta los carbonos 2' y 3' del resto de azúcar. Preferiblemente, el bloqueo se realiza en un enlace metileno 2' -O, 4' -C.

20 [0114] LNA muestran estabilidad térmica incrementada, con temperatura de fusión creciente en alrededor de 5°C en comparación a oligómeros de ADN o ARN correspondientes. Debido a la temperatura de fusión elevada, se incrementa el riesgo de cebadores de LNA y sondas que forman estructuras de horquilla perjudicial para las reacciones de PCR eficientes. Un buen diseño de cebador y de sonda por lo tanto, se vuelve aún más esencial y en relación con la presente solicitud, cebadores y sondas de LNA correspondientes a los descritos en las SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 11, 12 y 14, opcionalmente acortados por 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de cualquier extremo, se dan a conocer. LNA se puede preparar fácilmente y están disponibles comercialmente de un número de proveedores.

Restos de unión al surco menor

25 [0115] La invención, de acuerdo con todos sus aspectos, se refiere también a sondas y cebadores de ácido nucleico (incluyendo sondas de LNA y cebadores) conjugado con restos de unión al surco menor (MGB). Restos de MGB son grupos en forma isométrica que se unen en el surco menor de una doble hélice que se forman entre la sonda o cebador y diana. Estabilizan la región de doble cadena y aumentan la temperatura de fusión y la especificidad de la sonda/cebador, permitiendo que se utilicen las sondas más cortas/cebadores. Para más detalles de restos MGB y métodos de fijación se remite el lector a Katyavin et al. (2000) Nucleic Acid Res. 28 (2): 655-661. Restos menores de unión al surco pueden ser fácilmente preparados y unidos a los cebadores y sondas y están disponibles comercialmente de un número de proveedores.

35 Muestras

[0116] De acuerdo con diversos aspectos de la invención, las muestras pueden incluir muestras clínicas, incluyendo los tejidos y fluidos no limitados a sangre, plasma, suero, secreciones, semen, plasma seminal; lágrimas y saliva. El término "muestra" incluye también los derivados de muestras clínicas, por ejemplo, las muestras que han sido filtradas, coaguladas, desinfectadas, irradiadas o separadas, y también se utiliza dispositivos médicos o apósitos previamente en contacto con un sujeto. Dicho sujeto es preferiblemente un ser humano.

Ejemplos

45 [0117] La invención se ilustrará ahora con los siguientes ejemplos no limitativos.

a) Ejemplo 1 - Selección de cebadores de PCR

50 Análisis blastn de amplicones cromosómicos y cebadores

[0118] Se llevó a cabo el análisis Blastn de los 18 amplicones cromosómicos identificados de *Chlamydia trachomatis*. Todos los amplicones analizados no mostraron ninguna pega fuera de *Chlamydia trachomatis*, con la excepción del amplicón cromosómico 18 que mostró similitud con *Muridarum Chlamydothila*. Los conjuntos de cebadores mostraron cierta similitud con otras especies, que se esperan en la búsqueda de similitud utilizando este tipo de secuencias cortas, sin embargo si esto es significativo o no sólo se hace evidente una vez que la prueba de exclusividad se lleva a cabo.

b) Ejemplo 2 - Pruebas iniciales de cebadores usando PCR simétrica

60 Dianas de plásmidos

[0119] Se obtuvieron conjuntos de cebadores para amplicones de plásmido 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Para examinar estos conjuntos de cebadores, reacciones simétricas de PCR usando 10.000 EBs por reacción se establecieron por triplicado para cada conjunto de cebadores de acuerdo con la tabla 1 a continuación.

65

Tabla 1: Configuración de la reacción PCR simétrica

| Reactivo | Concentración | Concentración final | reacción individual |
|------------------------|---------------|---------------------|---------------------|
| Tampón de reacción PCR | 10X | 1X | 5,0 µL |
| MgCl ₂ | 25 mM | 3,0 mM | 6,0 µL |
| Mezcla de dUTP | 50,0 mM | 1,0 mM | 1,0 µL |
| Cebador de avance | 10 µM | 0,3 metro METRO | 1,5 µL |
| Cebador inverso | 10 µM | 0,3 metro METRO | 1,5 µL |
| Polimerasa (Taq) | 2,5 U/µL | 2,5 U | 1,0 µL |
| dH ₂ O | n/a | n/A | 32,0 µL |
| EB | (5000/µL). | 10,000 EBS | 2,0 µL |
| TOTAL | | | 50,0 µL |

[0120] Las reacciones negativas se incluyeron en triplicado para cada conjunto de cebadores. Condiciones de de reacción PCR fueron las siguientes:

1. 94°C x 1 minuto
2. 94°C x 30 segundos
3. 58°C x 30 segundos
4. 72°C x 1 minuto
5. Repetir los pasos 2 a 4 x 39 ciclos
6. 72°C x 3 minutos
7. 16°C mantenimiento

[0121] Después de la PCR, 10 µL de cada producto se ejecuta en un gel de agarosa al 2% teñido con Safeview. Tras la electroforesis y la visualización del gel usando luz UV, se encontró que bajo las condiciones probadas, todos los conjuntos de cebadores permiten la amplificación de las regiones diana, indicadas por la presencia de bandas en el gel. Tres conjuntos de cebadores dieron la mayor intensidad de banda: amplicones de plásmidos 3, 5 y 7. Las reacciones negativas no mostraron bandas.

Dianas cromosómicas

[0122] Se obtuvieron conjuntos de cebadores para los números de amplicones 1, 5, 9, 17 y 18. Para examinar estos conjuntos de cebadores, reacciones simétricas de PCR usando 10.000 EBs por reacción se establecieron por triplicado para cada conjunto de cebadores de acuerdo con la Tabla 1 anterior. Las reacciones negativas se incluyeron en triplicado para cada conjunto de cebadores. condiciones de reacción de PCR fueron como se describe anteriormente.

[0123] Después de la PCR, 10 µL de cada producto se ejecuta en un gel de agarosa al 2% teñido con Safeview. Tras la electroforesis y la visualización del gel usando luz UV, se encontró que bajo condiciones de prueba, todos los conjuntos de cebadores permiten la amplificación de la región diana, indicada por la presencia de bandas en el gel. Conjuntos de cebadores cromosómicos para amplicones 9 y 19 dieron la intensidad de la banda más alta con los juegos restantes que muestran intensidades ligeramente más débiles, con amplicón cromosómico 17 siendo ligeramente mejor que el resto.

c) Ejemplo 3 - Límite de pruebas de detección (LOD) usando PCR asimétrica y detección electroquímica

Dianas de plásmidos

[0124] Los experimentos se llevaron a cabo para determinar el límite de detección de EB de *Chlamydia trachomatis* cuando conjuntos de cebador plásmido 3, 5, 7 se utilizaron en PCR asimétrica seguido de la adición de la sonda de amplicón específico, la digestión con exonucleasa T7 y detección de punto final electroquímico. Reacciones asimétricas de PCR utilizando diluciones de diez veces de EB por reacción de 100.000 a 1 se establecieron por triplicado para cada conjunto de cebadores de acuerdo con la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Configuración de la reacción de PCR asimétrica

| Reactivo | Concentración | Concentración final | Reacción individual |
|------------------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Tampón de reacción PCR | 10X | 1X | 5,0 µL |
| MgCl ₂ | 25 mM | 3,0 mM | 6,0 µL |
| dNTP con mezcla dUTP | 50,0 mM | 1,0 mM | 1,0 µL |
| Cebador de avance | 10 metro METRO | 0,04 metro METRO | 0,2 µL |
| Cebador inverso | 10 metro METRO | 0,3 metro METRO | 1,5 µL |
| Polimerasa de Taq | 2,5 U/µL | 2,5 U | 1,0 µL |
| dH ₂ O | n/a | n/a | 23,3 µL |
| EB | Variable | Variable | 2,0 µL |
| TOTAL | | | 50,0 µL |

[0125] Las reacciones negativas se incluyeron en triplicado para cada conjunto de cebadores. Condiciones de reacción de PCR fueron como se ha indicado anteriormente en el Ejemplo 1.

[0126] Después de la PCR, 20 µL de la reacción se añadió a 5 µL de la mezcla maestra en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Mezcla muestra de detección electroquímica

| Reactivo | Concentración | Concentración final | Reacción individual |
|------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|
| Sonda de amplicón específico | 100 µM | 3 µM | 0,75 µL |
| Exonucleasa de T7 | 10000 U/ml | 10 U | 1,0 µL |
| dH ₂ O | n/a | n/a | 3,25 µL |

[0127] Las reacciones se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Después de la incubación, los 25 µL se midieron voltamétricamente, utilizando los siguientes parámetros Autolab:

Pretratamiento: potencial de acondicionamiento (V): 0, duración: 0s, potencial de deposición: 0, duración: 0, tiempo de equilibrado: 0,

Medición: Célula después de la medición: X, tiempo de modulación ($\geq 0,0025$): 0,04, tiempo de intervalo ($\geq 0,105$): 0,1,

Potenciales: Inicial: -0,1, Fin: 0.5, Paso: 0.003, Mmplitud de modulación: 0,04995, potencial de espera (V): 0,

Pretratamiento: Equilibrado de parada a umbral: no, equilibrado

Valor umbral (A): 0.05,

Diverso: Número de exploraciones: 1.

[0128] En cada caso, se registraron las alturas de los picos entre 150-250 mV.

[0129] Los datos electroquímicos obtenidos se mostraron en las figuras 1a, 1b, 1c y 2c, para amplicones de plásmidos 3, 5 y 7, respectivamente. Las barras de error muestran la DE (n = 3).

[0130] Los valores negativos obtenidos fueron negativos "no pico". Positivos triplicados de una sola copia se registraron para amplicones de plásmidos 3 y 7, sin embargo sólo un valor positivo de cada tres se registró para el amplicón de plásmido 5. Por lo tanto, el amplicón de plásmido 5 fue eliminado en esta etapa y el experimento para amplicones de plásmidos 3 y 7 se repitieron, de nuevo por triplicado como anteriormente. Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos anteriormente.

[0131] Aunque amplicón de plásmido 7 mostró alturas de picos sostenidas y parecieron mejores para uso como un conjunto de cebadores de plásmido, un experimento de exclusividad usando PCR asimétrica, la digestión de exonucleasa T7 y la detección electroquímica se llevó a cabo usando *Chlamydomophila pneumoniae*. Esto determina que el conjunto de cebadores para el amplicón de plásmido 7 dio una señal positiva con *C. pneumoniae* (media 88,05 nA) y como tal no era adecuada para uso como un conjunto de cebadores específico a *Chlamydia trachomatis*. Cebadores y sondas para el amplicón de plásmido 3 no mostraron esta señal positiva, y por lo tanto se seleccionó como el candidato principal para la detección de plásmido de *Chlamydia trachomatis*.

Dianas cromosómicas

[0132] Los experimentos se llevaron a cabo para determinar el LoD de EB *C. trachomatis* cuando se utilizaron conjuntos de cebadores para amplicones cromosómicos 9, 17 y 18 en la PCR asimétrica seguido de la adición de la sonda de amplicón específico apropiado, digestión con exonucleasa de T7 y la detección de punto final electroquímico. Reacciones asimétricas de PCR utilizando diez diluciones de EB por reacción de 100.000 a 1 se establecieron por triplicado para cada conjunto de cebadores de acuerdo con la Tabla 2 anterior. Después de la PCR, 20 µL de la reacción se añadió a 5 µL de la mezcla maestra se muestra en la tabla 3 anterior. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Después de la incubación, los 25 µL se midieron voltamétricamente utilizando los parámetros establecidos anteriormente. En cada caso, se registraron las alturas de los picos entre 150-250 mV.

[0133] Los datos electroquímicos obtenidos se muestran en las figuras 2a, 2b y 2c a continuación, por amplicones cromosómicos 9, 17 y 18, respectivamente. Las barras de error muestran la DE (n = 3). Los puntos de datos indican la media de los valores negativos obtenidos.

[0134] Los datos obtenidos anteriormente indicarían que para todos los amplicones probados, las alturas de los picos parecen no disminuirse hasta niveles de menos de 1.000 EB se utilizan por reacción. Después de este nivel, por amplicones cromosómicos 8 y 18, alturas de pico se disminuyeron a la mitad en el nivel/reacción 100 EB. Para amplicón cromosómico 17, este descenso es algo más pequeño. Los datos para el amplicón cromosómico 9 muestran que a un nivel de 10 EB por reacción, las alturas de los picos son similares a las observadas para las muestras negativas. Estos datos indicarían que el amplicón cromosómico 17 se realiza mejor que el amplicón cromosómico 18, y ambos de estos amplicones se realizan mejor que el amplicón cromosómico 9 con respecto a la discriminación baja.

