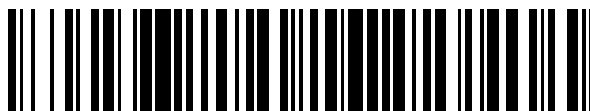


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 145**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2008 E 12166580 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2514838**

54 Título: **Secuencia de cebador y sonda para detectar Chlamydia trachomatis**

30 Prioridad:

**13.04.2007 US 911684 P**

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

**14.03.2018**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)  
1300 East Touhy Avenue  
Des Plaines, IL 60018 , US**

72 Inventor/es:

**HO, SHIAOLAN y  
MARSHALL, RONALD**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 659 145 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Secuencias de cebador y sonda para detectar *Chlamydia trachomatis*

5 **Campo de la invención**

La invención está dirigida a composiciones y a procedimientos para la detección de plásmidos de *Chlamydia trachomatis*. Incluida una variante de delección observada recientemente en sujetos en Suecia.

10 **Antecedentes de la invención**

*Chlamydia trachomatis* (C. trachomatis o CT) es un agente causante de enfermedades de transmisión sexual habituales, incluidos linfogranuloma venéreo, varias enfermedades inflamatorias de los sistemas urogenitales del hombre y la mujer, y tracoma, una enfermedad crónica que afecta a 500 millones de personas y que puede producir ceguera. Cuando no se diagnostica a tiempo y se trata, la uretritis y la cervicitis inducida por CT pueden llevar a inflamaciones crónicas, por ejemplo, vaginitis, salpingitis e inflamación pélvica, que pueden tener como resultado esterilidad y embarazo extrauterino. Además, los recién nacidos de madres infectadas pueden contraer infecciones pulmonares y/u oculares durante el parto.

20 **Las Clamidias**

Chlamydiae son procariontes que exhiben similitudes morfológicas y estructurales con las bacterias gramnegativas, incluida una membrana externa trilaminar que contiene lipopolisacárido y varias proteínas de membrana. *Chlamydiae* difiere de otras bacterias en su morfología y en que tiene un ciclo de desarrollo único. Parásitos intracelulares obligados, *Chlamydiae* tiene un ciclo de vida bifásico único que consiste en una etapa extracelular metabólicamente inactiva pero infecciosa y una etapa intracelular replicante pero no infecciosa. La etapa de replicación del ciclo de vida tiene lugar dentro de una inclusión unida a la membrana que secuestra las bacterias y las aleja del citoplasma de la célula huésped infectada.

30 Se han aislado muchas cepas diferentes de *Chlamydiae* de mamíferos (incluido el ser humano) y aves. Las cepas se pueden distinguir en base a la gama de huéspedes, la virulencia, la patogenia y la composición antigénica. Existe una fuerte identidad de secuencia del ADN dentro de cada especie, pero, sorprendentemente poco entre especies, lo que sugiere una separación prolongada en la evolución.

35 En casi todos los aislamientos de CT se encuentra un plásmido críptico (ADN extracromosómico) de aproximadamente 7501 pb y que tiene una función desconocida y se conoce en, por ejemplo, la cepa LGV como "pLGV440." El plásmido no es esencial para la supervivencia de CT, pero cabe destacar que la secuencia está altamente conservada en los aislamientos (p. ej., véase (Comanducci y col., 1990)).

40 **Pruebas diagnósticas**

Los ensayos diagnósticos específicos y rápidos son de suma importancia para el éxito de la intervención contra CT. El diagnóstico basado en el crecimiento selectivo de las bacterias patogénicas ha sido el patrón, pero el cultivo de células consume mucho tiempo. El cultivo *in vitro* de muchos aislamientos clínicos es difícil. Dado que la infección bacteriana con bacterias tiene como resultado la formación de anticuerpos en el huésped, también se ha usado el suero de pacientes con infecciones del tracto genital para diagnosticar la infección por CT. Sin embargo, los ensayos basados en marcadores serológicos son no cuantitativos y a menudo difíciles de interpretar. Por ejemplo, los títulos de anticuerpos pueden ser indetectables en infecciones agudas (un resultado falso negativo), pueden persistir en individuos no infectados con antecedentes de infección (un resultado falso positivo), pueden producir un falso positivo debido a la presencia de especies que interaccionan de manera cruzada (por ejemplo, infección respiratoria causada por diferentes especies de Clamidia) o pueden no desarrollarse en absoluto (un resultado falso negativo) dependiendo de otros factores Black y col., 1991, Ngeow, 1996). Por estas razones, la serología sola no es adecuada para el diagnóstico de las infecciones por CT.

55 Se han producido intentos de remediar estas faltas de idoneidad. Por ejemplo, los productos de los laboratorios Abbott REALTIMETM CT/NG (2G28) y CT (1 L31) usan cebadores y sondas para reacción en cadena de la polimerasa del plásmido críptico de Clamidia en un formato homogéneo en tiempo real (Pabich y col., 2004). Jalal y col. (Jalal et al., 2006) desarrollaron un gen rotor, ensayo de PCR en tiempo real para detectar, identificar y cuantificar CT e una única reacción. Pickett y col. (Pickett et al., 2005) pudieron determinar con exactitud el número de copias de CT y *C. pneumoniae* (N16) usando también PCR en tiempo real.

*Nuevos retos en la detección de CT*

65 Los procedimientos basados en PCR de detección de CT han minado las ventajas del plásmido críptico encontrado en casi todas las cepas de CT. El plásmido se ve favorecido como diana para un diagnóstico basado en polinucleótidos de la infección por CT porque, por bacteria, hay aproximadamente 4-10 copias del plásmido Jalal y

col., 2006; Palmer and Falkow, 1986; Pickett y col., 2005; Tam y col., 1992).

No obstante, en Suecia se ha detectado una nueva variante de CT con una delección en el plásmido ("CTSW") tras una inesperada disminución del 25 % de las infecciones por CT observada en Halland county, Suecia (Ripa y Nilsson, 2006).

Durante la última década, los laboratorios de Suecia han usado pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT) usando el plásmido críptico como molde para la amplificación del ADN para diagnosticar las infecciones por CT.

Desde mediados de septiembre a octubre de 2006, el laboratorio de microbiología del condado en Halmstad, Halland county, analizó 1.700 muestras entrantes consecutivas con una PCR específica de la proteína principal de la membrana externa (MOMP) en paralelo con la PCR del plásmido m2000 de Abbott. En el 13 % de todos los casos de CT diagnosticados en Halland county durante este periodo, Ripa y col. encontraron una cepa variante que solo dio positivo e las pruebas MOMP. Los datos clínicos indican ausencia de diferencia con respecto a las infecciones con las cepas de tipo salvaje. La cepa parece estar extendida por Suecia, Aunque la prevalencia en estas áreas todavía es desconocida.

Se secuenció la parte del plásmido de la cepa variante. Ripa y col. encontraron una delección de 377 pares de bases en el área diana para las pruebas NAAT para CT fabricadas por Abbott y Roche (nucleótidos 654 a 1030 de N° de Acceso X06707; SEC ID N° 4). Ahora SE han secuenciado dos cepas variantes y se ha encontrado que tienen la misma delección (Ripa y Nilsson, 2006). Por tanto, en la técnica existe la necesidad de nuevas pruebas NAAT que sean capaces de detectar esta cepa variante, así como distinguir esta cepa variante de otras cepas de CT.

### Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención refiere a una combinación de reactivos polinucleotídicos útiles para amplificar y/o detectar CT y CTSW, que comprenden un primero y un segundo polinucleótido, donde el primer polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 100 % de identidad de secuencia con un polinucleótido de las SEQ ID NO 1, 5-9, 11-13 o 14, y complementarias de las mismas, y el segundo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con un polinucleótido de SEQ ID NO: 2, 10, 15, 16 y 26, y complementarias de las mismas. La combinación de los reactivos polinucleotídicos puede incluir además un tercer polinucleótido que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, 17-25, 27, 42 y un polinucleótido que comprende n nucleótidos, donde  $10 < n < 140$  nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO:44 y complementarios de los mismos.

La invención también hace referencia a un segundo aspecto, donde la combinación de los reactivos polinucleotídicos del primer aspecto comprende además un cuarto, quinto y sexto polinucleótidos, donde la combinación es útil para detectar y/o amplificar CT y CTSW. En esta combinación de reactivos polinucleotídicos, el cuarto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 28-30 y sus complementarias; el quinto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por la SEC ID N° 31 y una complementaria de la misma; y el sexto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 32-34 y sus complementarias.

La invención también hace referencia a un tercer aspecto, donde la combinación de los reactivos polinucleotídicos del primer aspecto comprende además un cuarto, quinto y sexto polinucleótidos, donde la combinación es útil para detectar y/o amplificar CT, CTSW y NG. En esta combinación de reactivos polinucleotídicos, el cuarto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido de SEC ID N° 35 y sus complementarias; el quinto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido de SEC ID N° 36 y una complementaria de la misma; y el sexto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 37-39 y sus complementarias.

La invención también hace referencia a un cuarto aspecto, donde la combinación de los reactivos polinucleotídicos del primer aspecto comprende además un cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo y noveno polinucleótidos, donde la combinación es útil para detectar y/o amplificar CT, CTSW y NG. En esta combinación de reactivos polinucleotídicos, el cuarto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 2-30 y sus complementarias; el quinto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 %

con un polinucleótido de SEC ID N° 31 y una complementaria de la misma; el sexto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 32, 33 y 34 y sus complementarias; el séptimo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido de SEC ID N° 35 o sus complementarias; el octavo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido de SEC ID N° 36 o sus complementarias; y el noveno polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 37, 38 y 39 y sus complementarias.

En cada aspecto, al menos un reactivo polinucleotídico puede incluir un marcador o un inactivador detectable.

En un quinto aspecto, la invención hace referencia a kits que incluyen la combinación de los polinucleótidos de los aspectos 1-5; donde el kit también incluye reactivos de amplificación.

En un sexto aspecto, la invención hace referencia a procedimientos de amplificar y/o detectar CT, CTSW y/o NG usando la combinación de reactivos polinucleotídicos de los aspectos 1-4. Estas reacciones pueden incluir además al menos un polinucleótido control, positivo y/o negativo, así como para aquéllos que se pueden usar para normalización. No obstante, al detectar CT o CTSW, si la reacción consiste en 7,5 unidades de una ADN polimerasa, Tris-HCl 15 mM, pH 8,0, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 9,5 mM, dNTP 0,2 Mm, 500 nM del primero y segundo polinucleótidos y ROX 60 Nm, después, si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o una complementaria de la misma, el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:16 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:23 o una complementaria de la misma;

si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o una complementaria de la misma, el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:22 o una complementaria de la misma si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:8 o 9 o complementarias de las mismas, el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:10 o 26 o complementarias de las mismas, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17 o una complementaria de la misma; si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:5 o 6 o complementarias de las mismas, el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:10 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:19 o una complementaria de la misma; y si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:14 o una complementaria de la misma, el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:22 o una complementaria de la misma.