[0135] Para mejorar la detección en el extremo inferior, un método que ha sido utilizado con éxito por los inventores consiste en variar la concentración de MgCl₂. Este experimento se completa con concentraciones de MgCl₂ definitiva por reacción de 2,0 mM a 5,0 mM en incrementos de 0,5 mM utilizando 10.000 EB por PCR asimétrica, seguido de la adición de la sonda, la digestión T7 y la medición electroquímica. Los datos obtenidos sugieren que una concentración de MgCl₂ definitiva de 5,0 mM permitió que se obtuviera la mayor altura de pico en las condiciones ensayadas. Para confirmar que esta concentración de MgCl₂ se aplicó a través de todos los niveles de EB, un segundo experimento de LOD se realizó con amplicón cromosómico 17 usando 5,0 mM de MgCl₂. Los resultados se muestran en la Figura 2D. Las barras de error muestran la DE (n = 3). La línea de puntos de datos indica la media de los valores negativos obtenidos.

[0136] Los datos muestran que la ejecución de PCRs utilizando 5,0 mM de MgCl₂ da un rendimiento óptimo cuando se utilizan 1.000 EB por reacción en comparación con 10.000 o 100.000 EB por reacción. Siguiendo el nivel EB 1000, las alturas de los picos caen a un valor medio en 1 EB de 54,97 nA. En conjunto, el conjunto de cebador y sonda de amplicón cromosómico 17 (SEQ ID NO: 1) fue seleccionado como el principal candidato para detección *Chlamydia trachomatis* de la diana cromosómica. Las secuencias de cebador y sonda de avance e inversa son, respectivamente, como se da en SEQ ID NOS: 6, 7 y 5.

d) Ejemplos 4 - Verificación de exclusividad e inclusividad

Introducción

[0137] Es esencial que el ensayo de clamidia sea altamente específico para *Chlamydia trachomatis* solamente y que ninguna reactividad cruzada sea evidente a través de otras especies de bacterias o cualquier otro organismo. Durante la fase de diseño de cebador y sonda indicada en los Ejemplos 1 a 3, se demostró que bioinformáticamente no hubo reactividad cruzada, sin embargo, era esencial demostrar esto experimentalmente utilizando verdaderos aislados microbianos.

[0138] Al contrario de esto también era esencial demostrar que el ensayo fue capaz de detectar todos los 15 serovares de genitales *Chlamydia trachomatis* y saber que otros serovares (que causan enfermedad ocular o artrítica) también son capaces de ser amplificados por el conjunto de cebadores de ensayo.

[0139] Muestras de ADN derivadas de un panel de bacterias se ensayaron frente a tanto el plásmido como los cebadores genómicos para la prueba de especificidad (exclusividad) usando PCR y detección de punto final de la sonda-T7.

[0140] Para verificar la inclusión, los 15 serovares de *Chlamydia trachomatis* se obtuvieron entonces (como EB) y el ADN extraído, purificado y cuantificado. Tres niveles de copias de ADN fueron analizados utilizando los conjuntos de cebadores tanto de plásmido como genómicos, seguido por detección de exonucleasa de punto final de sonda-T7 para establecer si todos los serovares tenían LoD similares.

Pruebas de exclusividad

[0141] Conjuntos de cebadores genómicos se ensayaron por duplicado con la lista de ADN como se especifica en la introducción. La salida se midió en la altura de pico de señal tras detección de PCR, y de sonda-T7. La prueba se llevó a cabo en lotes con controles de PCR para cada lote probado.

5

Resultados de amplicón cromosómico 17

[0142] Los cebadores y las sondas dirigidas a amplicón cromosómico 17 se ensayaron frente a una lista de ADN genómico. Resultados para duplicar los experimentos se presentan a continuación:

10

| Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Acinetobacter genospecies 9</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Acinetobacter haemolyticus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Anaerococcus tetradius</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Arcanobacterium pyogenes</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Bacillus cereus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Bacteroides thetaiotamicron</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |

35

40

45

50

55

60

65

| | Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| 5 | <i>Bifidobacterium breve</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Bordetella pertussis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 10 | <i>Burkholderia cepacia</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>DiverSus Citrobacter</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 15 | <i>Citrobacter freundii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Clostridium difficile</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 20 | <i>Corynebacterium ureaplasma</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Enterobacter aerogenes</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 25 | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Enterococcus dispar</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 30 | <i>Enterococcus gallinarum</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Enterococcus mundtii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 35 | <i>Enterococcus raffinosus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Escherichia hermanii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 40 | <i>Finegoldia magna</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Gardnerella vaginalis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 45 | <i>Haemophilus influenzae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Hafnia alvei</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 50 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |

50

55

60

65

ES 2 642 804 T3

| | Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|----|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| 5 | <i>Lactobacillus casei</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Lactobacillus crispatus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 10 | <i>Lactobacillus gasseri</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Lactobacillus reuteri</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 15 | <i>Listeria innocua</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Mobiluncus curtisii</i> subsp. <i>Holmesii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Mulieris mobiluncus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 20 | <i>Moraxella catarrhalis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 25 | <i>Moraxella osloensis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Pantoea agglomerans</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 30 | <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Prevotella bivia</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 35 | <i>Propionibacterium acnes</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Proteus rettgeri</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 40 | <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> | 196 | 30 |
| | | 205 | 20 |
| | <i>Shigella flexneri</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 45 | <i>Shigella sonnei</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |

50

55

60

65

ES 2 642 804 T3

| | Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| 5 | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | 205 | 17,7 |
| 10 | <i>Staphylococcus intermedius</i> | 193 | 19,6 |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 15 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus anginosus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 20 | <i>Streptococcus australis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus bovis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 25 | <i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus equinus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus gordonii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 30 | <i>Streptococcus mitis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus mutans</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 35 | <i>Streptococcus oralis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus porcinus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 40 | <i>Streptococcus suis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus uberis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 45 | <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> | 199 | 14,5 |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | 208 | 14,3 |

50

55

60

65

| | Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|----|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| 5 | <i>Enterobacter cloacae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Lactococcus lactis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | 199 | 16,6 |
| 10 | <i>Clostridium perfringens</i> | sin pico | sin pico |
| | | 199 | 12,2 |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 15 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Escherichia coli</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 20 | <i>Proteus vulgaris</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Campylobacter coli</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 25 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 30 | <i>Homo sapiens</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 35 | <i>Candida albicans</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Streptococcus agalactiae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | 202 | 6,24 |
| 40 | <i>Pectobacterium atrosepticum</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Chamidia pecorum</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| | <i>Chlamydia psittaci</i> | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |
| 45 | PCR positivo | 205 | 96,8 |
| | | 193 | 73,5 |
| | PCR negativo | ningún pico | ningún pico |
| | | ningún pico | ningún pico |

50

Conclusiones generales - exclusividad

55 [0143] Ninguno de los conjuntos de cebadores mostraron reactividad cruzada que indica que el ensayo de *Chlamydia* es altamente específico.

Pruebas de inclusividad

60 [0144] EB obtenidos para 15 serotipos de *C. trachomatis* (A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2, L3) se lisaron y su ADN se purificó y se cuantificó. Los niveles de 50.000, 500, 50 o 5 copias de genoma de cada serotipo se ensayaron para la inclusión en reacciones de PCR utilizando cebadores y sondas como se indica anteriormente (SEQ ID NOS: 6 y 7 y 5). La altura de pico de la señal se midió después de la detección de punto final usando la sonda-T7.

65 Resultados de inclusividad de amplificación cromosómico 17

[0145]

ES 2 642 804 T3

| Serotipo | Nivel EB/PCR | Posición del pico (mV) | Altura de Pico (nA) |
|----------|--------------|------------------------|---------------------|
| A | 50.000 | 193 | 177 |
| | 50.000 | 187 | 184 |
| | 500 | 193 | 120 |
| | 50 | 193 | 91,3 |
| | 5 | 193 | 19,8 |
| | 5 | 193 | 43,2 |
| B | 50.000 | 190 | 217 |
| | 50.000 | 193 | 188 |
| | 500 | 190 | 115 |
| | 50 | 190 | 128 |
| | 5 | 196 | 15,7 |
| | 5 | 190 | 35,4 |
| C | 50.000 | 193 | 184 |
| | 50.000 | 193 | 198 |
| | 500 | 190 | 125 |
| | 50 | 190 | 93,8 |
| | 5 | 196 | 49,8 |
| | 5 | 202 | 45 |

| Serotipo | Nivel EB/PCR | Posición del pico (mV) | Altura de Pico (nA) |
|----------|--------------|------------------------|---------------------|
| D | 50.000 | 193 | 146 |
| | 50.000 | 190 | 135 |
| | 500 | NP | NP |
| | 50 | 196 | 36,4 |
| | 5 | NP | NP |
| | 5 | NP | NP |
| E | 50.000 | 193 | 201 |
| | 50.000 | 193 | 151 |
| | 500 | 193 | 72,4 |
| | 50 | 193 | 79,3 |
| | 5 | NP | NP |
| | 5 | 199 | 14,2 |
| F | 50.000 | 193 | 204 |
| | 50.000 | 190 | 179 |
| | 500 | 196 | 126 |
| | 50 | 199 | 149 |
| | 5 | 202 | 36,8 |
| | 5 | NP | NP |
| G | 50.000 | 193 | 91,1 |
| | 50.000 | 196 | 80,5 |
| | 500 | 202 | 38,9 |
| | 500 | 199 | 42,1 |
| | 5 | NP | NP |
| | 5 | 202 | 10,2 |
| H | 50.000 | 196 | 200 |
| | 50.000 | 202 | 246 |
| | 500 | 193 | 64,3 |
| | 50 | 205 | 97,5 |
| | 5 | 196 | 14,3 |
| | 5 | 205 | 17,6 |
| I | 50.000 | 190 | 166 |
| | 50.000 | 190 | 204 |
| | 500 | 193 | 114 |
| | 50 | 190 | 107 |
| | 5 | 196 | 16,5 |
| | 5 | 196 | 42,3 |

| Serotipo | Nivel EB/PCR | Posición del pico (mV) | Altura de Pico (nA) |
|------------------|--------------|------------------------|---------------------|
| J | 50.000 | 208 | 181 |
| | 50.000 | 193 | 144 |
| | 500 | 196 | 52,1 |
| | 50 | 193 | 49,2 |
| | 5 | NP | NP |
| | 5 | NP | NP |
| K | 50.000 | 193 | 181 |
| | 50.000 | 190 | 204 |
| | 500 | 211 | 111 |
| | 50 | 193 | 73,5 |
| | 5 | NP | NP |
| | 5 | NP | NP |
| L1 | 50.000 | 199 | 188 |
| | 50.000 | 196 | 247 |
| | 500 | NP | NP |
| | 50 | 199 | 147 |
| | 5 | 193 | 191 |
| | 5 | 196 | 32,7 |
| L2 | 50.000 | 196 | 200 |
| | 50.000 | 214 | 403 |
| | 500 | 196 | 135 |
| | 50 | 199 | 123 |
| | 5 | 199 | 62,5 |
| | 5 | 199 | 68,6 |
| L3 | 50.000 | 196 | 258 |
| | 50.000 | 199 | 247 |
| | 500 | 193 | 171 |
| | 50 | 193 | 122 |
| | 5 | 199 | 34,3 |
| | 5 | 202 | 15,4 |
| Controles de PCR | Positivo | 193 | 146 |
| | Positivo | 193 | 147 |
| | Negativo | NP | NP |
| | Negativo | NP | NP |

Conclusión general - Inclusividad

[0146] Usando el conjunto de cebador (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7) y la sonda (SEQ ID NO: 5) para amplicón genómico 17 todos los serotipos son capaces de ser amplificados y detectados electroquímicamente a 5 copias excepto para los serotipos D, J y K. Estos se informaron junto con el serotipo G utilizando el cebador y la sonda fijada para amplicón genómico 17 y mostró que D fue capaz de ser amplificada en 50 copias, J a 50 copias y K en 50 copias.

e) Ejemplo 5 - Identificación y singularidad de genes diana de *Pectobacterium atropeticum* para su uso como un control interno

[0147] El genoma de *Pectobacterium atropeticum* de 5,064 Mb (nº de acceso BX950851) fue descargado desde el sitio web de NCBI Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>). El genoma de *Pectobacterium atropeticum* está completamente anotado con los nombres de genes, funciones y localización genómica, incluyendo genes hipotéticos. Se seleccionaron tres genes para la investigación.

[0148] Éstos eran *rfaH*, (empezando en la posición de pares de bases 230144 de 489 pb de longitud en la orientación inversa que codifica una proteína de activador de la transcripción), *mgsA*, (empezando en la posición de pares de bases 2008746 de 458 pb de longitud en la orientación inversa que codifica una sintasa de metilgloxal) y un gen que codifica una proteína hipotética, HP1 designado, empezando en la posición de pares de bases 143610 de 387 pb de longitud en la orientación inversa. El interrogatorio de estos genes utilizando el programa Blastn del NCBI con los filtros establecidos para la completa colección de nucleótidos <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&ME> GABLAST = on&BLAST_PROGRAMS=megaB-last&PAGE_TYPE=BlastSearch&S HOW_DEFAULTS=on) determinó que los

únicos resultados encontrados fueron en *Pectobacterium atrosepticum* en sí, lo que significa que los cebadores diseñados para amplificar regiones de estos genes no deben amplificar regiones de otros géneros, no limitándose a las bacterias.