### Descripción detallada

La presente invención resuelve los problemas tanto de detectar la cepa CTSW como de distinguir la cepa CRSW de otras cepas de CT en ciertas condiciones de ensayo. Proporcionando sondas y cebadores que se han diseñado cuidadosamente y analizado rigurosamente, el diagnóstico de la infección de CT, sea infección por CT o por CTSW, es ahora directo y cierto.

La presente invención combina específicamente secuencias de polinucleótidos que cuando se usan juntas producen una detección sensible, específica y reproducible de las cepas de CT y de CTSW. No solo se puede identificar la CTSW, sino que se pueden determinar muestras simultáneamente si contienen CT, CTSW o ambas.

Además, la invención también proporciona procedimientos, ensayos y kits para detectar secuencias de CT y CTSW.

Los inventores obtuvieron y analizaron preparaciones de ADN de 38 muestras clínicas de tres condados de Suecia. Los diversos tipos de muestras incluyeron orina, orina combinada con frotis cervicales, frotis uretrales y frotis oculares. Una región de aproximadamente 1.000 nucleótidos dentro del plásmido críptico se amplificó *in vitro* y la región amplificada resultante se analizó para determinar su tamaño. Las 38 muestras mostraron una deleción similar de aproximadamente 350 a 400 pares de bases (pb). Después se secuenciaron treinta y seis muestras. En las 36 muestras se encontró una deleción idéntica de 377 pb.

Después, los inventores evaluaron múltiples combinaciones de cebadores y sondas para la detección de esta cepa de deleción apuntando a regiones fuera de la región de deleción. Se demostró que un conjunto seleccionado de cebador-sonda detectaba *Chlamydia trachomatis* que contenía el plásmido críptico de tipo salvaje así como la variante de deleción. Este conjunto de cebador-sonda también detectó los catorce miembros de un panel de

serovariedades de *Chlamydia trachomatis* (una serovariedad diferente de otras serovariedades en las proteínas encontradas en la superficie de la célula bacteriana).

5 Las “herramientas” moleculares de la invención incluyen las secuencias mostradas en la Tabla 1 y sus complementarias.

**TABLA 1**  
**Secuencias de los cebadores y las sondas**

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia	Bases
1	CP 2512_2537 directo	caagcttaga tccgtttctc atacgg	26
2	CP 2624_2651 inverso	gcaatagaaa cggagatcta cgcaatgg	28
3	CP 2542_2568 sonda (directo)	cctcgatgat ttgagcgtgt gtagcgc	27
5	CP 1223_1249 directo	cctcattat gtcggagtct gagcacc	27
6	CP 1224_1249 directo	cttcattatg tccggagtctg agcacc	26
7	CP 1233_1256 directo	gtcggagtct gagcacccta ggcg	24
8	CP 1269_1295 directo	cacagcggtt gctcgaagca cgtgcgg	27
9	CP 1272_1295 directo	agcggttgct cgaagcacgt gcgg	24
10	CP 1399_1424 inverso	caagagtaca tccgtcaacg aagagg	26
11	CP 2424_2448 directo	cggttgga agagctttg cggcg	25
12	CP 2430-2448 directo	gggaagagctttgcggcg	19
13	CP 2472_2498 directo	cgatctcgg gtaatgtg catgatg	27
14	CP 2472_2495 directo	cgatctcgg gtaatgtg catg	24
15	CP 2596_2618 inverso	cattgtactc attaaacgag cgg	23
16	CP 2650_2677 inverso	gtcaagcctt cctttatac gctcaagc	28
17	CP 1341_1368 sonda (inverso)	ggtggggtta aggcaaatcg cccgcacg	28
18	CP 1355_1384 sonda (directo)	gccttaacc caccatttt cggagcggag	30
19	CP 1362_1389 sonda (directo)	ccccaccatt ttccggagc gagttacg	28
20	CP 2510_2537 sonda (directo)	gacaagctta gatccgttc tcatcagc	28
21	CP 25102537 sonda (inverso)	ccgatgaga aacggatcta agcttgc	28
22	CP 2542_2568 sonda (inverso)	gcgctacaca cgctcaaatc atcgagg	27
23	CP 2542_2570 sonda (inverso)	cagcgtcaca cacgctcaaa tcatcgagg	29
24	CP 2542_2573 sonda (inverso)	cttcagcgtc acacacgctc aatcatcga gg	32
25	CP 2545_2568 sonda (directo)	cgatgattg agcgtgtgta ggcg	24

10 Los siguientes términos se usaron para describir la invención.

#### Definiciones

15 “Hibridan específicamente” se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para unirse de forma detectable y específica a un segundo ácido nucleico. Los polinucleótidos hibridan específicamente con hebras de ácido nucleico diana en condiciones de hibridación y de lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos.

20 “Secuencia diana” o “secuencia de ácido nucleico diana” significa una secuencia de ácido nucleico de CT o CTSW o sus complementarias, que se amplifica, detecta o usa uno o más de los polinucleótidos proporcionados en el presente documento. Adicionalmente, aunque el término secuencia diana hace referencia, en ocasiones, a una secuencia de ácido nucleico bicatenario, una secuencia diana también puede ser monocatenaria. En los casos donde la diana es bicatenaria, las secuencias del dejador polinucleotídico de la presente invención amplifican, preferentemente, ambas hebras de la secuencia diana. Se puede seleccionar una secuencia diana que sea más o  
25 menos específico de un organismo concreto. Por ejemplo, la secuencia diana puede ser específica de un género completo, de más de un género, de una especie o subespecie, serogrupo, auxotipo, serotipo, cepa, aislamiento u otro subgrupo de organismos.

30 “Muestra de prueba” quiere decir una muestra tomada de un organismo o fluido biológico que puede contener una secuencia diana de CT o CTSW. Una muestra de prueba se puede obtener de cualquier fuente, por ejemplo tejido, sangre, saliva, esputo, mocos, sudor, orina, frotis uretrales, frotis cervicales, frotis urogenitales o anales, frotis conjuntivales, fluido del cristalino ocular, líquido cefalorraquídeo etc. Una muestra de prueba se puede usar (i) directamente según se obtiene de la fuente; o (ii) tras un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Por  
35 tanto, una muestra de prueba se puede pretratar antes de usar mediante, por ejemplo, preparación de plasma o suero de sangre, rompiendo células o partículas víricas, preparando líquidos de materiales sólidos, diluyendo fluidos viscosos, filtrando líquidos, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos etc.

40 “Marcador” quiere decir una molécula o resto que tiene una propiedad o característica que es capaz de detección y, opcionalmente, de cuantificación. Un marcador puede ser de detección directa como con, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes; o una marca puede ser detectable indirectamente, como con, por ejemplo, miembros de unión específica. A veces, los

marcadores para detección directa requieren componentes adicionales, tales como sustratos, reactivos desencadenantes, restos de inactivación y luz para permitir la detección y/o cuantificación de la marca. Cuando se usan marcadores de detección indirecta, normalmente se usan en combinación con un "conjugado". Habitualmente, un conjugado es un miembro de unión específico que se ha unido o acoplado a un marcador de detección directa.

5 Las sustancias químicas de acoplamiento para sintetizar un conjugado se conocen bien e incluyen, por ejemplo, cualquier medio químico y/o medio físico que no destruye la propiedad de unión específica del miembro de unión específico o la propiedad de detectable del marcador. "Miembro de unión específico" significa un miembro de un par de unión, es decir dos moléculas diferentes donde una de las moléculas, mediante, por ejemplo, medios químicos o físicos, se une específicamente a las otras moléculas. Además de los pares de unión específica de antígeno y anticuerpo, otros ejemplos de pares de unión específica incluyen (estrept.) avidina y biotina; haptenos y anticuerpos específicos de haptenos; secuencias nucleotídicas complementarias; cofactores o sustratos enzimáticos y enzimas; etc.

15 "Punto cuántico" (PC) quiere decir una estructura semicristalina semiconductor a nanoescala hecha normalmente de seleniuro de cadmio que absorbe la luz y, después, la reenvía un par de nanosegundos más tarde en un color específico.

20 Los PD están disponibles comercialmente (p. ej., Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) con diversas superficies conjugadas o reactivas, por ejemplo amino, carboxilo, estreptavidina, proteína A, biotina e inmunoglobulinas.

25 Un "polinucleótido" es un polímero de ácido nucleico de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), ARN o ADN o miméticos de ARN o ADN (tales como PNA) y derivados de los mismos y homólogos de los mismos. Por tanto, los polinucleótidos incluyen polímeros compuestos por bases nucleotídicas naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos (estructura), así como polímeros que tienen porciones no naturales que funcionan de modo similar. Dichos polímeros de ácido nucleico modificados o sustituidos son bien conocidos en la técnica y, para los fines de la presente invención, se denominan "análogos". En general, los oligonucleótidos son polinucleótidos cortos de aproximadamente 10 a aproximadamente 160 o 200 nucleótidos.

30 "polinucleótido variante de CT o de CTSW" o "secuencia de ácido nucleico variante de CT o de CTSW " quiere decir un polinucleótido variante de CT o de CTSW que tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente 60 %, más preferentemente de al menos aproximadamente 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y, todavía más preferentemente, una identidad de de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 99 % con la secuencia de ácido nucleico de CT o de CTSW. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

40 Habitualmente, los polinucleótidos variantes de CT o de CTSW tienen una longitud de al menos aproximadamente 8 nucleótidos, a menudo una longitud de aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 nucleótidos o incluso una longitud de aproximadamente 75-200 nucleótidos o mayor.

45 "Porcentaje ( %) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a las secuencias de ácido nucleico de CT o CTSW se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de CT o CTSW de interés, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico se puede realizar de varias formas dentro de la experiencia en la técnica usando, por ejemplo, software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para alinear las secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para alcanzar la alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando.