5 **Diseño de cebador/sonda**

[0149] Las secuencias de genes de longitud completa se seleccionaron a partir del genoma utilizando el programa Clone Manager. La función de diseño del cebador del programa se utiliza para elegir conjuntos de cebadores de longitud óptima de 20 bases (18-22 bases aceptables), amplificando un producto de entre 90 y 150 pb a partir de cada gen. Los criterios aplicados para cada cebador consistieron en tener un GC% de entre el 50-60%, una Tm de 50-80°C, con menos de 3 partidos en el extremo 3', menos de 7 bases homólogas adyacentes, estabilidad mayor que o igual a 1,2 kcal en el extremo 5' vs el extremo 3', al menos una G o C en el extremo 3', menos de cuatro ejecuciones de bases, menos de tres repeticiones de dinucleótidos y no hay horquillas con temperaturas de hibridación de 55°C. Basándose en estos criterios, se encontraron tres conjuntos de cebadores, amplificando 124 pb de *rfaH*, 91 pb de *mgsA* y 98 pb de HP1. Las sondas de ADN monocatenario fueron diseñadas utilizando el programa Clone Manager utilizando los siguientes criterios: GC% de 50-60%, Tm de 32-100°C, menos de 5 bases homólogas adyacentes, menos de 4 ejecuciones de bases, menos de 3 repeticiones de dinucleótidos y ningunas horquillas en una temperatura de hibridación de 42°C.

20 **Pruebas de cebadores/sonda**

Amplificación inicial de las secuencias diana

[0150] Los tres conjuntos de cebadores se probaron utilizando PCR con ADN genómico SCRI1043 de cepa *Pectobacterium atrosepticum* correspondiente a depósito bacteriano ATCC que tienen el número de acceso BAA-672. PCR simétrica se llevó a cabo utilizando las condiciones de reacción mostradas en la tabla a continuación y condiciones de ciclación como se muestra en la Tabla 4 y la Tabla 5 a continuación.

30 **Tabla 4: Condiciones de reacción de PCR para ensayo simétrico**

| | Volumen/reacción, µl |
|---------------------------|----------------------|
| 10x tampón PCR | 3 |
| MgCl ₂ , 25 mM | 1,8 |
| dNTPs, 6 mM | 3 |
| Cebador de avance, 10 µM | 1,5 |
| Cebador inverso, 10 µM | 1,5 |
| Taq pol. 5U/µl | 0,3 |
| (ADN, 2 ng/µl) | 2 |
| dH ₂ O | 16,9 |
| TOTAL | 30 |

45 **Tabla 5: Condiciones de los ciclos de PCR**

| Paso de ciclo | Temperatura | Duración |
|---------------|-------------------|----------|
| 1 | 94°C | 1 minuto |
| 2 | 94°C | 20 s |
| 3 | 58°C | 20 s |
| 4 | 72°C | 20 s |
| 5 | Ir a 2, 39 ciclos | |
| 6 | 72°C | 3 min |
| 7 | 16°C | Sostén |

[0151] Tras el termociclado, 10 µL de producto de PCR amplificado se ejecuta en un gel de agarosa al 1,5%. Después de la electroforesis, el gel se fotografió bajo luz UV. Usando un DNA Ladder de 100 pb como referencia, todos los conjuntos de cebadores amplificaron los productos deseados en estas condiciones. El límite de experimentos de detección se llevó a cabo por triplicado, utilizando diversas cantidades de ADN genómico de *Pectobacterium atrosepticum* bajo reacción de PCR idéntica y condiciones de ciclismo determinaron que *rfaH* se amplificó a todos los niveles ensayados a partir de 2 ng (366.468 copias) hasta una cantidad total de ADN de 2 pg (366 copias del genoma), mientras *mgsA* y HP1 fueron detectados en todos los niveles de 2 ng a 200 fg (37 copias del genoma). Los controles negativos fueron incluidos en su caso.

f) Ejemplo 6 - Amplificación simétrica y asimétrica y detección utilizando sondas electroquímicas

[0152] Sondos electroquímicas se sintetizaron utilizando etiquetas de ferroceno para cada una de las tres secuencias de la sonda. Dos nanogramos de ADN genómico de *Pectobacterium atropeticum* se amplificaron en reacciones por triplicado utilizando conjuntos de cebadores de *rfaH*, *mgsA* y HP1 en condiciones simétricas de PCR (mostrados en la Tabla 5, más arriba) o condiciones de PCR asimétrica utilizando las condiciones de reacción mostradas en la Tabla 6 (a continuación), con las condiciones de los ciclos mostrados en la Tabla 5 anterior. Controles negativos por triplicado (de sólo agua) se realizaron por triplicado para cada conjunto de cebadores para cada condición de amplificación.

Tabla 6: Condiciones de reacción de PCR para ensayo asimétrico

| | Volumen/reacción, μL |
|-----------------------------------------|---------------------------------|
| 10x tampón PCR | 3 |
| MgCl ₂ , 25 mM | 1,8 |
| dNTPs, 6 mM | 3 |
| Cebador, 10 μM en exceso* | 1,5 |
| Cebador, 10 μM no en exceso* | 0,2 |
| Taq pol. 5U/ μL | 0,3 |
| (ADN, 2 ng/ μL) | 2 |
| dH ₂ O | 18,2 |
| TOTAL | 30 |

* Cebadores en exceso eran *rfaH* inverso, *mgsA* de avance y HP1 inversa.

[0153] Sólo para PCR simétrica, 10 μL de cada volumen de reacción se ejecuta en un gel de agarosa al 1,5% para visualizar tamaños de los productos de PCR. Esto confirmó la presencia de producto de PCR.

[0154] Una mezcla maestra apropiada se hizo para 14-151 sondas de amplicón específico como se muestra en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Mezcla maestra para la detección electroquímica

| Reactivo | Concentración | Concentración final | Reacción individual |
|------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| Sonda de amplicón específico | 100 metro METRO | 3 μM | 0,75 μL |
| Exonucleasa de T7 | 10000 U/ml | 10U | 1.0 μL |
| dH ₂ O | n/a | n/a | 3,25 μL |

[0155] Cinco microlitros de la mezcla de sonda apropiada se añadieron a 20 μL de producto de PCR y la mezcla se incubó a 37°C durante 20 minutos. Después de la incubación, el potencial electroquímico se midió electroquímicamente utilizando los siguientes parámetros Autolab:

Pretratamiento: Potencial acondicionado (V): 0, Duración: 0s, Potencial de deposición: 0, Duración: 0, Tiempo de equilibrado: 0,

Medición: Célula después de medición: X, Tiempo de modulación ($\geq 0,0025$): 0,04, Tiempo de intervalo ($\geq 0,105$): 0,1,

Potenciales: Inicial: -0,1, Fin: 0,5, Paso: 0,003, Amplitud de modulación: 0,04995, potencial de espera (V): 0,

Pretratamiento: Detener equilibrado a umbral: no, Valor de umbral de equilibrado (A): 0,05,

Varios: Número de exploraciones: 1.

[0156] Los datos medios ($n = 3$) obtenidos de las lecturas electroquímicas se muestran en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8: Resumen de los datos electroquímicos obtenidos para cada conjunto de amplificación/sonda

| Amplificación | Condiciones | Tipo | Ubicación de Pico, mV | Altura de pico, NA | | |
|---------------|-------------|----------|-----------------------|--------------------|-------|-------|
| | | | | Media | DE | CV |
| <i>rfaH</i> | Asimétrico | Positivo | 194 | 280,67 | 19,6 | 6,98 |
| | Asimétrico | Negativo | 180 | 39,93 | 1,85 | 4,63 |
| <i>mgsA</i> | Asimétrico | Positivo | 189 | 206,33 | 49,2 | 23,85 |
| | Asimétrico | Negativo | 187 | 25,77 | 2,47 | 9,58 |
| HP1 | Asimétrico | Positivo | 190 | 611,33 | 15,37 | 2,51 |
| | Asimétrico | Negativo | 177 | 53,7 | 5,29 | 9,85 |

[0157] Los datos mostrados en la Tabla 8 indican claramente que las alturas de los picos obtenidos usando la sonda de HP1 fue mayor que todos los demás probados obteniéndose alturas medias de pico de 611,33 nA. Junto con una media de altura de los picos negativos de 53,7, esto permitiría la 01 mayor discriminación posible entre señales positivas y negativas. Las localizaciones de los picos para condiciones asimétricas para muestras de HP1 positivas eran idénticas, y las condiciones asimétricas para muestras de HP1 negativas dieron desviación baja y coeficiente de variación estándar. El conjunto de amplificación/sonda *mgsA* permitió la discriminación y el conjunto de ampicon/sonda *rfaH* dio una buena discriminación, sin embargo esto no fue del orden visto con el conjunto HP1. Por lo tanto, el conjunto de cebador/sonda de HP1 se eligió para los propósitos de control interno. El cebador elegido hacia adelante corresponde a SEQ ID NO: 11. El cebador inverso escogido corresponde a SEQ ID NO: 12. La sonda elegida corresponde a SEQ ID NO: 14.

d) Ejemplo 7 - Verificación de exclusividad para la sonda de control interno y conjunto de cebadores

Introducción

[0158] Es esencial que el ensayo de control interno altamente específico y que ninguna reactividad cruzada sea evidente a través de otro ADN que puede estar presente en una muestra del paciente (por ejemplo, ADN humano y para el ácido nucleico a partir de organismos infecciosos.

[0159] Se ensayaron muestras de ADN derivadas de un panel de bacterias frente a los cebadores de control interno (SEQ ID NOS: 11 y 12) para la prueba de especificidad (exclusividad) usando PCR y la detección de exonucleasa de punto final de la sonda-T7, con secuencia de la sonda como en la SEQ ID NO: 14.

[0160] conjuntos de cebadores genómicos se ensayaron por duplicado con la lista de ADN como se especifica en los resultados. La salida se midió en la altura del pico de señal tras PCR, y la detección de exonucleasa de sonda-T7. La prueba se llevó a cabo en lotes con controles de PCR para cada lote probado.

Resultados de control interno

[0161] Los cebadores y las sondas dirigidas a *Pectobacterium atrosepticum* se ensayaron frente a una lista de ADN genómico. Resultados para duplicar los experimentos se presentan a continuación:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

| Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Acinetobacter genospecies 9</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Acinetobacter haemolyticus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | 202 | 26,0 |
| <i>Anaerococcus tetradius</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Arcanobacterium pyogenes</i> | ningún pico | ningún pico |
| | 202 | 30,2 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 202 | 20,3 |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Bacteroides thetaiotamicron</i> | ningún pico | ningún pico |
| | 202 | 35,3 |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Bifidobacterium breve</i> | 193 | 16,8 |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Bordetella pertussis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Citrobacter diversus</i> | 205 | 19,8 |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Citrobacter freundii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Clostridium difficile</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Corynebacterium ureaplasma</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |

(continuación)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

| Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|---------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Enterococcus dispar</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Enterococcus mundtii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Escherichia hermanii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Fingoldia magna</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | 211 | 46,0 |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Hafnia alvei</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Klebsiella o xytoca</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Lactobacillus casei</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | ningún pico | ningún pico |
| | 211 | 31,4 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Listeria innocua</i> | ningún pico | ningún pico |
| | 211 | 36,0 |
| <i>curtisii mobiluncus</i> subsp. <i>Holmesii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Mulieris mobiluncus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |

(continuación)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

| Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Moraxella osloensis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Prevotella bivia</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Proteus rettgeri</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Shigella flexneri</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Shigella sonnei</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Streptococcus anginosus</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Streptococcus australis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Streptococcus bovis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |

(continuación)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

| Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i> | 214 ningún pico | 37,9 ningún pico |
| <i>Streptococcus equinus</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Streptococcus gordonii</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Streptococcus mitis</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Streptococcus mutans</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Streptococcus oralis</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>porcinus Streptococcus</i> | ningún pico 217 | ningún pico 39,8 |
| <i>Streptococcus suis</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Streptococcus uberis</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Lactococcus lactis</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Clostridium perfringens</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Escherichia coli</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Proteus vulgaris</i> | ningún pico ningún pico | ningún pico ningún pico |
| <i>Campylobacter coli</i> | ningún pico 245 | ningún pico 24,3 |

(continuación)

| Especies | Ubicación de pico (Mili voltios) | Altura de pico (nano Amps) |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 224 | 39.2 |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| Homo sapiens | 199 | 19,6 |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Candida albicans</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 236 | 17.9 |
| | 220 | 41.9 |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | 208 | 10.9 |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 211 | 37,1 |
| | 208 | 18,1 |
| Enterococcus faecalis | 202 | 28.6 |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Chlamydia pecorum</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Chlamydia psittaci</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| <i>Candida glabrata</i> | ningún pico | ningún pico |
| | ningún pico | ningún pico |
| PCR positivo | 196.00 | 251,0 |
| | 196 | 277,0 |
| PCR negativo | ningún pico | ningún pico |
| | 202 | 29.2 |