50 Cuando se alinean las secuencias de nucleótidos, el % de identidad de secuencia de una secuencia de ácido dada C a, o con, o contra, una secuencia de ácido nucleico dada D (que puede, como alternativa, redactarse como una secuencia de ácido nucleico dada C o tiene comprende un determinado % de identidad de la secuencia de ácido nucleico con, o contra, una secuencia de ácido nucleico dada D) se calcula del siguiente modo:

$$\text{\% de identidad de la secuencia de ácido nucleico de} = W/Z \cdot 100$$

60 donde

W es el número de nucleótidos indicados como apareamientos idénticos por el programa de alineación se secuencia el algoritmo de alineación de C y D

y

65 Z es el número total de nucleótidos en D.

Cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de D a C.

5 “Constituido esencialmente por un polinucleótido que tiene un % de identidad de secuencia” quiere decir que, cuando se aplica a un nucleótido, el polinucleótido no difiere sustancialmente en longitud sino en secuencia. Por tanto, un polinucleótido “A” constituido esencialmente por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia del 80 % con una secuencia conocida “B” de 100 nucleótidos significa que el polinucleótido “A” tiene aproximadamente una longitud de 100 nucleótidos, pero hasta 20 nucleótidos pueden variar con respecto a la secuencia “B”. El  
10 polinucleótido puede ser más largo o más corto por la adición de 1-15 nucleótidos en el extremo, para producir tipos específicos de sondas, cebadores y otras herramientas moleculares etc., tal como el caso de cuando secuencias sustancialmente no idénticas se añaden para crear estructuras secundarias determinadas. Dichos nucleótidos no idénticos no se consideran en el cálculo de la identidad de secuencia cuando la secuencia está modificada por  
15 “constituido esencialmente por”.

Los ortólogos (es decir, ácidos nucleicos que codifican CT o CTSW derivados de especies distintas al ser humano) u otras secuencias relacionadas (p. ej., parálogos y xenólogos) se pueden obtener mediante hibridación de rigurosidad baja, moderada o alta con toda o una porción de la secuencia humana concreta como sonda usando procedimientos bien conocidos en la técnica para hibridación de ácido nucleico y clonación.

20 La especificidad del ADN monocatenario para hibridar fragmentos complementarios viene determinada por la “rigurosidad” de las condiciones de reacción. La rigurosidad de la hibridación aumenta a medida que disminuye la tendencia a formar dúplex de ADN. En las reacciones de hibridación de ácido nucleico, la rigurosidad se puede escoger para favorecer hibridaciones específicas (rigurosidad alta), que se pueden usar para identificar, por ejemplo, clones de longitud completa de una biblioteca. Se pueden usar hibridaciones menos específicas (rigurosidad baja)  
25 para identificar moléculas o segmentos de ADN relacionadas pero no exactas (homólogas, pero no idénticas).

Los dúplex de ADN se estabilizan mediante: (1) el número de pares de bases complementarias, (2) el tipo de pares de bases, (3) la concentración de sales (fuerza iónica) de la mezcla de reacción, (4) la temperatura de la reacción y  
30 (5) la presencia de ciertos disolventes orgánicos, tales como formamida, que disminuye la estabilidad del dúplex de ADN. Un enfoque habitual es variar la temperatura: temperaturas relativas más altas tienen como resultado condiciones de reacción más rigurosas. (Ausubel y col 1987) proporcionan una excelente explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación.

35 Hibridar en “condiciones rigurosas” describe protocolos de hibridación donde secuencias de nucleótidos con una homología de al menos el 60 % entre sí permanecen hibridadas.

Los polinucleótidos pueden incluir grupos pendientes, tales como péptidos (p. ej., para apuntar a receptores en la célula huésped *in vivo*) o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular. Además, los  
40 oligonucleótidos se pueden modificar con agentes de escisión desencadenados por hibridación (van der Krol y col., 1988) o agentes intercalantes (Zon, 1988). El oligonucleótido se puede conjugar con otras moléculas, por ejemplo un péptido, un agente de reticulación desencadenado por hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión desencadenado por hibridación y similares.

45 Análogos polinucleotídicos útiles incluyen polímeros que tienen estructuras modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Estructuras modificadas incluyen aquéllas que retienen un átomo de fósforo en la estructura, tales como fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforotioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo, así como los que ya no tienen un átomo de fósforo, tal como estructuras formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos de heteroátomos o heterociclos de cadena corta.  
50 Polímeros de ácido nucleico modificado (análogos) pueden contener uno o más restos de azúcar modificado.

También son útiles los análogos que son miméticos de ARN o ADN, donde tanto el azúcar como el enlace internucleosídico de las unidades nucleotídicas están sustituidas por grupos nuevos. En estos miméticos, las  
55 unidades básicas se mantienen para hibridación con la secuencia diana. Un ejemplo de tal mimético, que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, es un ácido nucleico peptídico (PNA) (Buchardt y col., 1992; Nielsen y col., 1991).

60 El reino de los nucleótidos incluye derivaos donde la molécula de ácido nucleico se ha modificado covalentemente mediante sustitución, o medios químicos, enzimáticos u otros adecuados, con un resto distinto a un nucleótido natural, por ejemplo con un resto que funciona como marcador, como se describe en el presente documento.

Los polinucleótidos de la presente invención comprenden cebadores y sondas que hibridan específicamente con las secuencias diana, por ejemplo las moléculas de ácido nucleico que tienen una cualquiera de las secuencias de ácido  
65 nucleico de las SEC ID N° 1-3 y 5-25; incluidos los análogos y/o derivados de las secuencias de ácido nucleico y homólogos de las mismas. Los polinucleótidos de la invención se pueden usar como cebadores y/o sondas para

amplificar o detectar *Chlamydia trachomatis*, incluida CTSW.

Los polinucleótidos de las SEC ID N° 1-3 and 5-25 se pueden preparar mediante técnicas convencionales, tales como síntesis en fase sólida usando equipo comercialmente disponible, tal como el disponible en Applied Biosystems USA Inc. (Foster City, CA; EE.UU.), DuPont, (Wilmington, DE; EE.UU.), o Milligen (Bedford, MA; EE.UU.). Los polinucleótidos modificados, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados, también se pueden preparar fácilmente mediante procedimientos similares conocidos en la técnica (Fino, 1995; Mattingly, 1995; Ruth, 1990).

Los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención se pueden usar como sondas para la detección o cuantificación, o ambos, de ácidos nucleicos de CT o CTSW en una muestra de prueba. La muestra de prueba se pone en contacto con al menos uno de los polinucleótidos de las SEC ID N° 1-3 y 5-25 en condiciones de hibridación adecuadas y la hibridación entre la secuencia diana y al menos uno de los polinucleótidos se detecta después mediante procedimiento bien conocidos en la técnica.

Las "Sondas" son secuencias polinucleotídicas de longitud variable, preferentemente de al menos aproximadamente 10 nucleótidos, 100 nucleótidos o más, dependiendo del uso específico. Las sondas se usan para detectar secuencias polinucleotídicas idénticas, similares o complementarias. Se pueden obtener sondas de mayor longitud a partir de una fuente natural o recombinante, altamente específica y mucho más lenta de hibridar que las sondas oligoméricas de longitud más corta. Las sondas puede ser monocatenarias, bicatenarias o tener más cadenas y están diseñadas para tener especificidad en PCR, tecnologías de hibridación basadas en membranas o tecnologías similares al ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Las sondas pueden ser oligonucleótidos sustancialmente purificados que hibridan en condiciones rigurosas con 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 o 400 polinucleótidos base; tal como un ARNm diana.

Se pueden incorporar marcadores detectables en los polinucleótidos de SEC ID N° 1-3 y 5-25: de modo que la capacidad del polinucleótidos para hibridar con su secuencia diana no se vea afectada de forma adversa.

Los "marcadores de captura" normalmente se usan para distinguir productos de extensión y sondas asociadas con cualquiera de estos productos de otros reactantes de amplificación. Los miembros de unión específica son muy adecuados para este fin. Dichas sondas pueden estar bloqueadas en sus extremos 3' de modo que no se extienden en condiciones de hibridación. Los procedimientos para prevenir la extensión de una sonda son bien conocidos y son cuestión de elección para el experto en la técnica. Normalmente, la adición de un grupo fosfato en el extremo 3' de la sonda basta para bloquear la extensión de la sonda.

En los casos donde se usan marcadores para detectar los productos amplificados con cebador, las secuencias del cebador pueden estar opcionalmente marcadas con un marcador de captura o con un marcador detectable. La secuencia de la sonda se usa para hibridar con la secuencia generada por la secuencia del cebador y, normalmente, hibrida con una secuencia que no incluye la secuencia del cebador. La secuencia de la sonda también se puede marcar con un marcador de captura o con un marcador detectable, con le inconveniente de que cuando el cebador está marcado con un marcador de captura, la sonda está marcada con un marcador detectable y al contrario. Tras la formación de la secuencia copia: se pueden usar los híbridos de la sonda, los marcadores diferenciales (es decir, los marcadores de captura y de detección) sobre la secuencia copia y la secuencia de la sonda para separar y detectar dichos híbridos. En una realización de la presente invención, la detección se realiza de acuerdo con los protocolos usados por la instrumentación disponible Abbott m2000™ (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL; EE.UU.).

Las SEQ ID N°: 1-3 y 5-25 también se pueden usar como sondas de captura o sondas de divulgación en los ensayos de tipo sándwich. Brevemente, la sonda de captura de polinucleótidos está fijada a un soporte sólido y se pone en contacto con una muestra de prueba en condiciones de hibridación adecuadas de modo que se forma un híbrido sonda:diana entre la sonda de captura y cualquier ácido nucleico diana presente en la muestra de prueba. Tras una o más etapas de lavado adecuadas, se detecta el híbrido sonda:diana, normalmente mediante una segunda sonda de "divulgación" o un anticuerpo específico que reconozca la molécula híbrida.

Los polinucleótidos de la invención se pueden usar en ensayos de hibridación de ácido nucleico modificado. Por ejemplo, Pandian y col. (Pandian y col.m 1997) divulgan un procedimiento para amplificar la señal de detección en un ensayo de hibridación de ácido nucleico. Una primera secuencia de sonda polinucleotídica hibrida con una secuencia diana, el híbrido sonda:diana se inmunocaptura después y se inmoviliza. Una segunda sonda polinucleotídica que contiene muchas unidades de repetición de secuencia hibrida después con el componente de la sonda del híbrido sonda:diana. El complejo se detecta hibridando usando las sondas de la secuencia de ácido nucleico marcado, una con cada una de las unidades de repetición de secuencia en la segunda sonda. La unión de múltiples sondas marcadas a la segunda sonda amplifica la señal de detección e incrementa la sensibilidad del ensayo. Las SEQ ID N°: 1-3 y 5-25 se pueden usar en dichos ensayos de hibridación modificados, bien directamente como primeras sondas o como segundas sondas que se han modificado para incorporar unidades de repetición de secuencia adicionales.