45 Ejemplo 8 - Prueba adicional de conjunto de cebadores y sondas de amplificación cromosómico 17 contra *Chlamydia trachomatis*

[0162] Una mezcla maestra de PCR se hizo combinando los siguientes:

| Material | Volumen (µL) |
|----------------------------------|---------------|
| 10x PCR Buffer | 2,5 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5,0 |
| mezcla de dUTP | 0,5 |
| ME17 F (SEQ ID NO: 6) | 0,1 |
| ME17 R (SEQ ID NO: 7) | 0,75 |
| UDG | 0,25 |
| Taq polimerasa | 0,25 |
| Mol Biol. Grado H ₂ O | 3,15 |

65 [0163] La mezcla maestra se dividió en partes alícuotas de 12,5 µl. ADN extraído de 1000, 100, 10 y 0 C. EB de *trachomatis* se añadió en 12,5 ml volúmenes. Las muestras se incubaron a continuación para la actividad de UDG y la desnaturalización seguido por PCR como se describe a continuación:

| Paso | Temperatura (° C) | Duración |
|------|-----------------------|------------|
| 1 | 37 | 10 minutos |
| 2 | 94 | 10 minutos |
| 3 | 94 | 30 seg |
| 4 | 58 | 45 seg |
| 5 | 72 | 60 seg |
| 6 | Ir al paso 3 39 veces | |
| 7 | 72 | 7 min |

[0164] Muestras amplificadas se usaron como un objetivo para la detección en el siguiente ensayo utilizando exonucleasa 0,8 U T7 y sonda específica de 9 µM que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5 (concentraciones finales de la reacción). Cada muestra se ensayó por triplicado. La mezcla de detección estaba compuesta por la combinación de:

| Material | | |
|----------------|-------|-------|
| | 1x | 30x |
| Sonda ME17 | 1,125 | 33,75 |
| Exonucleasa T7 | 0,2 | 6,0 |

[0165] Se añadieron 1,325 µl de cada mezcla de detección a 11,175 µl de cada muestra de la amplificación por triplicado y se colocaron a 37°C durante 20 minutos antes del análisis voltamétrico sobre electrodos frescos utilizando los siguientes parámetros Autolab:

Pretratamiento: Potencial acondicionado (V): 0, Duración: 0s, Potencial de deposición: 0, Duración: 0, Tiempo de equilibrado: 0,
Medición: Célula de después de la medición: X, Tiempo de modulación (> = 0,0025): 0.04, Tiempo de intervalo (>=0,105): 0,1,
Potenciales: Inicial: -0,1, Fin: 0.5, Paso: 0,003, Amplitud de modulación: 0,04995, potencial de espera (V): 0,
Pretratamiento: Detención de equilibrado a umbral: no, Valor umbral de equilibrio (A): 0.05,
Varios: Número de exploraciones: 1.

[0166] Se registró la altura de pico y la posición del pico exacta para el pico, que se encuentra aproximadamente a 150 - 200 mV.

[0167] Los resultados se muestran en la Figura 3.

[0168] Mientras que los datos presentados en los ejemplos anteriores proporcionan evidencia de los cebadores descritos, sondas y métodos, ventajosos cuando se emplean en reacciones "singlex" porque los experimentos anteriores no implican ensayos de PCR dúplex en los que *Chlamydia trachomatis* y las reacciones de control interno se ejecutaron juntos y cada uno se sondeó con el fin de detectar ambas dianas en un solo tubo, los siguientes ejemplos adicionales se llevaron a cabo.

Ejemplo 9 - ensayo duplex 1

Resumen de método

[0169] Ambas reacciones optimizadas "singlex" detalladas anteriormente se repitieron pero con la adición del conjunto de cebadores específico para el segundo analito junto con el ADN analito diana.

Resultados

[0170] Se encontró que algo en la mezcla de reacción duplex reducía las alturas de los picos electroquímicos para la *Chlamydia* diana. Este efecto puede verse en la Figura 4 en un experimento en el que el conjunto de cebadores cromosómicos *Chlamydia* ME 17 se llevaron a cabo en presencia y ausencia del conjunto de cebadores de control interno, con y sin ADN de Control Interno 200 pg. La Figura 4 muestra claramente que la amplificación de *C. trachomatis* en la presencia del conjunto de cebadores de control interno, y no de ADN de Control Interno solo, afecta negativamente a la señal electroquímica obtenida para detecciones utilizando la sonda de *C. trachomatis*. El mismo experimento se llevó a cabo utilizando la sonda de control interno para detectar electroquímicamente amplicones de control interno. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 5.

[0171] La Figura 5 muestra una reducción dramática en la señal electroquímica de Control Interno esperado para PCRs "singlex" que contienen los cebadores de control interno y molécula diana de Control Interno cromosómico de 200 pg, donde se observan comúnmente alturas de los picos de más de 1000 nA. Estos datos fueron curiosos, dado que en otros ensayos dúplex no se observa ninguna interferencia entre el ADN cromosómico diana y el control interno. Tomados en conjunto, estos datos apuntan a que cualquiera de los *C. trachomatis* o conjuntos de cebadores de Control Interno no funcionan en un ensayo dúplex de *C. trachomatis*/Control Interno. Estos datos se confirmaron mediante la realización de un experimento usando PCR simétrica para amplificar *C. trachomatis*, con y sin el conjunto de cebadores de control interno, usando electroforesis en gel de agarosa como un método de detección. Las fotografías de gel se muestran a continuación en las figuras 6a y 6b (conjuntos de cebadores de *C. trachomatis* solos) y las Figuras 7a y 7b (conjuntos de cebadores de *C. trachomatis* y control interno).

[0172] Cuando el conjunto de cebadores de control interno está incluido en una reacción de PCR idéntica, la detección sólo es posible hasta el nivel 1.000 IFU/reacción, mostrando que el conjunto de cebadores de control interno reduce la eficiencia de amplificación de *C. trachomatis* IFUs por tres registros (como se determina por electroforesis en gel).

[0173] Otro experimento de PCR simétrica, con amplicones detectados usando electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo para refinar lo anterior para determinar cuál de los cebadores de control interno se interfería con la detección de *C. trachomatis*. Este experimento demostró que cuando *C. trachomatis* se amplificó en presencia del cebador directo de control interno, se observó un producto amplificado de peso molecular correcto hasta el 10 *C. trachomatis* IFU/nivel de reacción. Sin embargo, cuando se incluyó el cebador inverso de Control Interno en una amplificación de *C. trachomatis*, el límite de detección de la amplificación de *C. trachomatis* se aumentó a 10.000 IFU/reacción. La fotografía de gel también sugirió que un fuerte dímero de cebador se formaba en condiciones de PCR usando el conjunto de cebadores de *C. trachomatis* en combinación con el cebador inverso de control interno, como se indica por una banda de bajo peso molecular de espesor en el gel.

[0174] Los análisis bioinformáticos del cebador inverso de Control Interno y los cebadores de avance e inversos de *C. trachomatis* mostraron que las cinco bases terminales de los extremos 3' de tanto el cebador directo de Control Interno como cebador inverso de *C. trachomatis* eran complementarias, comprendiendo los dímeros de cebadores observadas en el gel de agarosa, y también el rendimiento malo en amplificaciones dúplex. La similitud de secuencia se muestra a continuación.

```

5' - TTCCAGAGGCAATGCCAAAG-3' - C. trachomatis rv
      : : : : :
      3' - GTTTCCTAAGGGTCAAGTCC-5' - IC fw
  
```

[0175] La similitud de secuencia es la hipótesis de tener en cuenta la pobre amplificación y detección de *C. trachomatis* en las reacciones de dúplex que contienen el cebador inverso de control interno debido a la formación de dímeros de cebadores durante el ciclo térmico.

[0176] La decisión fue tomada para diseñar cebadores sin rediseñar un cebador para eliminar la homología 3'. Se decidió volver a diseñar el cebador inverso de *C. trachomatis* debido a los conjuntos de cebadores de control interno que trabajan bien en ensayos dúplex existentes utilizando otras dianas de ADN. Los cebadores de avance de *C. trachomatis* tuvieron que ser modificados posteriormente a la T_m del cebador inverso creciente debido a sus bases añadidas. Los nuevos cebadores de avance e inverso de *C. trachomatis* tenían las secuencias siguientes:

Nuevo cebador de avance: CT: 5'-caaacctcac tagtcagcat caagctagg-3' (SEQ ID NO: 17)
 Nuevo cebador inverso: 5'-agattccaga ggcaatgcca aagaaa-3' (SEQ ID NO: 19)

[0177] Los siete pares de bases adicionales que se agregaron en el extremo 5' del cebador directo CT estaban destinados a ser un extremo 5' de la secuencia a la hebra de ADN de *C. trachomatis* cromosómico para el que fue diseñado el cebador. Sin embargo, un error en el diseño del cebador significa que estas siete bases adicionales eran de hecho complementarias a lo que se pretendía para la inclusión. Sin embargo, esto parece haber logrado el objetivo de acercar la T_m s de cada cebador más cerca entre sí, conservando al mismo tiempo el rendimiento observado previamente con el "viejo" cebador directo de *C. trachomatis* (SEQ ID NO: 6).

[0178] Aunque estas siete bases no complementarias se añadieron erróneamente al extremo 5' del cebador hacia adelante en lugar de siete bases complementarias, la experimentación procedió con la prueba del nuevo conjunto de cebadores de *C. trachomatis* en una reacción de dúplex con el ADN de Control Interno y cebadores de avance e inversos. Inicialmente, la compatibilidad de cebador se comprobó utilizando PCR simétrica, el análisis de los amplicones generados usando electroforesis en gel de agarosa. Este experimento mostró, sorprendentemente, que los nuevos cebadores de avance e inversos de *C. trachomatis* dieron un límite de detección de 1 IFU, equivalente al observado en las Figuras 6a/b. Cuando se añadieron los cebadores de control interno a esta mezcla de reacción, se

aumentó el límite de detección mediante electroforesis ligeramente a 10 IFUs (en experimentos electroquímicos, se ha demostrado para detectar 1 IFU); una mejora en la que se observa en las Figuras 7a/b. Un experimento adicional probó la capacidad de los nuevos conjuntos de cebadores de *C. trachomatis* y control interno para amplificar asimétricamente los dos ADN cromosómicos dianas utilizando una reacción duplex, seguido de la detección electroquímica. Estos datos se muestran en la Figura 8.

[0179] Los datos mostrados en la Figura 8 demuestran que el conjunto de cebadores modificado de *C. trachomatis*, cuando se combina con el conjunto de cebadores de control interno existente, permite co-amplificación y detección electroquímica de estas dianas utilizando duplex PCR.

Ejemplo 10 - Ensayo duplex 2

[0180] Los experimentos adicionales se llevaron a cabo para evaluar el rendimiento de un cebador directo alargado de *C. trachomatis* que es totalmente complementario a ADN diana (SEQ ID NO: 18).

Resultados

[0181] Cuando se utiliza en una reacción de PCR con el cebador inverso SEQ ID NO: 19 y la sonda SEQ ID NO: 5 se realizó por dúplex con el control interno preferido, se encontró que el cebador directo SEQ ID NO: 18 funcionaba, así como el cebador de avance SEQ ID NO: 17. La Figura 9 muestra un conjunto comparativo de experimentos de dúplex utilizando 3 mezclas maestras de PCR. "CT" indica el valor de *C. trachomatis*, "IC" indica el valor de control interno "IFU"= unidades de infección.

[0182] Las reacciones de control interno utilizaron cebadores SEQ ID NO: 11 y 12 y la sonda SEQ ID NO: 14.

Mezcla maestra A utilizó cebadores SEQ ID NOS; 6 y 7 y la sonda SEQ ID NO: 5 para la reacción de *C. trachomatis* y muestra un límite de detección entre 10.000 y 1.000 IFU.

Mezcla maestra B utilizó cebadores SEQ ID NOS: 17 y 19 y la sonda SEQ ID NO: 5 para las reacciones *C. trachomatis* y muestra un límite de detección entre 10 IFU y 1 IFU.

Mezcla maestra C utilizó cebadores SEQ ID NOS: 18 y 19 y la sonda SEQ ID NO: 5 para las reacciones *C. trachomatis* y muestra un límite de detección de 10 a 1 IFU.

[0183] Los datos presentados en los Ejemplos 9 y 10 demuestran que las reacciones de amplificación de ácido nucleico usando cebadores directos de *C. trachomatis* SEQ ID NOS: 17 y 18 y el cebador inverso SEQ ID NO: 19 son especialmente adecuados para su uso con el ácido nucleico de control interno y la amplificación de la invención en las reacciones de dúplex. El buen comportamiento de cebadores que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 17 es especialmente sorprendente, dado que su secuencia es incompletamente complementaria a su diana.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0184]

<110> Atlas Genética Limited

<120> Microbial Ensayo

<130> 14308 Wo

<160> 21

<170> versión PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 252

<212> ADN

<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 1

ES 2 642 804 T3

| | | |
|----|--------------------------------------------------------------------|-----|
| | atgaattcaa atatagaata taggcaatat cgtatagata tactgagctg ttttatctgc | 60 |
| 5 | ttgctaataga tggtttggac actagtcagc atcaagctag gagattctct aggaggcatc | 120 |
| | attcctggat gcttaggata cttactggct aaaaggaagc atcgccgtcc tgtccgctgg | 180 |
| | ttcttcctta cttttttctt tggcattgcc tctggaatct tccttgctgt tcttcacct | 240 |
| 10 | aagcaaaagt aa | 252 |
| | <210> 2 | |
| | <211> 32 | |
| 15 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador PCR | |
| 20 | <400> 2 | |
| | ttggacacta gtcagcatca agctaggaga tt 32 | |
| | <210> 3 | |
| | <211> 30 | |
| 25 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador PCR | |
| 30 | <400> 3 | |
| | gaagattcca caaagaaaa gaggcaatgc 30 | |
| | <210> 4 | |
| 35 | <211> 33 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 40 | <223> sonda de detección | |
| | <400> 4 | |
| | cgctctgtc cgctggttct tcctacttt ttt 33 | |
| 45 | <210> 5 | |
| | <211> 23 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 50 | <220> | |
| | <223> sonda de detección | |
| | <400> 5 | |
| 55 | ctgtccgctg acto gttcttcctt 23 | |
| | <210> 6 | |
| | <211> 22 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 60 | <220> | |
| | <223> cebador de PCR | |
| | <400> 6 | |
| 65 | cactagtcag catcaagcta gg 22 | |

ES 2 642 804 T3

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 7
 10 ttccagagc aatgccaag 20
 <210> 8
 <211> 387
 <212> ADN
 15 <213> Pectobacterium atrosepticum
 <400> 8
 20
 ctaccgtgta gggtcatagg cattgacctc atggctccac ggaatcgtgc gatcgtcaac 60
 tgcgacgtgc cattcacagt gcgtaagagc accgcgaatc tcggataaac actggcacca 120
 25 gtgctgtacg ccaatccaga ttgcttcttc ctcgctgtcg ggaagtttg ttgaaccgga 180
 gagcacgatc cctttcctaa agacgttacc gattttcaca ttgagggcga aatcaaagga 240
 ttcccagttc aggcctgtac ccgtcgtcag atattttctca atttggtcat taacagaatg 300
 30 gcggttgacg atctccttca cggcagatat ctctttctgg ctcagggatt ttttacgtcg 360
 agcgggtgtaa tagagcgaaa ttgccac 387
 35 <210> 9
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 9
 45 ctcgctgtcg ggaagtttg ttgaaccg 28
 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 10
 55 acaggcctga actgggaatc ctttgatttc 30
 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 65 <400> 11
 tgtcgggaag tttggtg 18

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador de PCR

 10 <400> 12
 cctgaactgg gaatccttg 20

 <210> 13
 <211> 33
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> sonda de detección
 20
 <400> 13
 ggagagcacg atcccttcc taaagacgtt acc 33

 <210> 14
 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> sonda de detección

 <400> 14
 gcacgatccc ttcctaaag ACG 23

 35 <210> 15
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> cebador de PCR

 <400> 15
 45 tgatgswwww swcactagtc agcatcaagc taggagatt 39

 <210> 16
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> cebador de PCR

 <400> 16
 55 aaggaagatt ccagaggcaa tgccaaagaa aaaagt 36

 <210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador de PCR

 65 <400> 17
 caaacctcac tagtcagcat caagctagg 29

ES 2 642 804 T3

<210> 18
<211> 29
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

10 <400> 18
gtttgacac tagtcagcat caagctagg 29

<210> 19
<211> 26
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

20 <400> 19
agattccaga ggcaatgcca aagaaa 26

<210> 20
25 <211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
30 <223> cebador de PCR

<400> 20
tgatgcaaac ctactagtc agcatcaagc taggagatt 39

35 <210> 21
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> cebador de PCR

<400> 21
45 tgatggttg gacactagtc agcatcaagc taggagatt 39

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un método para detectar material genético de muestra clínica que se deriva de *Chlamydia trachomatis* que comprende la detección específica de secuencia de una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico al menos 15 residuos de nucleótidos contiguos contenidos en la SEQ ID NO: 1 o su complemento.
- 10 **2.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicha detección específica de la secuencia comprende llevar a cabo una etapa de hibridación de ácido nucleico, opcionalmente seguida de una etapa para la detección de la hibridación de ácido nucleico por ejemplo, utilizando una sonda marcada.
- 15 **3.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende la hibridación del material genético que se deriva de *Chlamydia trachomatis* a una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos 15 residuos de nucleótidos contiguos contenidos en la SEQ ID NO: 4
- SEQ ID NO: 4: ccgtcctgtc cgctggttct tccttacttt ttt
o su complemento; por ejemplo:
- 20 que comprende la hibridación del material genético que se deriva de *Chlamydia trachomatis* a una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia en la SEQ ID NO: 5
- SEQ ID NO: 5: ctgtccgctg gttcttctt act
o su complemento.
- 25 **4.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende la hibridación del material genético que se deriva de *Chlamydia trachomatis* a una sonda de ácido nucleico que comprende al menos 10 residuos de nucleótidos contiguos contenidos en la SEQ ID NO: 4
- 30 SEQ ID NO: 4: ccgtcctgtc cgctggttct tccttacttt ttt
o su complemento; en el que dicha sonda de ácido nucleico comprende un resto de unión al surco menor o en el que dicha sonda de ácido nucleico es un ácido nucleico de bloqueo (LNA).
- 35 **5.** Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho método de detección específica de secuencia sigue amplificación del ácido nucleico a detectar usando la reacción en cadena de la polimerasa, amplificación mediada por la transcripción, secuencia de ácido nucleico de amplificación basado en (NASBA), amplificación dependiente de helicasa, amplificación de recombinasa polimerasa, amplificación por desplazamiento de hebra o la amplificación isotérmica mediada por bucle; preferiblemente, en el que dicho método de detección de secuencia específica comprende una reacción en cadena de la polimerasa.
- 40 **6.** Un método como se reivindica en la reivindicación 5, en el que dicho método de detección específica de la secuencia comprende una reacción en cadena de la polimerasa que implica el uso de un cebador directo PCR y un cebador de PCR inversa, y donde:
- 45 a) dicho cebador de PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 17 y 34 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 15: tgatg-g/c-t/a-t/a-t/a-g/c-g/c-a/t-cactagtc agcatcaagc taggagatt;
- 50 y
- b) dicho cebador de PCR inversa comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 31 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 16: aaggaagatt ccagaggcaa tgccaaagaa aaaagt;
- 55 o en el que dicho cebador de PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador inverso como se define en la parte b) anterior y dicho cebador inverso PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador directo tal como se define en la parte a) anterior,
- 60 por ejemplo: en el que dicho cebador de PCR comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 6.
- SEQ ID NO: 6: cactagtcag catcaagcta gg;
SEQ ID NO: 17: caaacctcac tagtcagcat caagctagg;
65 SEQ ID NO: 18: gttggacac tagtcagcat caagctagg

y en el que dicho cebador de PCR inversa comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 7

5 SEQ ID NO: 7: ttccagaggc aatgccaag;
SEQ ID NO: 19: agattccaga aagaaa ggcaatgccca.

7. Un método como se reivindica en la reivindicación 5, en el que dicho método de detección específica de la secuencia comprende una reacción en cadena de la polimerasa que implica el uso de un cebador directo PCR y un cebador de PCR inversa, y donde:

10 a) dicho cebador de PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 12 y 29 o 19 y 29 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 15: TGATG-g/ct/at/at/ag/cg/ca/t-cactagtc agcatcaagc taggagatt;

15 y

b) dicho cebador inverso PCR que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 16 y 26 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 16: aaggaagatt ccagaggcaa tgccaagaa aaaagt;

20 en el que dicho cebador de PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador inverso como se define en la parte b) anterior y dicho cebador inverso PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador directo tal como se define en la parte a) anterior; y en el que dichos cebadores comprenden un resto de unión al surco menor o en donde dichos cebadores son ácidos nucleicos de bloqueo (LNA),

25 **8.** Un método como se reivindica en la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que dicho método de detección específica de la secuencia comprende una reacción en cadena de la polimerasa que implica el uso de una sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico entre 18 y 28 residuos de ácido nucleico contiguos dados en SEQ ID NO: 4

SEQ ID NO: 4: ccgtcctgtc cgctggttct tcctacttt ttt

35 o su complemento, por ejemplo en el que dicha sonda de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO: 5: ctgtccgctg gttcttcctt act.

40 **9.** Un cebador de avance de PCR que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 17 y 34 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 15;

SEQ ID NO: 15: TGATG-g/ct/at/at/ag/cg/ca/t-cactagtc agcatcaagc taggagatt;

45 por ejemplo que comprende el ácido nucleico dado en SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 6

SEQ ID NO: 6: cactagtcag catcaagcta gg;
SEQ ID NO: 17: caaacctcac tagtcagcat caagctagg
SEQ ID NO: 18: gtttggacac tagtcagcat caagctagg

50 **10.** Un cebador de PCR inversa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 31 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 16

SEQ ID NO: 16: aaggaagatt ccagaggcaa tgccaagaa aaaagt;

55 por ejemplo que comprende la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 7

SEQ ID NO: 7: ttccagaggc aatgccaag.
SEQ ID NO: 19: agattccaga aagaaa ggcaatgccca.

60 **11.** Una sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico entre 18 y 28 residuos de ácido nucleico contiguos dados en SEQ ID NO: 4

SEQ ID NO: 4: ccgtcctgtc cgctggttct tcctacttt ttt

65 o su complemento; por ejemplo que comprende la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO: 5: ctgtccgctg gttcttcctt act.

12. Un cebador de avance de PCR que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 19 y 29 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 15:

SEQ ID NO: 15: tgatg-g/c-t/a-t/a-t/a-g/c-g/c-a/t-cactagtc agcatcaagc taggagatt;

un cebador de PCR inversa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 16 y 26 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 16: aaggaagatt ccagaggcaa tgccaagaa aaaagt;

una sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, que comprende la secuencia de ácido nucleico de entre 13 y 23 residuos de ácido nucleico contiguas dada en SEQ ID NO: 4

SEQ ID NO: 4: ccgtcctgtc cgctgggtct tcctactttt ttt

o su complemento;

y en el que dicho cebador de PCR, dicho cebador inverso PCR y/o dicha sonda de ácido nucleico comprenden un resto de unión al surco menor o en el que dicho cebador de PCR, dicho cebador inverso PCR y/o dicha sonda de ácido nucleico son ácidos nucleicos de bloqueo (LNA).

13. Un cebador de avance de PCR como se reivindica en la reivindicación 9 o la reivindicación 12, un cebador de PCR inversa como se reivindica en la reivindicación 10 o la reivindicación 12 o una sonda de ácido nucleico tal como se reivindica en la reivindicación 11 o la reivindicación 12, conjugado con una etiqueta electroquímicamente activa.

14. Una composición de avance y cebador inverso de PCR que comprende un cebador de avance de PCR como se define en la reivindicación 9 o la reivindicación 12 y un cebador de PCR inversa como se define en la reivindicación 10 o la reivindicación 12, que comprende opcionalmente además una sonda de ácido nucleico tal como se reivindica en la reivindicación 11 o la reivindicación 12.

15. Una composición de cebador de avance e inverso de PCR como se reivindica en la reivindicación 14, que comprende además ADN genómico derivado de *Pectobacterium atrosepticum* (por ejemplo la cepa ATCC BAA-672) para su uso como un control positivo interno.