**Práctica de la invención***Amplificación y detección de secuencias de nucleótidos de CT y CTSW*

5 Los polinucleótidos de las SEC ID N° 1-3 y 5-25 se pueden usar como cebadores/sondas para amplificar y detectar CT o CTSW en una muestra. Cebadores de cualquier conjunto de cebador/sonda (conjunto que se expone en la Tabla 2) se pueden usar para amplificar una secuencia diana. Solo los conjuntos de la Tabla 2 identificados como las combinaciones 41, 42, 43, 117, 118 y 119 son parte de la invención. Los otros conjuntos se proporcionan con fines comparativos. En la mayoría de los casos, la sonda hibrida con las copias de la secuencia diana que se  
10 generan mediante uno de los cebadores y, generalmente, facilita la detección de cualquiera de las copias de la secuencia diana generada durante el curso de la reacción de amplificación. Todos los conjuntos de cebadores/sondas se pueden emplear de acuerdo con procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar de manera específica y sensible CT o CTSW o ambos, CT u CTSW, cuando se combinan los cebadores y las sondas adecuados. Los cebadores y las sondas individuales de los conjuntos de cebadores/sondas se pueden  
15 usar en combinación con otros cebadores y/o sondas.

En la técnica se conocen bien los procedimientos de amplificación e incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la TMA, la amplificación por círculo rodante, la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA). Un experto en la técnica entenderá que para usar  
20 los cebadores en ciertas técnicas de amplificación se puede necesitar su modificación, por ejemplo, para SDA los cebadores normalmente comprenden nucleótidos adicionales cerca de sus extremos 5' que constituyen un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. Para NASBA, los cebadores incluyen nucleótidos adicionales cerca del extremo 5' que constituyen un promotor de la ARN polimerasa. Por lo tanto, se considera que los polinucleótidos modificados están dentro del ámbito de la presente invención.

25 Cuando se seleccionan cebadores para una reacción de amplificación se necesita tener en cuenta ciertos criterios. Por ejemplo, se deben seleccionar los cebadores de modo que la probabilidad de formar dúplex en 3' esté minimizada y de modo que las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) sean lo suficientemente similares para optimizar el apareamiento con la secuencia diana y minimizar la cantidad de apareamiento no específica. En este contexto, los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención se proporcionan en combinaciones que se pueden usar como  
30 cebadores en las reacciones de amplificación para amplificar específicamente secuencias de ácidos nucleicos diana. Estas combinaciones se proporcionan en la Tabla 2; las secuencias que se pueden usar como sondas se elaboran más adelante. Como se ha indicado anteriormente, solo los conjuntos de la Tabla 2 correspondientes a las combinaciones 41, 42, 43, 117, 118 y 119 son parte de la invención.

35

TABLA 2  
Ejemplos de combinaciones de cebadores y sondas para detectar CT y CTSW

Combinación	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
1	SEC ID N°5 (CP 1223_1249 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
2	SEC ID N°6 (CP 1224_1249 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
3	SEC ID N°7 (CP 1233_1256 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
4	SEC ID N°8 (CP 1269_1295 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
5	SEC ID N°9 (CP 1272_1295 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
6	SEC ID N°5 (CP 1223_1249 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
7	SEC ID N°6 (CP 1224_1249 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
8	SEC ID N°7 (CP 1233_1256 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
9	SEC ID N°8 (CP 1269_1295 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
10	SEC ID N°9 (CP 1272_1295 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
11	SEC ID N°5 (CP 1223_1249 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°19 (SEC ID N° 19 (CP 1362_1389 (Directo)))
12	SEC ID N°6 (CP 1224_1249 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°19 (SEC ID N° 19 (CP 1362_1389 (Directo)))

ES 2 659 145 T3

<b>Combinación</b>	<b>Cebador directo</b>	<b>Cebador inverso</b>	<b>Sonda</b>
13	SEC ID N°7 (CP 1233_1256 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°19 (SEC ID N° 19 (CP 1362_1389 (Directo)))
14	SEC ID N°8 (CP 1269_1295 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°19 (SEC ID N° 19 (CP 1362_1389 (Directo)))
15	SEC ID N°9 (CP 1272_1295 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°19 (SEC ID N° 19 (CP 1362_1389 (Directo)))
16	SEC ID N°5 (CP 1223_1249 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
17	SEC ID N°6 (CP 1224_1249 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
18	SEC ID N°7 (CP 1233_1256 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
19	SEC ID N°8 (CP 1269_1295 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
20	SEC ID N°9 (CP 1272_1295 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°17 (CP 1341_1368 (Inverso))
21	SEC ID N°5 (CP 1223_1249 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
22	SEC ID N°6 (CP 1224_1249 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
23	SEC ID N°7 (CP 1233_1256 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
24	SEC ID N°8 (CP 1269_1295 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
25	SEC ID N°9 (CP 1272_1295 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°18 (CP 1355_1384 (Directo))
26	SEC ID N°5 (CP 1223_1249 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°19 (CP 1362_1389 (Directo))
27	SEC ID N°6 (CP 1224_1249 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°19 (CP 1362_1389 (Directo))
28	SEC ID N°7 (CP 1233_1256 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°19 (CP 1362_1389 (Directo))
29	SEC ID N°8 (CP 1269_1295 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°19 (CP 1362_1389 (Directo))
30	SEC ID N°9 (CP 1272_1295 Directo)	SEC ID N°26 <sup>1</sup>	SEC ID N°19 (CP 1362_1389 (Directo))
31	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°21 (CP 2510_2537 (Inverso))
32	SEC ID N°12(CP2430- 2448 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°21 (CP 2510_2537 (Inverso))
33	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°21 (CP 2510_2537 (Inverso))
34	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°21 (CP 2510_2537 (Inverso))
35	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°20 (CP 2510_2537 (Directo))
36	SEC ID N°12 (CP 2430_2448 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°20 (CP 2510_2537 (Directo))
37	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°20 (CP 2510_2537 (Directo))
38	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°20 (CP 2510_2537 (Directo))
39	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°3 (CP2542_2568 (Directo))
40	SEC ID N°12 (CP 2430_2448 Directo)	SEC ID N°2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID N°3 (CP2542_2568 (Directo))

ES 2 659 145 T3

<b>Combinación</b>	<b>Cebador directo</b>	<b>Cebador inverso</b>	<b>Sonda</b>
41	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº3 (CP2542_2568 (Directo))
42	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº3 (CP2542_2568 (Directo))
43	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº3 (CP2542_2568 (Directo))
44	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
45	SEC ID Nº12(CP2430-2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
46	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
47	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
48	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
49	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
50	SEC ID Nº12(CP2430-2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
51	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
52	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542-2570 (Inverso))
53	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
54	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
55	SEC ID Nº12 (CP 2430_2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
56	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
57	SEC ID Nº14(CP2472-2495 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
58	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
59	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº25 (CP 2545_2568 (Directo))
60	SEC ID Nº12(CP2430-2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº25 (CP 2545_2568 (Directo))
61	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº25 (CP 2545_2568 (Directo))
62	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº25 (CP 2545_2568 (Directo))
63	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEQ 10 N02 (CP 2545_2568 (Directo))
64	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº43 <sup>3</sup>
65	SEC ID Nº12 (CP 2430_2448 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº43 <sup>3</sup>
66	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEQ 110 NO:43 <sup>3</sup>
67	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº43 <sup>3</sup>
68	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº2 (CP 2624_2651 Inverso)	SEC ID Nº43 <sup>3</sup>

ES 2 659 145 T3

<b>Combinación</b>	<b>Cebador directo</b>	<b>Cebador inverso</b>	<b>Sonda</b>
<b>69</b>	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº21 (CP 2510_2537 (Inverso))
<b>70</b>	SEC ID Nº12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº21 (CP 2510_2537 (Inverso))
<b>71</b>	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº16 6 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº21 (CP 2510_2537 (Inverso))
<b>72</b>	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº21 (CP 2510_2537 (Inverso))
<b>73</b>	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 2650_ 2677 Inverso)	SEC ID Nº20 (CP 2510_2537 (Directo))
<b>74</b>	SEC ID Nº12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº20 (CP 2510_2537 (Directo))
<b>75</b>	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº20 (CP 2510_2537 (Directo))
<b>76</b>	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº20 (CP 2510_2537 (Directo))
<b>77</b>	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 2650_ 2677 Inverso)	SEC ID Nº3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>78</b>	SEC ID Nº12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>79</b>	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>80</b>	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>81</b>	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>82</b>	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>83</b>	SEC ID Nº12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>84</b>	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>85</b>	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>86</b>	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>87</b>	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>88</b>	SEC ID Nº12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>89</b>	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265_2677 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>90</b>	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº1 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>91</b>	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>92</b>	SEC ID Nº11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>93</b>	SEC ID Nº12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>94</b>	SEC ID Nº13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>95</b>	SEC ID Nº14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>96</b>	SEC ID Nº1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID Nº16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID Nº24 (CP 2542_2573 (Inverso))

ES 2 659 145 T3

<b>Combinación</b>	<b>Cebador directo</b>	<b>Cebador inverso</b>	<b>Sonda</b>
<b>97</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>98</b>	SEC ID N°12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>99</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>100</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°5 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>101</b>	SEC ID N°1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>102</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>103</b>	SEC ID N°12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_ 2677 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>104</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>105</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>106</b>	SEC ID N°1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID N°16 (CP 265o_2677 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>107</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°21 (CP 2510_2537 (Inverso))
<b>108</b>	SEC ID N°12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°21 (CP 2510_2537 (Inverso))
<b>109</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°21 (CP 2510_2537 (Inverso))
<b>110</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°21 (CP 2510_2537 (Inverso))
<b>111</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°20 (CP 2510_2537 (Directo))
<b>112</b>	SEC ID N°12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°20 (CP 2510_2537 (Directo))
<b>113</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°20 (CP 2510_2537 (Directo))
<b>114</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°20 (CP 2510_2537 (Directo))
<b>115</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>116</b>	SEC ID N°12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>117</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>118</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>119</b>	SEC ID N°1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°3 (CP2542_2568 (Directo))
<b>120</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>121</b>	SEC ID N°12 (CP 243o_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>122</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>123</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°22 (CP 2542_2568 (Inverso))
<b>124</b>	SEC ID N°1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_261 Inverso)	SEC ID N°22 (CP 2542_2568 (Inverso))