16. Una composición de cebador de avance e inversa de PCR como se reivindica en la reivindicación 14 o la reivindicación 15, que comprende además un segundo cebador de PCR y un segundo cebador inverso de PCR, en el que dichos cebadores se diseñan para hibridarse con una secuencia de ácido nucleico diana que se encuentra dentro de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8 o su complemento; por ejemplo, en donde:

a) dicho segundo cebador de PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 13 y 23 residuos contiguos de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 9: ctcgctgtcg ggaagttgg ttgaaccg;

y

b) dicho segundo cebador inverso PCR que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 15 y 25 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados entre SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 10: acaggcctga actgggaatc cttgatttc;

o en el que dicho segundo cebador de PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador inverso tal como se define en la parte b) anterior y dicho segundo cebador inverso PCR comprende una secuencia de ácido nucleico que es el complemento del cebador directo tal como se define en parte a) anterior; tal como en el que dicho segundo cebador de PCR comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 11

SEQ ID NO: 11: tgtcggaag tttggttg

y en donde dicho segundo cebador inverso PCR comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 12

SEQ ID NO: 12: gaatccttg cctgaactgg

17. Una composición de cebador de avance e inverso de PCR como se reivindica en la reivindicación 16 en el que al menos uno de dichos cebadores es:

a) un segundo cebador de PCR directa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 8 y 18 residuos contiguos de nucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 9;

5 SEQ ID NO: 9: ctcgctgtcg ggaagttgg tgaaccg;

y

10 b) un segundo cebador de PCR inversa que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende entre 10 y 20 residuos de nucleótidos contiguos seleccionados de SEQ ID NO: 10,
SEQ ID NO: 10: acaggcctga actgggaatc ctttgattc;

en el que dichos cebadores comprenden un resto de unión al surco menor o en donde dichos cebadores son ácidos nucleicos de bloqueo (LNA).

15 **18.** Una composición de cebador de avance e inverso de PCR como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, que comprende además

20 YA SEA

una segunda sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico entre 18 y 28 residuos de ácido nucleico contiguos dados en SEQ ID NO: 13

25 SEQ ID NO: 13: ggagagcacg atccctttcc taaagacgtt acc

o su complemento;

30 por ejemplo, en el que dicha sonda de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico dada en SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 14: gcacgatccc tttcctaaag acg

O

35 una segunda sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico entre 13 y 23 residuos de ácido nucleico contiguos dados en SEQ ID NO: 13

40 SEQ ID NO: 13: ggagagcacg atccctttcc taaagacgtt acc

o su complemento; en el que dicha sonda de ácido nucleico comprende un resto de unión de surco menor o dicha sonda de ácido nucleico es un ácido nucleico de bloqueo

45 **19.** Un kit comprendiendo una composición de cebador de avance e inverso de PCR, como se ha reivindicado en las reivindicaciones 14 a 18, e instrucciones para llevar a cabo un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7.

50 **20.** Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además la detección de un control positivo interno que comprende material genético que se deriva de *Pectobacterium atrosepticum* que comprende la detección específica de secuencia de una secuencia de ácido nucleico contenida en el cromosoma de *Pectobacterium atrosepticum*.

55

60

65

Figura 1a - Amplicon de plásmido 3 límite de detección (LOD)

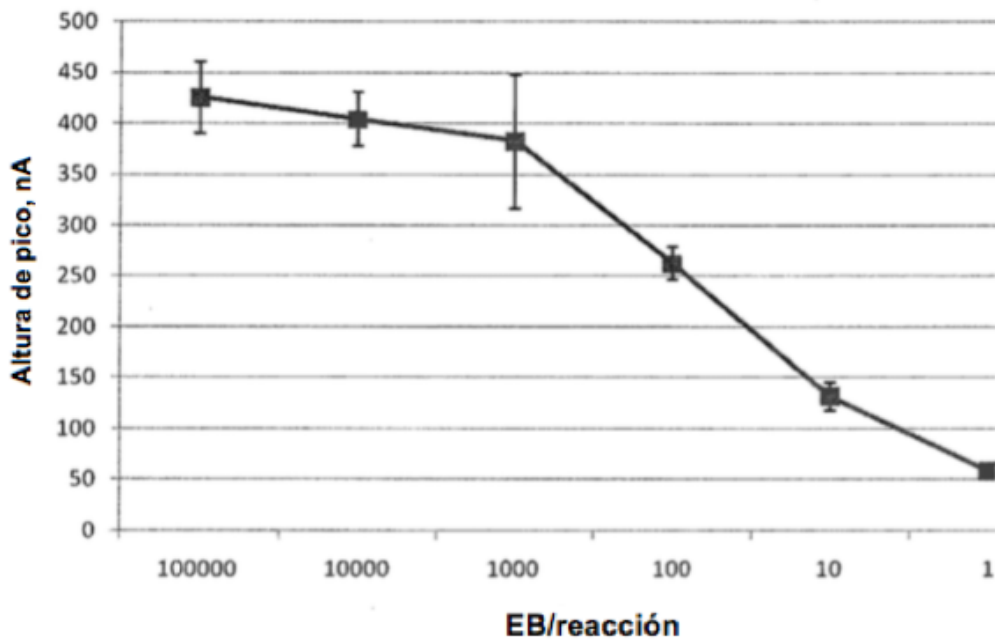


Figura 1b - Amplicon de plásmido 5 LOD

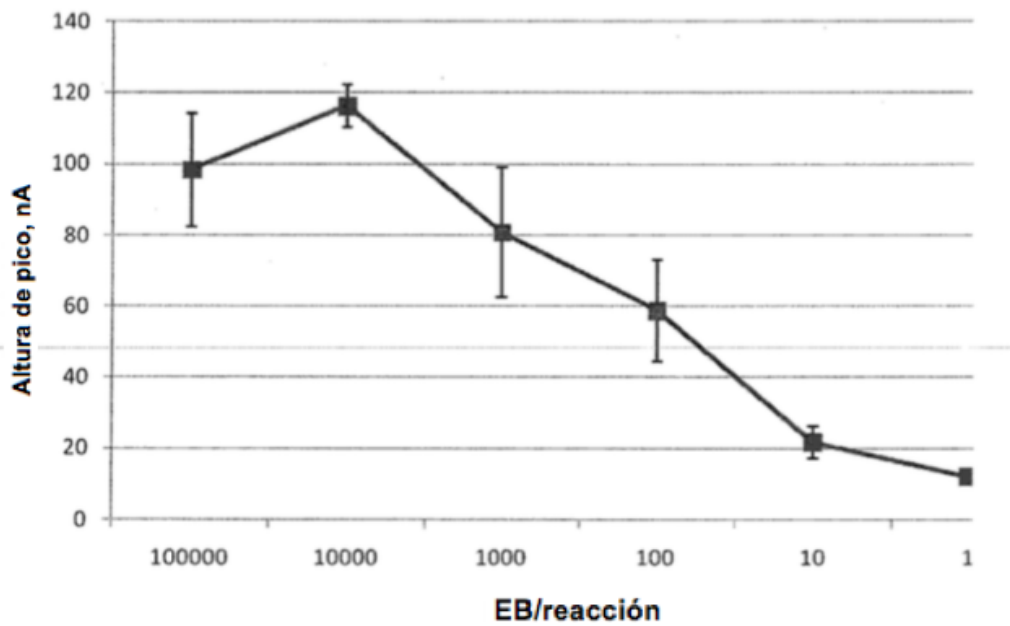


Figura 1c - amplicon de plásmido 7 LOD

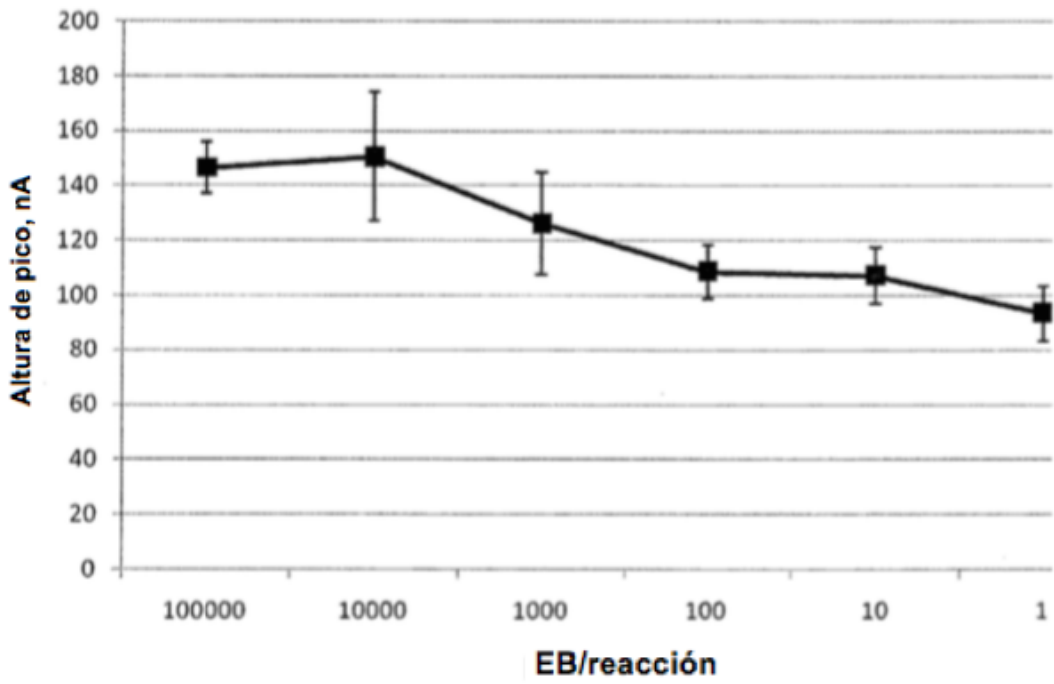


Figura 2a - amplicon cromosomal 9 límite de detección (LOD)

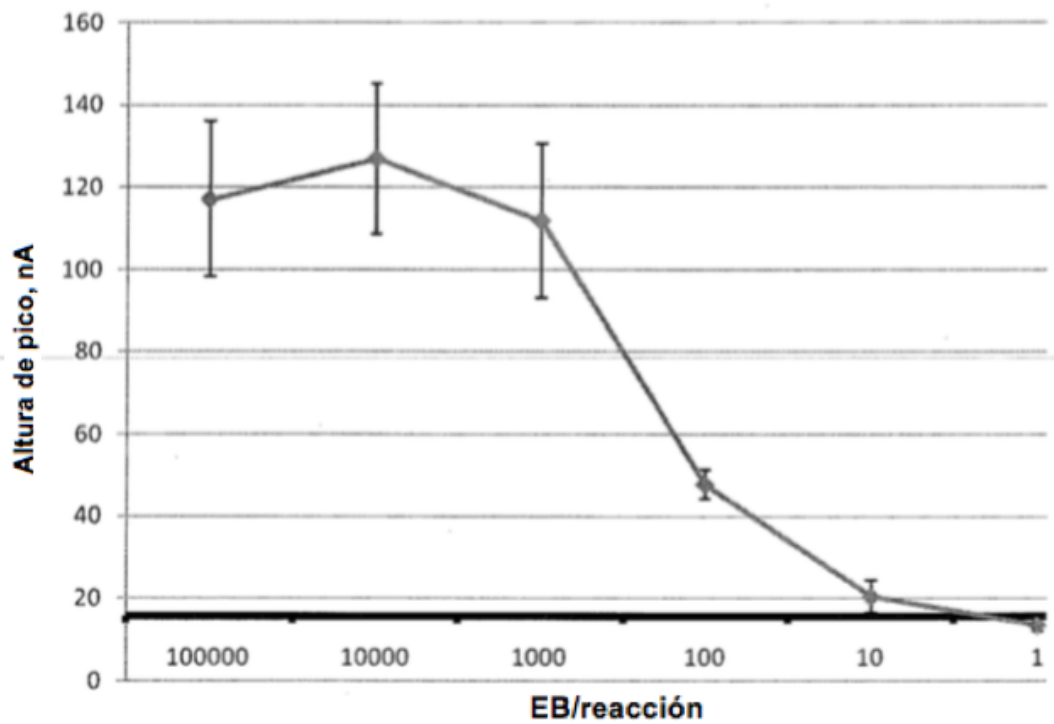


Figura 2b - Amplicon cromosomal 17 LOD

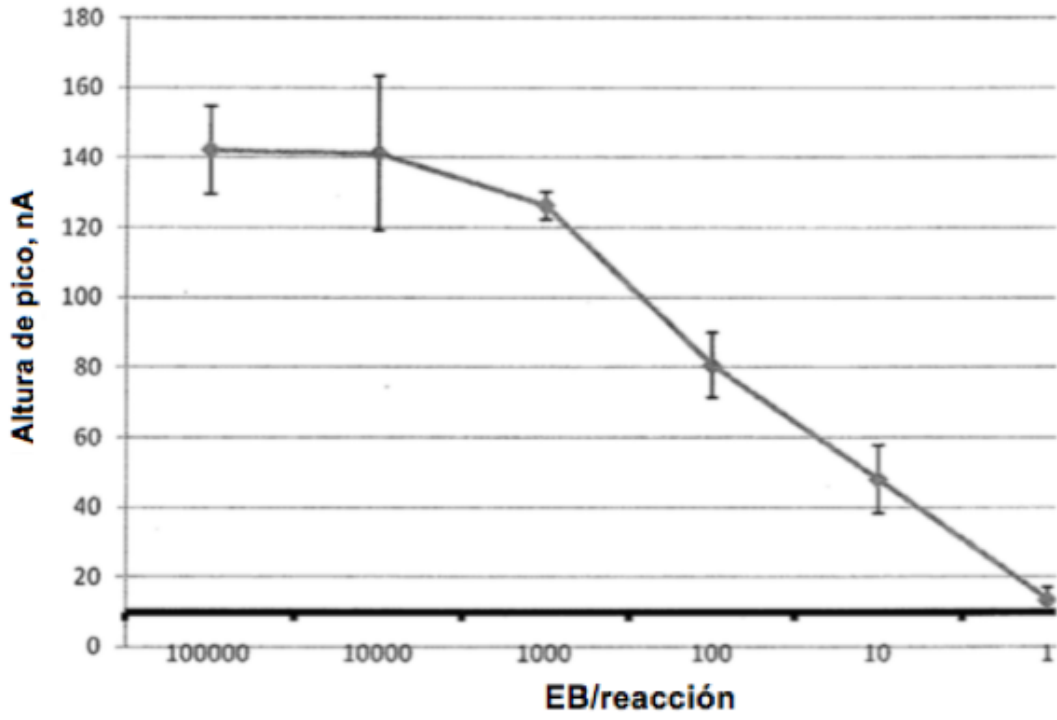


Figura 2c - Amplicon cromosomal 18 LOD

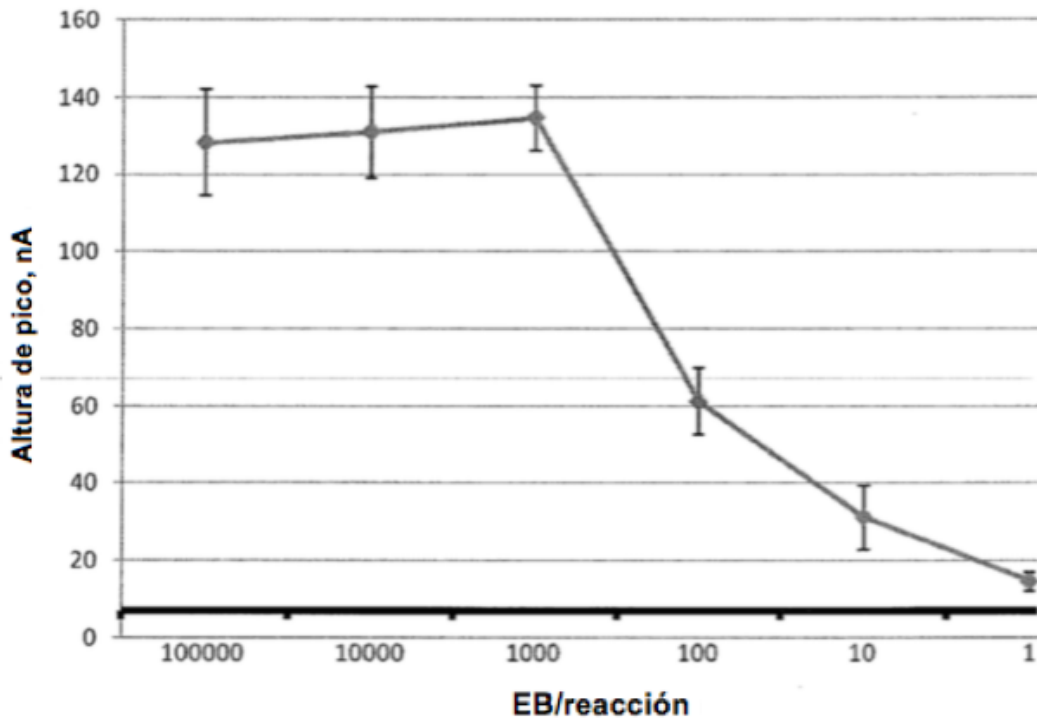


Figura 2d - Amplicon cromosomal 17 LOD con el uso de una concentración final de 5,0 mM de $MgCl_2$

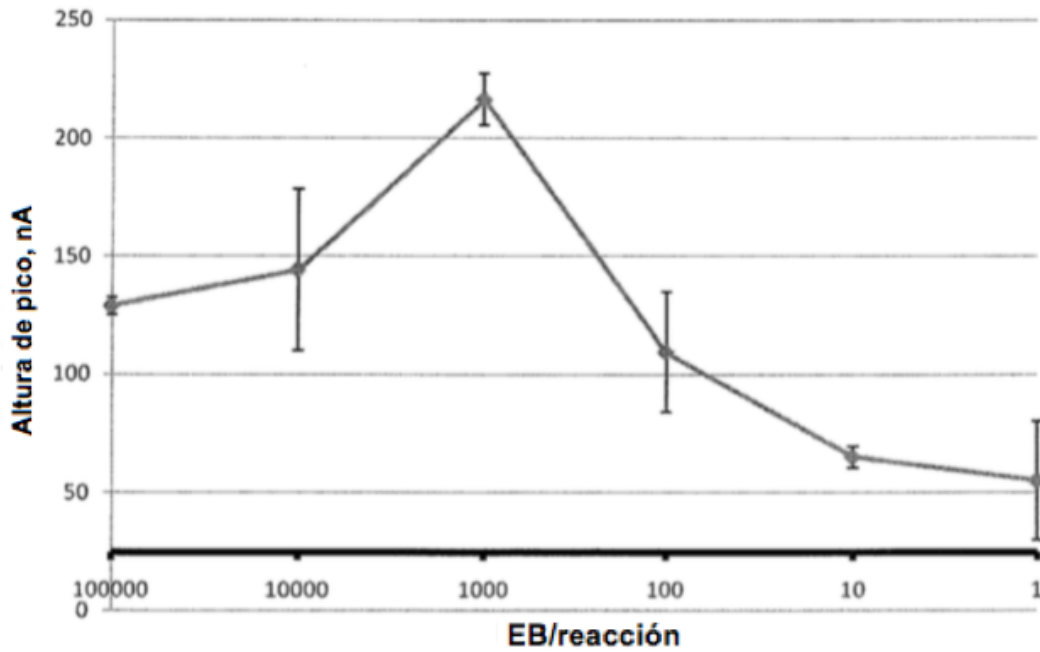


Figura 3 - Amplicon cromosomal 17 LoD con el uso de una concentración final de 5,0 mM $MgCl_2$