ES 2 659 145 T3

<b>Combinación</b>	<b>Cebador directo</b>	<b>Cebador inverso</b>	<b>Sonda</b>
<b>125</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>126</b>	SEC ID N°12 (CP 2430_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>127</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>128</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>129</b>	SEC ID N°1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°23 (CP 2542_2570 (Inverso))
<b>130</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>131</b>	SEC ID N°12 (CP 2430_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>132</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>133</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>134</b>	SEC ID N°1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°24 (CP 2542_2573 (Inverso))
<b>135</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>136</b>	SEC ID N°12 (CP 2430_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>137</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>138</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>139</b>	SEC ID N°1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°25 (CP 2545_2568 (Directo))
<b>140</b>	SEC ID N°11 (CP 2424_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>141</b>	SEC ID N°12 (CP 2430_2448 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>142</b>	SEC ID N°13 (CP 2472_2498 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>143</b>	SEC ID N°14 (CP 2472_2495 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>144</b>	SEC ID N°1 (CP 2512_2537 Directo)	SEC ID N°15 (CP 2596_2618 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>145</b>	SEC ID N°5 (CP 1223_1249 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°43 <sup>3</sup>
<b>146</b>	SEC ID N°6 (CP 1224_1249 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°27 <sup>2</sup>
<b>147</b>	SEC ID N°7 (CP 1233_1256 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°27 <sup>2</sup>
<b>148</b>	SEC ID N°8 (CP 1269_1295 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°27 <sup>2</sup>
<b>149</b>	SEC ID N°9 (CP 1272_1295 Directo)	SEC ID N°10 (CP 1399_1424 Inverso)	SEC ID N°27 <sup>2</sup>
<b>150</b>	SEC ID N°5 (CP 1223_1249 Directo)	SEC ID N°261	SEC ID N°27 <sup>2</sup>
<b>151</b>	SEC ID N°6 (CP 1224_1249 Directo)	SEC ID N°261	SEC ID N°27 <sup>2</sup>
<b>152</b>	SEC ID N°7 (CP 1233_1256 Directo)	SEC ID N°261	SEC ID N°27 <sup>2</sup>

Combinación	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
153	SEC ID N°8 (CP 1269_1295 Directo)	SEC ID N°261	SEC ID N°27 <sup>2</sup>
154	SEC ID N°9 (CP 1272_1295 Directo)	SEC ID N°261	SEC ID N°27 <sup>2</sup>

1 SEC ID N° 26 es cagagtacat cggtaacga aga (23) (Pickett y col., 2005)

2 SEC ID N° 27 es ccccaccatt ttccggagc ga (22) (Pickett y col., 2005)

2 SEC ID N° 43 es cgatgamg agcgtgtgta gcgg (24)

#### Sondas

- 5 Además de las secuencias indicadas como “sondas” en la tabla 2, las sondas pueden comprender cualquier parte de la SEQ ID NO:44, la región amplificada con las SEQ ID NO:1 y 2 se usan como cebadores de amplificación, o complementarias de las mismas. Las sondas son normalmente  $n$  nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO:44, o complementarias de la misma, donde  $10 < n < 140$ . La SEQ ID NO:44 es

```

caagccttaga tccgtttctc atacggtttt cctcogatgat ttgagcgtgt gtagcgcctga    60
agaaaatttg agcaatttca ttttccgctc gtttaatgag tacaatgaaa atccattgog    120
tagatctccg tttctattgc                                                    140
(SEQ ID NO:44)

```

- 10 Además, las sondas pueden desviarse de la secuencia de SEQ ID NO: 44 o una porción de la misma, sin perjudicar sustancialmente la sensibilidad o la detección. Las sondas pueden, por lo tanto, tener una secuencia de nucleótidos donde la sonda tiene 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y, aún más preferiblemente, al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 44 o una complementaria de la misma, o una porción de la misma, o complementarias de estas porciones. Dado que las sondas pueden ser secuencias modificadas, *por ejemplo*, se agregan nucleótidos adicionales a los extremos 3' y / o 5' para facilitar la formación de la estructura secundaria (*por ejemplo*, tallos-bucles) o intercalados dentro de la secuencia de SEQ ID NO: 44, la secuencia de la sonda puede ser incluso inferior al 70 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 44 y el ensayo conserva sustancialmente la sensibilidad.

Asimismo, los cebadores se pueden desviar de las secuencias presentadas en la Tabla 2 sin alterar sustancialmente la sensibilidad.

#### 25 Amplificación de las dianas CT y CTSW

- El método de amplificación generalmente comprende (a) una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, al menos un conjunto de cebadores/sondas de la presente invención y al menos una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos una secuencia diana; y (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia diana si la secuencia diana está presente.

- La etapa (b) de los métodos anteriores se puede repetir cualquier número adecuado de veces antes de, por ejemplo, una etapa de detección, por ejemplo, mediante ciclado térmica de la mezcla de reacción entre 10 y 100 veces, generalmente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 veces, más generalmente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 45 veces.

- Los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen enzimas que tienen actividad polimerasa, cofactores de enzimas, tales como magnesio o manganeso; sales; dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (dATP, dGTP, dCTP y dTTP).

- Las condiciones de amplificación son aquéllas que estimulan el apareamiento y la extensión de una o más secuencias de ácidos nucleicos. Dicho apareamiento depende de un modo más bien predecible de diversos parámetros, incluidos la temperatura, la fuerza iónica, la longitud de secuencia, la complementariedad y el contenido en G:C de las secuencias. Por ejemplo, reducir la temperatura en el medio de las secuencias complementarias de ácido nucleico estimula el apareamiento. Normalmente, las aplicaciones diagnósticas usan temperaturas de hibridación que son de aproximadamente 2 °C a 18 °C (por ejemplo, aproximadamente 10 °C) por debajo de la  $T_m$ . La fuerza iónica también afecta a la  $T_m$ . Las concentraciones e sales típicas dependen de la naturaleza y la valencia del catión, pero los expertos en la técnica las entienden fácilmente. Generalmente, las sondas de aproximadamente

30 pb o menos y que tienen un alto contenido en G:C funcionan bien.

Por último, la temperatura de hibridación se selecciona de modo que esté cercana o sea la  $T_m$  de los cebadores o sondas. Por tanto, la obtención de condiciones de hibridación adecuadas para un conjunto de cebadores/sondas concreto está dentro de la técnica de PCR conocida para los expertos en la técnica.

Las secuencias de cebadores (SEC ID N° 1, 2 y 5-16) de cualquier juego de cebadores/sondas concreto pueden usarse como cebadores de amplificación.

En una realización, el método de detección generalmente comprende (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, al menos un conjunto de cebadores/sondas de la presente invención y una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos una secuencia diana; (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia diana; (c) hibridación de la sonda con la secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia diana para formar un híbrido que comprenda la sonda y la secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia diana y (d) la detección del híbrido como una indicación de la presencia de la secuencia diana (CT y CTSW y/o una secuencia control) en la muestra.

Se pueden detectar amplicones específicos que se producen por amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos diana usando los polinucleótidos de la presente invención mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, uno o más de los cebadores que se usan en las reacciones de amplificación pueden marcarse de modo que pueda detectarse un amplicón directamente por técnicas convencionales posteriores a la reacción de amplificación. Como alternativa, después de que la reacción de amplificación esté completa se puede añadir una sonda marcada constituida por uno de los cebadores usados en la reacción de amplificación o un tercer polinucleótido diferente de las secuencias del cebador que se ha marcado y que es complementario a una región de la secuencia amplificada. Se deja hibridar la sonda, se lavan todos los complejos y se detecta el marcador. Un experto en la técnica entenderá que, como se ha indicado anteriormente, la etapa (b) del procedimiento anterior se puede repetir varias veces antes de la etapa (c) mediante ciclado térmico de la mezcla de reacción mediante técnicas estándar conocidas en la técnica.

Cualquier producto de la amplificación se puede detectar durante o después de la amplificación. Los procedimientos para detectar la amplificación de una secuencia diana durante la amplificación se describen anteriormente y en Gelfand y col. (Gelfand y col., 1993). Se puede emplear electroforesis en gel para detectar los productos de una reacción de amplificación, así como una aproximación del tamaño de cualquier segmento amplificado. Como alternativa, los productos de amplificación hibridan con las sondas, después se separan de otros componentes de la reacción y se detectan usando micropartículas y sondas marcadas.

Un procedimiento que permita que tanto la amplificación como la detección de secuencias de ácidos nucleicos diana tengan lugar al mismo tiempo en un solo vaso de reacción cerrado es ventajoso. Dicho procedimiento evita el riesgo de contaminación de "arrastré" en las etapas de procesamiento postamplificación y permite ensayos de alto rendimiento y procedimientos automáticos. Además, este tipo de procedimiento permite el control a "tiempo real" de la reacción de amplificación al igual que el control en el "punto-final" más convencional.

La presente invención incluye el uso de los polinucleótidos de las SEC ID N° 1-3 y 5-25 en los procedimientos para amplificar y detectar específicamente secuencias de ácidos nucleicos diana en una muestra de ensayo en un formato de un solo tubo. En una realización, al vaso de reacción se añade un pigmento intercalante (p. ej., verde SYBR) o un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia amplificada. En otra realización, un tercer polinucleótido diferente de las secuencias de cebador, que es complementario a una región de la secuencia amplificada puede incluirse en la reacción como sonda.

Para usar en los ensayos donde tanto la amplificación con cebadores como la detección de dianas con una sonda se producen al mismo tiempo en un solo vaso de reacción cerrado, la sonda posee ciertas propiedades. Por ejemplo, puesto que la sonda está presente durante la reacción de amplificación, la sonda no debería interferir en el progreso de esta reacción y también debería ser estable en las condiciones de la reacción. Para la detección a tiempo real, la sonda debería unirse a su secuencia diana en las condiciones de amplificación y emitir una señal solo tras unirse a la secuencia diana. Ejemplos de moléculas de sonda que son particularmente adecuados para este tipo de procedimiento incluyen sondas de balizas moleculares, sondas TaqMan® y sondas lineales, como las descritas por Abravaya y col. (Abravaya y col., 2005).

Las sondas TaqMan® son sondas de ácidos nucleicos con doble marcaje fluorogénico, compuestas por un polinucleótido complementario a la secuencia diana que está marcado en un extremo con un fluoróforo y en el extremo con un inactivador. Las sondas TaqMan® se pueden usar como sondas de tiempo real en las reacciones de amplificación. Como están contruidos, la cercana proximidad del fluoróforo y el inactivador asegura que el fluoróforo se extinga internamente. Durante la fase de extensión, la sonda es escindida por la actividad nucleasa 5' de la polimerasa y se libera el fluoróforo. El fluoróforo liberado ya no está inactivado y, por tanto, produce una señal detectable.



Las balizas moleculares son sondas polinucleotídicas que forman estructuras tallo-bucle (horquilla). El bucle es una estructura de una sola hebra y contiene secuencias complementarias a la secuencia diana, mientras que el tallo generalmente no está relacionado con la secuencia diana e hibrida consigo mismo para formar una doble hebra. Los nucleótidos que son complementarios a la secuencia diana y pueden hibridar consigo mismos pueden también formar parte de la región del tallo. Un resto de fluoróforo se une a un brazo del tallo y un resto del inactivador se une al otro brazo. Cuando el polinucleótido adopta una forma de horquilla, el fluoróforo y el inactivador están en cercana proximidad y el fluoróforo se inactiva. Tras la unión a la secuencia diana, el fluoróforo y el inactivador se separan y el fluoróforo ya no está inactivado y emite una señal detectable. En una realización, las sondas son sondas de balizas moleculares que comprenden polinucleótidos de la presente invención junto con regiones flanqueantes autocomplementarias. Los polinucleótidos de la presente invención pueden formar la región bucle de la baliza molecular o pueden formar la región bucle y parte de la región tallo. Por tanto, las secuencias del tallo autocomplementarias pueden no estar relacionadas con la secuencia diana y pueden ser parcialmente complementarias a la secuencia diana.

Los polinucleótidos de la presente invención también se pueden usar como sondas lineales junto con un fluoróforo y un inactivador de alta eficacia, como los Black Hole Quenchers (BHQ™; Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA, EE.UU.). La alta eficacia de inactivación y la carencia de fluorescencia nativa de los pigmentos BHQ™ permite que ocurra la inactivación en "ovillo aleatorio" en sondas lineales marcadas en un extremo con un fluoróforo y en el otro con un pigmento BHQ™, asegurando de esta manera que el fluoróforo no emita fluorescencia cuando la sonda está en una solución. Tras la unión a su secuencia diana, la sonda estira el fluoróforo y el inactivador se separan y el fluoróforo ya no está inactivado. Los pigmentos BHQ™ también pueden usarse como el resto inactivador en la baliza molecular o en las sondas TaqMan™.

Fluoróforos e inactivadores adecuados para usar con los polinucleótidos de la presente invención se pueden determinar fácilmente (Marras y col., 1999; Tyagi y col., 1998). Muchos fluoróforos e inactivadores están comercialmente disponibles en, por ejemplo, Molecular Probes (Eugene OR) o Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, EE.UU.). Los ejemplos de fluoróforos útiles incluyen fluoresceína y derivados de fluoresceína tales como dihalo-dialcoxi(C1 a C8)carboxifluoresceína, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), coumarina y derivados de coumarina, sal dipotásica de N-(2-aminoetil)-4-amino-3,6-disulfo-1,8-naftalimida (Amarillo Lucifer), Sulforodamina 101 cloruro de sulfonilo (TEXAS RED™), tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirodamina, pigmentos de cianuro y derivados, etc. Ejemplos de inactivadores incluyen DABCYL, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABSYL), 4'-(4-dimetilaminofenilazofenil-4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida (DABMI), tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), pigmentos BHQ™ y similares. Se pueden usar nanopartículas metálicas para potenciar cualquier señal fluorescente, tales como las de plata y oro. Asimismo, se pueden marcar con moléculas tales como las que están en cercana proximidad del ADN teñido. También se pueden usar PC.

La selección de cebadores para usar con la sonda de baliza molecular requiere cumplir ciertos criterios. Por ejemplo, es importante que no haya áreas de complementariedad que puedan hacer que la baliza molecular se una a un cebador que tenga como resultado una señal de fondo elevada.

Por tanto, los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención se proporcionan además en combinaciones, que comprenden dos cebadores y al menos una sonda, que se pueden usar para amplificar y detectar específicamente secuencias de ácidos nucleicos diana en una muestra de ensayo. En una realización relacionada, los conjuntos de cebadores/sondas se proporcionan para la amplificación y detección de secuencias de ácidos nucleicos diana mediante PCR de baliza molecular.

Las sondas de balizas moleculares se pueden usar para controlar el progreso de una reacción de amplificación a tiempo real. Durante el curso de una reacción de amplificación, la baliza molecular interacciona con su secuencia diana a la temperatura de apareamiento para la sonda y se genera una señal fluorescente. Según aumenta el número de hebras diana producidas en la reacción de amplificación, el número de balizas moleculares unidas a sus dianas aumenta simultáneamente, como también lo hace la fuerza de la señal fluorescente.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las combinaciones de dos cebadores y al menos una sonda pueden usarse en los ensayos de detección, donde la fuerza de la señal detectable se mide al finalizar la reacción de amplificación, o en la detección a tiempo real, donde la señal se controla durante el curso de la reacción de amplificación.

#### *Detección de amplicones múltiple y simultánea*

Los cebadores para CT se pueden usar junto con cebadores para la amplificación de otros marcadores de enfermedad, tales como *Neisseria gonorrhoeae* (NG), para amplificar las secuencias diana de uno o ambos organismos en una única reacción de amplificación. La reacción de coamplificación, seguida de reacciones de hibridación específicas de especie, permite la evaluación simultánea de una muestra de ensayo por infección con CT o NG, o ambos organismos. Tanto NG como CT o CTSW (o ambos, CT y CTSW) se pueden amplificar y/o detectar simultáneamente en una única mezcla de reacción usando una combinación de conjuntos de cebadores/sondas (p.

ej., “uno seleccionado de los conjuntos de cebadores/sondas específicos de CT y otro seleccionado de los conjuntos de cebadores/sondas específicos de NG; en la Tabla 2 se muestran ejemplos. Por supuesto, cada sonda es distinta en términos de detección de cada una de las otra(s) sonda(s). Por ejemplo, si dos o más sondas están presentes en la misma mezcla de reacción, los restos de fluoróforo de cada sonda deberán brillar a diferentes longitudes de onda.

5

TABLA 3  
Secuencias de CT y NG

SEC ID N°	Nombre	Secuencia
28	Directo de CT	gggattcctg taacaacaag tcagg
29	Alternativo Directo de CT	ctgggattcd tgtaacaaca agtcagg
30	Alternativo 2 Directo de CT	gggattcgtg taacaacaag tcagg
31	Inverso de CT	gcttgacga agtactctag gag
32	Sonda de CT	atagcactat agaactctgc aa
33	Sonda alternativa CT	catagcacta tagaactctg caagcc
34	Baliza molecular CT <sup>1</sup>	ctggcatagc actatagaac tctgcaagcc ag
35	Directo de NG	cgacgtaccg gtmtgttc
36	Inverso de NG	cggctcctta ttccgmga cc
37	Sonda de NG	acaccgcccga gaaccgga
38	Sonda alternativa de NG	gaaacaccgc ccggaaccg at
39	Baliza molecular de NG <sup>2</sup>	ctcggacacc gcccggaacc cgag

<sup>1</sup> Contiene bases no bacterianas autocomplementarias (residuos 1-5 y 28-32) para formar un tallo de una baliza molecular en condiciones adecuadas con los residuos 1-5 y 28-32.  
<sup>2</sup> Contiene bases no bacterianas autocomplementarias (residuos 1-5 y 24) para formar un tallo de una baliza molecular en condiciones adecuadas con los residuos 1-5 y 20-24.

10 En una realización, la invención proporciona una combinación de reactivos polinucleotídicos útiles para amplificar y/o detectar CT y CTSW que comprenden un primero y un segundo polinucleótido, donde el primer polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con un polinucleótido de SEQ ID NOs: 1, 5-9, 11-13 o 14, y complementarias de las mismas; y el segundo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con un polinucleótido de las SEC ID N°: 2, 10, 15, 16 y 26, y complementarias de las mismas. El primer y segundo polinucleótidos pueden servir como cebadores en una reacción de amplificación. La combinación de reactivos polinucleotídicos puede incluir además un tercer polinucleótido que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 3, 17-25, 27, 42 y un polinucleótido que comprende  $n$  nucleótidos, donde  $10 \leq n \leq 140$  nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 44 y , y complementarias de las mismas. El tercer polinucleótido puede servir como sonda para hibridar y detectar una secuencia amplificada mediante los polinucleótidos de las SEC ID N° 1, 2, 5-14, 16 y 26 (o complementarias de las mismas) en una reacción de amplificación, por ejemplo.

25 La invención también incluye realizaciones adicionales, donde la combinación de reactivos polinucleotídicos de la primera y segunda realizaciones anteriores enumeradas anteriormente comprenden además un cuarto, un quinto y un sexto polinucleótido, donde la combinación es útil para detectar y/o amplificar CT y CTSW, y donde el cuarto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 28-30 y sus complementarias; el quinto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por la SEC ID N° 31 y una complementaria de la misma; y el sexto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 32-34 y sus complementarias. Para distinguir CT de CTSW, las sondas de las SEQ ID NO : 3 17-25, 27, 42 y 44 se puede marcar con un marcador detectable que emite la señal a una longitud de onda diferente que un marcador detectable sobre las sondas de las SEC ID N° 32-34.

40 La invención también incluye otra realización, donde la combinación de los reactivos polinucleotídicos de las realizaciones primera y segunda indicadas anteriormente comprenden además un cuarto, quinto y sexto polinucleótidos, la combinación útil para detectar y/o amplificar CT, CTSW y NG, donde el cuarto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 100 % con un polinucleótido de la SEC ID N° 35 y su complementaria; el quinto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 100 % con un polinucleótido de la SEC ID N° 36 y una complementaria de la misma; y el sexto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 37-39 y sus complementarias. Para distinguir CT de CTSW, las sondas de las SEQ ID

NO:3, 17-25,27, 42 y 44 se puede marcar con un marcador detectable que emite la señal a una longitud de onda diferente que un marcador detectable sobre las sondas de las SEC ID N° 32-34) y, además, las sondas de NG de las SEC ID N° 37-39 pueden incluir todavía otro tercer marcador detectable que emite a una longitud de onda diferente que las sondas para CT y CTSW.