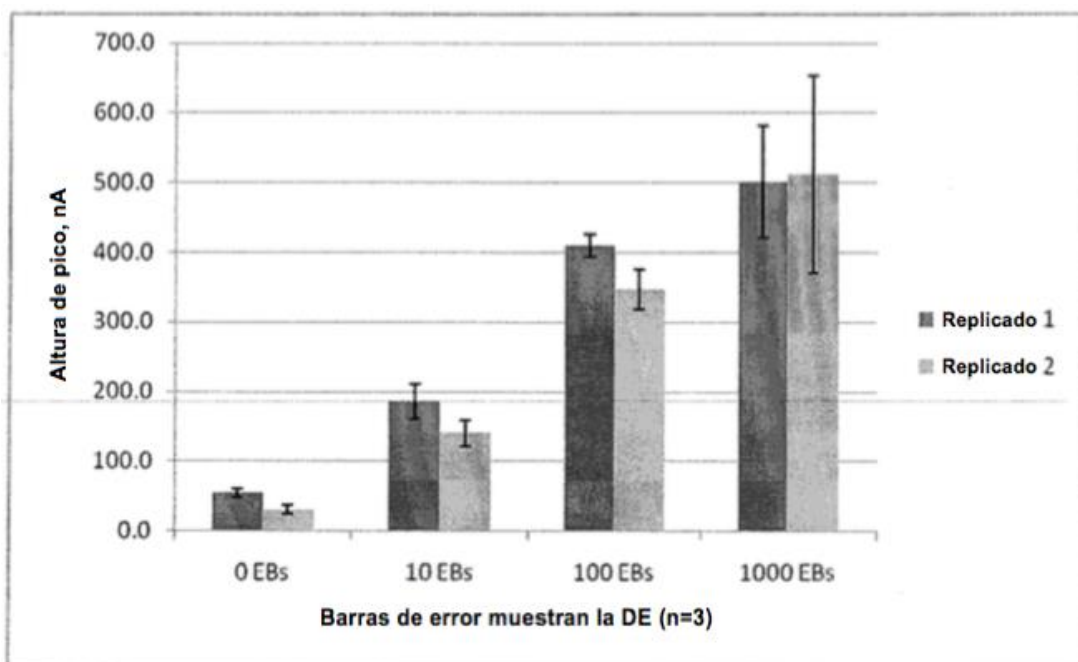


Figura 4

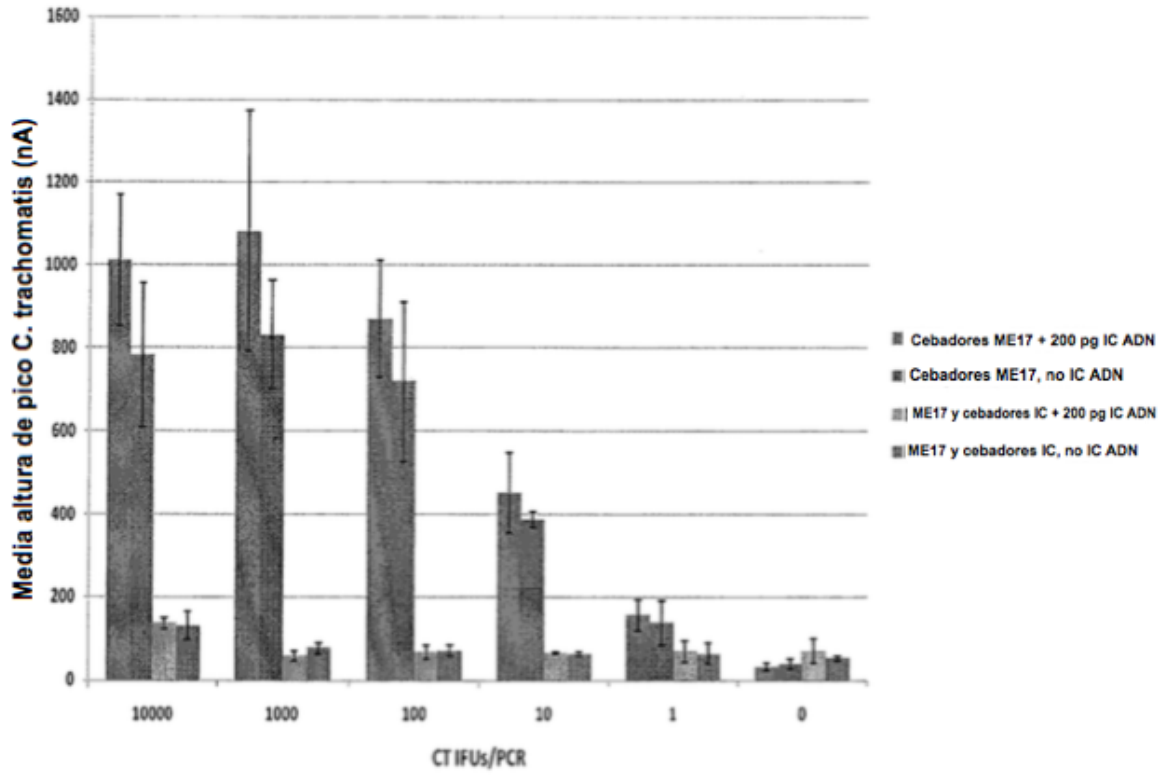


Figura 5

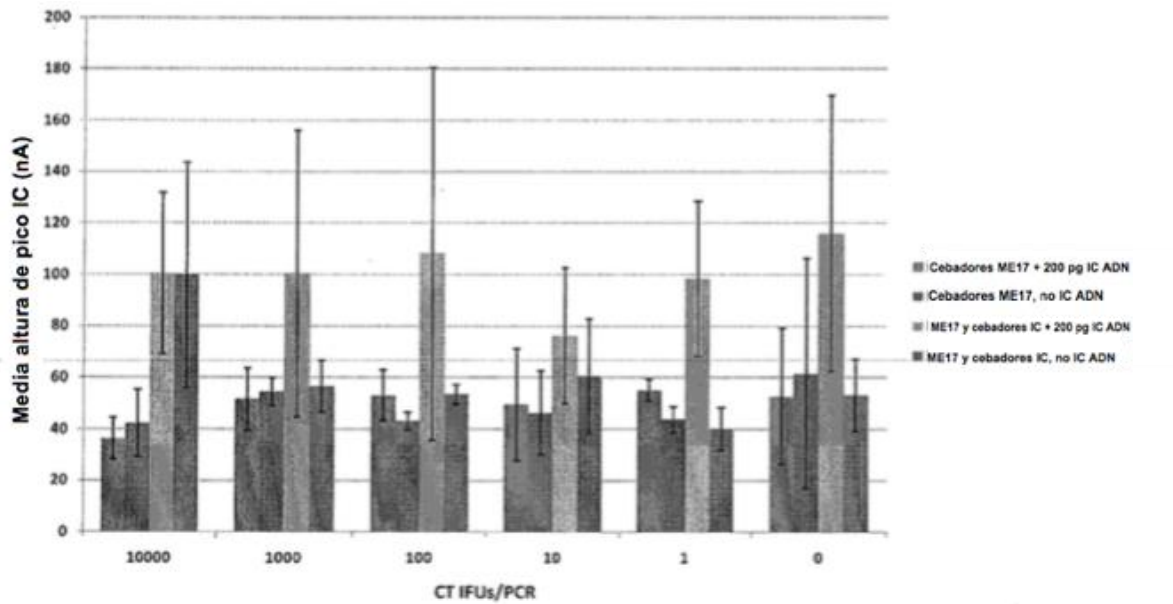


Figura 6a

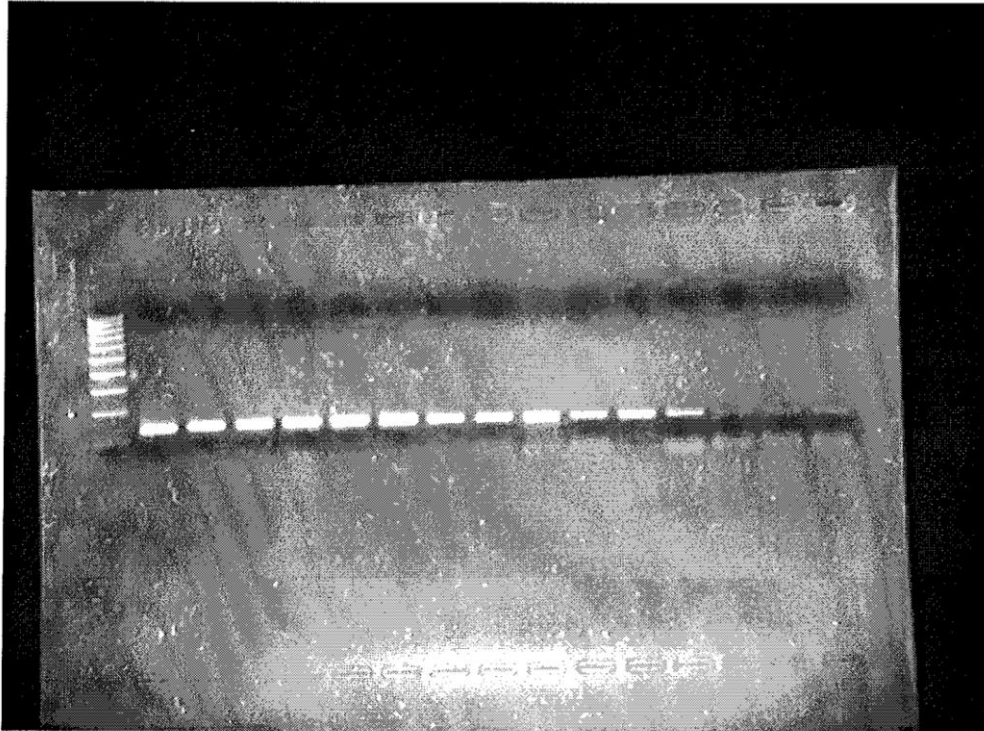


Figura 6b

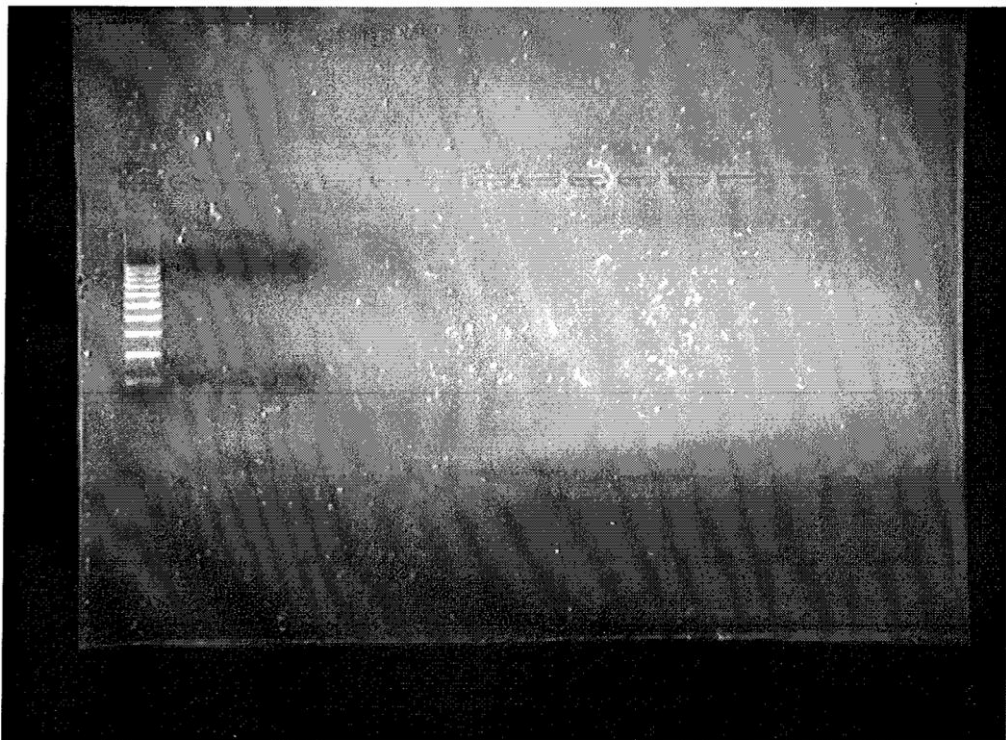


Figura 7a

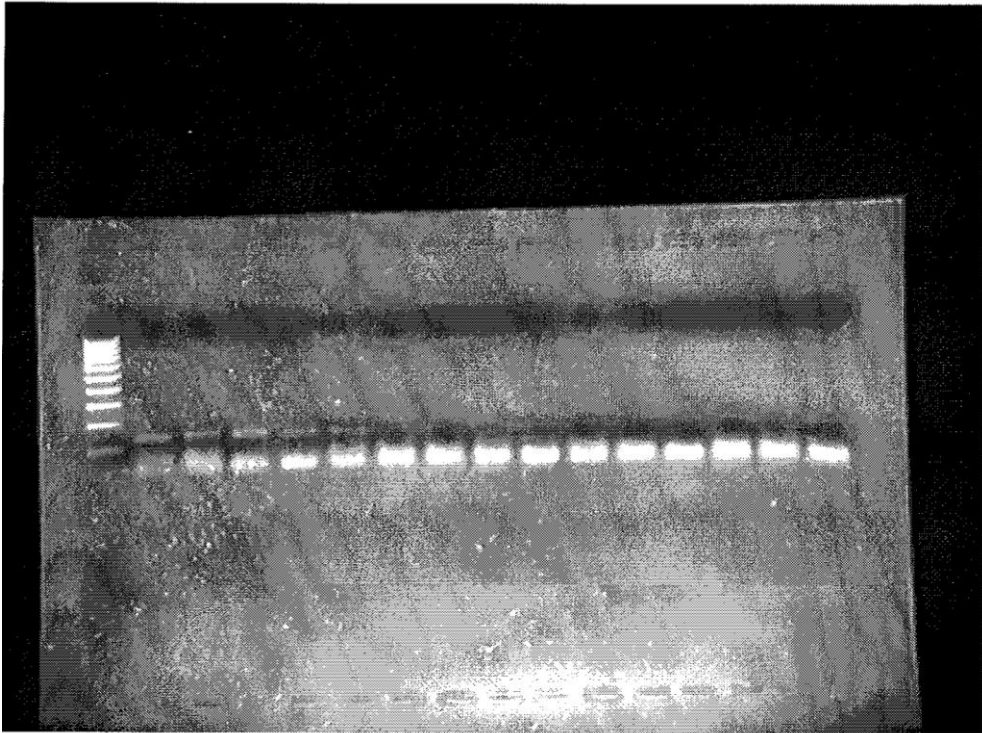


Figura 7b

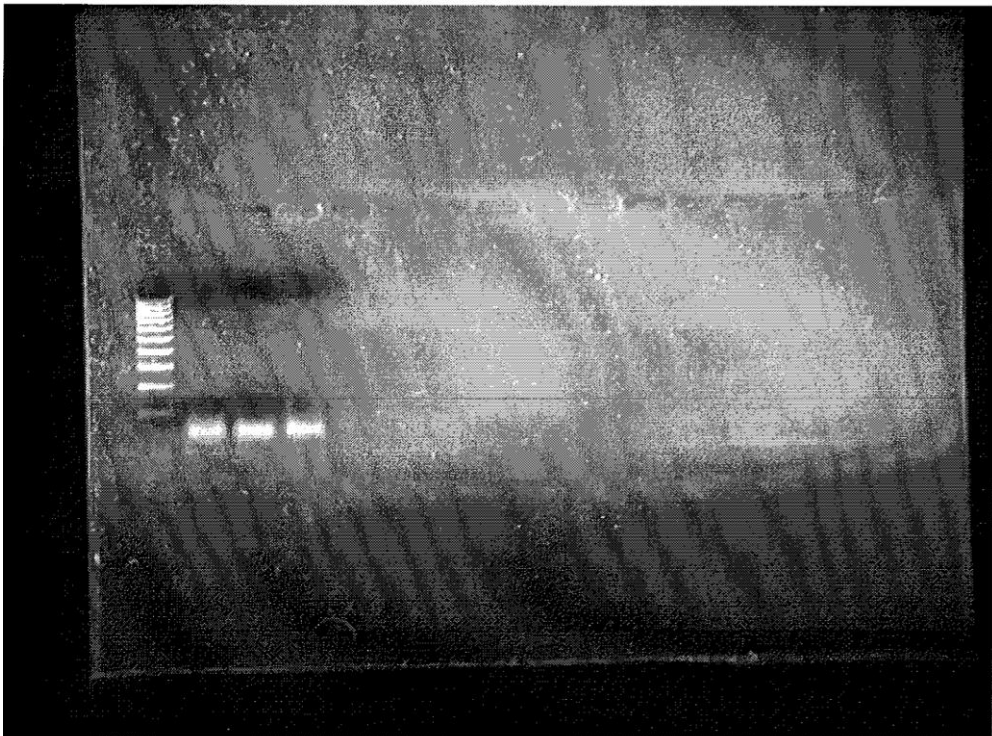


Figura 8 - Detecciones electroquímicas de muestras amplificadas en dúplex utilizando los nuevos conjuntos de cebador de *C. trachomatis* y control interno. Doscientos picogramos de ADN de control interno se añadió en todos los casos. Barras de error muestra la DE (n=3).

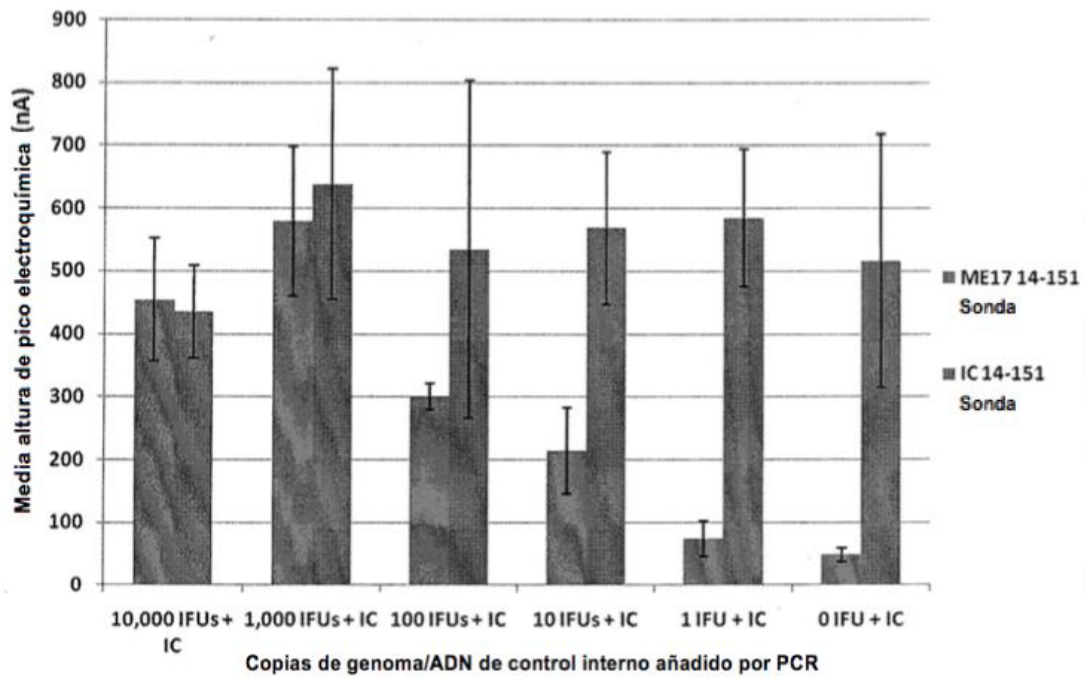


Figura 9