5 La invención también incluye otra realización, donde la combinación de reactivos polinucleotídicos de las realizaciones primera y segunda que se acaban de enumerar comprenden además un cuarto, un quinto, un sexto, un séptimo, un octavo y un noveno polinucleótido, la combinación útil para detectar y/o amplificar CT, CTSW y NG, el cuarto polinucleótido consiste esencialmente de una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de la secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 28-30 y sus complementarias; el quinto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido de la SEC ID N° 31 y sus complementarias; el sexto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 32, 33 y 34 y sus complementarias; el séptimo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido de la SEC ID N° 35 y una complementara de la misma; el octavo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido de la SEC ID N° 36 o una complementaria de la misma; y el noveno polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 37, 38 y 39 y sus complementarias. Para distinguir CT de CTSW, las sondas de las SEQ ID NOs:3, 17-25, 27, 42 y 44 se puede marcar con un marcador detectable que emite la señal a una longitud de onda diferente que un marcador detectable sobre las sondas de las SEC ID N° 32-34) y, además, las sondas de NG de las SEQ ID NOs:32-34 ; y además, las sondas NG de SEQ ID NOs: 37-39 pueden incluir aún un tercer marcador detectable que emite a una longitud de onda diferente que las sondas para CT y CTSW.

30 En otras realizaciones, al menos un reactivo polinucleotídico puede incluir un marcador o un inactivador detectable.

En otras realizaciones, la invención incluye kits que incluyen la combinación de los polinucleótidos de las realizaciones enumeradas anteriormente, donde el kit también incluye reactivos de amplificación.

35 En otras realizaciones más, la invención incluye procedimientos de amplificar y/o detectar CT, CTSW y/o NG usando la combinación de los reactivos polinucleotídicos de las realizaciones 1-5 enumerados anteriormente. Estas reacciones pueden incluir además al menos un polinucleótido control, positivo y/o negativo, así como para los que se pueden usar para normalización. Sin embargo, al detectar CT o CTSW, si la reacción consiste en 7,5 unidades de una DNA polimerasa, Tris-HCl 15 mM, pH 8.0, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 9,5 mM, dNTP 0,2 mM, 500 nM del primer y segundo polinucleótidos y ROX 60 nM, por tanto, si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o una complementaria de la misma, el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 16 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 23 o una complementaria de la misma;

45 si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o una complementaria de la misma, entonces el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no lo hace consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 22 o una complementaria de la misma

50 si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8 o 9 o sus complementarias, entonces el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 10 o 26 o sus complementarias, y si el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17 o una complementaria de la misma;

55 si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5 o 6 o sus complementarias, entonces el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 10 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 19 o una complementaria de la misma; y

60 si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 14 o una complementaria de la misma, entonces el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no lo hace consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 22 o una complementaria de la misma

#### *Cuantificación*

65 Los polinucleótidos de las SEC ID N° 1-3 y 5-25 también se pueden usar en los ensayos para cuantificar ácidos nucleicos de CT y CTSW. Por tanto, los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención se pueden usar en un procedimiento para amplificar, detectar y cuantificar específicamente secuencias de ácido nucleico diana en una muestra de ensayo.

*Controles*

Se dispone de varios tipos de patrones para ensayos cuantitativos. Por ejemplo, el patrón puede consistir en una curva patrón que se obtiene mediante la amplificación y detección de cantidades conocidas de ácidos nucleicos de CT o CTSW en las condiciones del ensayo. Como alternativa, se puede incluir un patrón interno en la reacción. Dichos patrones internos generalmente comprenden una secuencia de ácidos nucleicos diana control y una sonda polinucleotídica control. El patrón interno puede además incluir opcionalmente un par adicional de cebadores. La secuencia primaria de estos cebadores control puede no estar relacionada con los polinucleótidos de la presente invención y ser específica para la secuencia de ácidos nucleicos diana control. Como alternativa, no se necesita usar un cebador adicional si la secuencia diana control se diseña de modo que se une a un extremo con un cebador de un primer conjunto de cebadores/sondas dirigido a una primera secuencia diana (por ejemplo, CT), y se une al otro extremo con un cebador de un segundo conjunto de cebadores/sondas dirigido a una segunda secuencia diana (por ejemplo, NG), de modo que las copias se generarán en condiciones de amplificación.

En el contexto de la presente invención, una secuencia de ácidos nucleicos diana control es una secuencia de ácidos nucleicos que:

(a) puede amplificarse por un cebador de CT o CTSE o por un par de cebadores que se usan en una reacción particular o por diferentes cebadores control;

(b) hibrida específicamente con la sonda control en las condiciones adecuadas; y

(c) no hibrida con una sonda específica CT o CTSW en las mismas condiciones.

En el contexto de la presente invención, además de satisfacer los requisitos estándar para las moléculas sonda, la sonda polinucleotídica control para usarse en reacciones de cuantificación:

(a) hibrida específicamente con la secuencia control en las condiciones adecuadas;

(b) cuando se está detectando una secuencia diana de CT o CTSE, no hibrida en las mismas condiciones con una secuencia de CT o CTSW, con la sonda específica de CT O SW o con los cebadores específicos de CT o CTSW;

(c) incorpora un marcador detectable que es diferente del marcador incorporado en otras sondas usadas en la misma mezcla de reacción.

La secuencia real de ácidos nucleicos del ácido nucleico diana control y de la sonda control no es importante, siempre que ambas cumplan los criterios indicados anteriormente.

La cantidad de ácido nucleico diana en una muestra de ensayo se puede cuantificar usando procedimientos de "punto final" o procedimientos de "tiempo real". Cuando los polinucleótidos de las SEC ID N° 1-3 y 5-25 se usan como sondas en ensayos cuantitativos, se pueden usar como sondas de hibridación convencionales, sondas lineales BHQT®, sondas TaqMan®, sondas balizas moleculares o combinaciones o versiones modificadas de las mismas.

*Ensayos de alto rendimiento*

Para los ensayos de alto rendimiento, los componentes de la reacción se encuentran normalmente en un transportador o plataforma multicontenedor, tal como una placa multipocillos de microtitulación, que permita una pluralidad de reacciones de ensayo que contienen diferentes muestras de ensayo a controlar en el mismo ensayo. La presente invención también contempla ensayos de alto rendimiento altamente automatizados para aumentar la eficacia del proceso de detección selectiva o ensayo. En estos momentos se dispone comercialmente de muchos sistemas de alto rendimiento, como también lo están las capacidades de automatización para muchos procedimientos tales como, por ejemplo la extracción de muestra y reactivo usando una pipeta, la dispensación de líquidos, las incubaciones temporizadas, el formateado de muestras en micromatrices, el termociclado en microplaca y las lecturas en microplaca en un detector apropiado, dando como resultado unos tiempos de rendimiento mucho más rápidos.

*Kits*

Los polinucleótidos de las SEC ID N° 1-3 y 5-25 se pueden incluir como parte de los kits que permiten la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos de CT y CTSW. Dichos kits comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención para usar como cebador y/o sonda. En una realización de la presente invención, se proporcionan los polinucleótidos en combinaciones en los kits para su uso como cebadores para amplificar específicamente los ácidos nucleicos de CT y CTSW en una muestra de ensayo, como se muestra en la Tabla 2. Como se ha indicado anteriormente, solo los conjuntos de la Tabla 2 correspondientes a las combinaciones 41, 42, 43, 117, 118 y 119 son

parte de la invención.

Los kits para la detección de ácidos nucleicos de CT y CTSW pueden incluir también un ácido nucleico diana control y una sonda polinucleotídica control. Los kits también pueden incluir cebadores control que amplifican específicamente una secuencia de ácido nucleico diana control.

Los kits también pueden incluir reactivos de amplificación, componentes de la reacción y/o vasos de la reacción. Uno o más de los polinucleótidos puede incorporar un marcador detectable. Los kits también pueden incluir reactivos para marcar los polinucleótidos. Uno o más de los componentes del kit puede estar liofilizado y además el kit puede incluir reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados. El kit puede contener adicionalmente instrucciones de uso.

Cuando se suministra un kit, los diferentes componentes de la composición pueden estar envasados en contenedores diferentes y mezclados antes de usar. Dicho envasado de los componentes por separado puede permitir la conservación a largo plazo de los componentes activos. Por ejemplo, una o más de las partículas que tienen polinucleótidos unidos a las mismas; el sustrato y la enzima del ácido nucleico se suministran en contenedores distintos.

Los reactivos incluidos en los kits se pueden suministrar en contenedores de cualquier tipo de modo que los diferentes componentes se conserven y no se adsorban o alteren por acción de los materiales del contenedor. Por ejemplo, ampollas de cristal selladas pueden contener uno o más de los reactivos o tampones que se han envasado en gas neutro no reactante, tal como nitrógeno. Las ampollas pueden estar compuestas por cualquier material adecuado, tal como cristal, polímeros orgánicos, tales como policarbonato, poliestireno etc.; cerámica, metal o cualquier otro material usado habitualmente para contener reactivos similares. Otros ejemplos de contenedores adecuados incluyen simples botellas que se pueden fabricar a partir de sustancias similares como ampollas y sobres, que pueden tener interiores revestidos de lámina de metal, tal como aluminio o una aleación. Otros contenedores incluyen tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringuillas etc.

Los kits también se pueden suministrar con materiales de instrucciones. Las instrucciones se pueden imprimir en papel u otro sustrato y/o se pueden suministrar como medio de lectura electrónica, como un disquete, CD-ROM, DVD-ROM, disco Zip, cinta de video, cinta de audio etc.

Los polinucleótidos, procedimientos y kits de la presente invención son útiles en contextos clínicos o de investigación para la detección y/o cuantificación de los ácidos nucleicos de CT y CTSW. Por tanto, en estos contextos, los polinucleótidos se pueden usar en ensayos para diagnosticar infección por CT y CTSW en un sujeto o para monitorizar la cantidad de una secuencia de ácido nucleico diana de CT y CTSW en un sujeto infectado por CT y CTSW. La monitorización de la cantidad de bacterias en un sujeto es particularmente importante en la identificación o monitorización de la respuesta a la terapia antibacteriana, aunque dado que los ensayos pueden detectar bacterias muertas recientemente es importante indicar el tiempo del ensayo con respecto a la intervención terapéutica.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben considerarse limitantes de la invención reivindicada. Existen diversas técnicas y procedimientos alternativos disponibles para los expertos en la técnica, que, de un modo similar, permitirían realizar con éxito la invención indicada. Los ejemplos siguientes son parte de la invención en la medida donde están dentro de las reivindicaciones adjuntas.

### Ejemplo 1 Detección selectiva de combinaciones candidatas de cebadores/sondas de CTSW

Se analizaron cebadores/sondas recién diseñadas a diferentes combinaciones para amplificación y detección específica de CT. En total, se analizaron veintisiete secuencias como cebadores o sondas y se incluyen en las SEC ID N° 1-3, 5-25, 26, 27 y 43 (Tabla 1). Se prepararon ciento cincuenta conjuntos de combinaciones diferentes (Tabla 2). Todas las sondas candidatas se marcaron con QUASAR™ Q670 (BioSearch Technologies, Inc.; Novato, CA) (una sustitución CY5™; Biosearch Technologies; Novato, CA; EE.UU.) y BHQ-2™ (BioSearch Technologies) como inactivador, con la excepción de la SEC ID N° 43. Este último se marcó con 6-carboxi-fluoresceína (FAM™; Applied Biosystems; Foster, CA; EE.UU.) y BHQ-1™ (Applied Biosystems) como inactivador. Se realizaron varias diluciones diferentes de la preparación del ADN genómico de CT y se usaron como diana, y el diluyente negativo para CT/NG se usó como control negativo para cada conjunto de cebadores/sondas.

Se preparó una mezcla maestra para cada combinación de cebadores/sondas (.5 U AM PMAQ™ Gold, Tris-HCl 15 mM, pH 8. KCl 0,50 mM, MgCl<sub>2</sub> 9,5 mM, dNTP 0,2 mM, 500 nM de cada cebador analizado, sonda 200 nM y ROX 60 nM). Las muestras se cargaron en la placa de reacción óptica y se sellaron. Después, la placa se cargó en el dispositivo del cicladador/lector y se sometió a condiciones de ciclado como se especifica en el *Ejemplo 2*.

Las condiciones de ciclado de PCR para todos los ejemplos incluyeron un ciclo de 95 °C durante 570 segundos y, después, 45 ciclos de 92 °C durante 10 segundos, 58 °C durante 30 segundos y 65 °C durante 60 segundos. El

dispositivo que se usó para PCR y detección en tiempo real fue el ciclador/lector Abbott m2000rt (un instrumento de amplificación detección integrado REALTIME™ PCR).

5 A la concentración del componente para PCR analizada y la condición de ciclado, 145 combinaciones diferentes de cebadores/sondas de un total de 154 dieron una amplificación y una detección sólidas en tiempo real. Las nueve combinaciones restantes no generaron curvas de amplificación, dieron resultados ambiguos, tuvieron malas proporciones señal:ruido o no eran replicables. Estas nueve combinaciones eran 4, 5, 11, 12, 19, 20, 47, 48 y 91, que requerirían optimización adicional.

10 **Ejemplo 2 Análisis de cebadores/sondas de CTSW**

En este ejemplo, los conjuntos de cebadores/sondas recién diseñados para acomodar la variante de detección de CT suiza recién descubierta se analizaron para determinar la especificidad y la solidez contra los reactivos oligonucleotídicos de CT/NG actuales proporcionados en el kit diagnóstico de Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, EE.UU.) REALTIME™ CT/NG. El reactivo oligonucleotídico de CT/NG contiene 6 cebadores y 3 sondas (cebadores para CT, NG y un control interno (CI) y sondas para CT, NG y el CI). La sonda de Ct original se marcó con 6-carboxi-fluoresceína (FAM™; Applied Biosystems; Foster, CA; EE.UU.). Las sondas candidatas usaron QUASAR™ Q670 (sustitución CY5™; BioSearch Technologies; Novato, CA; EE.UU.) como fluoróforo y BHQ-2™ (BioSearch Technologies) como inactivador.

20 Las secuencias del cebador y la sonda para las actuales CT/NG se muestran en la Tabla 4.

Oligonucleótido	SEC ID N°	Marcadores
Cebador directo de CT	28	NA
Cebador inverso de CT	31	NA
Sonda de CT	33	5'-FAM™ <sup>1</sup> ; 3'-BHQ-1™
Cebador directo de NG	35	NA
Cebador inverso de NG	36	NA
Sonda de NG	37	5'-VIC™ <sup>2</sup> ; 3'-BHQ-1™
Cebador directo del CI	40	NA
Cebador inverso del CI	41	NA
Sonda del CI	42	5'-NED™ <sup>3</sup> ;BHQ-2™
<sup>1</sup> FAM™ (excitación a 495 nm; emisión a 515 nm) <sup>2</sup> VIC™ (excitación a 535 nm; emisión a 555 nm) <sup>3</sup> NED™ (excitación at 550 nm; emisión a 570 nm)		

25 Los cebadores candidatos para detectar CT y CTSW eran las SEC ID N° 1 y 2, y la sonda fue la SEC ID N°: 3. SEC ID N° 3 se marcó en el extremo 5' con QUASAR™ Q670 y el inactivador con BHQ-2™ en el extreme 3'. La Tabla 5 a continuación resume los reactivos usados en este y en todos los ensayos descritos en estos Ejemplos (según sea necesario).

30 **TABLA 5**  
Resumen de los reactivos usados en los Ejemplos (a menos que se indique lo contrario)

Reactivo (todos de Abbott Laboratories), a menos que se indique lo contrario)	Número de catálogo
Placa de 96 pocillos para reacción óptica con código de barras (código 128) (ABI Prism; Foster City, CA; EE.UU.)	4J71-70
Reactivo de activación para CT/NG (Abbott Laboratories) (MgCl <sub>2</sub> , tampón Tris pH 8,0, KCl, EDTA y EGTA)	2G28M0 099
Reactivo de amplificación de CTNG Fill/Label (Abbott Laboratories) (tampón Tris pH 8,0, 6 cebadores y 3 sondas (véase la Tabla 4), ROX (carboxi-X-rodamina), dNTP, KCl, EDTA y EGTA) ("mezcla de reacción CT/NG")	2G28L00 99
Preparación de ADN genómico de CT (interno)	N/A
Control de corte de CT/NG (plásmidos linearizados que contienen CT y NG dianas a las concentraciones designadas en TE1 a pH 8,0 y ADN de testículos de salmón como vehículo)	2G28A
Reactivo enzimático de CT/NG (Abbott Laboratories) (AMPLITAQ™ Gold)	3379400 99

Reactivo (todos de Abbott Laboratories), a menos que se indique lo contrario)	Número de catálogo
Diluyente negativos de CT/NG (Abbott Laboratories) (tampón TE, pH 8,0 y ADN de testículos de salmón como vehículo)	31980
Control interno de PCR de CT/NG (IC Abbott Laboratories) (plásmidos linearizados que contienen una secuencia de calabaza no relacionada con el analito de CT/NG en TE a pH 8,0 y ADN de testículos de salmón como vehículo)	8100/2G 28Y
Bandeja de pocillos hondos (ABI Prism)	04J71-30
Sistema de preparación de muestras de ADN	06K11- 24
Vaso de reacción (Sarstedt; Newton, NC, EE.UU.)	55.526.0 44

<sup>1</sup>TE =Tris-HCl/10 mM, EDTA 1 mM

TABLA 6  
Resumen De los componentes y concentraciones para PCR<sup>1</sup>

Componente	Concentración final
AMPLITAQ™ Gold	7,5 Unidades
Tris-HCl, pH 8,0	15 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	9,5mM
dNTP	0,6 mM cada uno
Cebadores para PCR (CT, NG, CI y CT candidato)	500 nM cada uno
Provees (CT, NG, CI y CT candidato)	200 nM cada uno
ROX	75 nM

<sup>1</sup>El volumen de reacción final fue 50 µl.

5 Las condiciones de ciclado de PCR para todos los ejemplos incluyeron un ciclo de 95 °C durante 570 segundos y, después, 45 ciclos de 92 °C durante 10 segundos, 58 °C durante 30 segundos y 65 °C durante 60 segundos. El dispositivo que se usó para PCR y detección en tiempo real fue el ciclador/lector Abbott m2000rt (un instrumento de amplificación detección integrado REALTIME™ PCR).

10 Se analizaron veinticuatro aislamientos clínicos de CTSW de Suecia. El ADN se purificó de muestras clínicas usando procedimientos conocidos y la técnica y se suministró a Abbott Laboratories. En este Ejemplo, los reactivos del kit diagnóstico REALTIME™ CT/NG (Tabla 4) se contaminaron con los cebadores y sondas de CTSW.

15 Se preparó una mezcla maestra y contenía un total de 8 cebadores y 4 sondas (véase la composición en la Tabla 5); el CI se añadió después a la mezcla para crear una concentración final del CI de copias/reacción. A cada pocillo de la placa se añadieron 475 µl de la mezcla final. Por último, a los pocillos se añadieron 2,5 µl de los eluatos de las 24 variantes de delección, de modo que cada eluato se sometió a las condiciones de reacción de forma individual. La placa de reacción se selló y, después, se introdujo en un ciclador/lector de Abbott m2000rt y se sometió a las condiciones de ciclado.

20 Para cada muestra se detectó una señal CY5™, lo que indica que los cebadores que tienen la secuencia de las SEC ID N° 1 y 2 amplificaron la región diana de los plásmidos de la cepa de CTSW y se detectó mediante la sonda que tiene la secuencia de la SEC ID N° 3 y que habían sido marcados con CY5™. Los controles negativos (que no contienen molde) no mostraron señales, lo que sugiere que la amplificación era específica. Todas las muestras generaron respuestas de CI válidas.

### Ejemplo 3 Valoración del posible impacto sobre la amplificación de las dianas actuales de CT, NG y CI

30 La finalidad de este ejemplo era demostrar que los cebadores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 1 y 2, combinados con la sonda que tiene la secuencia de SEC ID N° 3 y los cebadores que tienen la secuencia de las SEC ID N° 14 y 15, combinados con la sonda que tiene la secuencia de SEC ID N° 3 no interfieren con los cebadores y sondas usados actualmente en una versión comercializada de detección de CT no CTSW y NG.

35 Se formularon tres mezclas maestro, cada una suficiente para 48 reacciones. La mezcla 0 (MM0) solo contenía los cebadores y sondas de CT y NG disponibles comercialmente (véase la Tabla 4). Las otras mezclas tenían los cebadores y sondas de CT y NG y estaban contaminadas con uno de los dos conjuntos de cebadores y sondas candidatas para CT. Mezcla 1 (MM1) tenía las SEC ID N° 1, 2 (cebadores de CTSW) y 3 (sonda de CTSW) y la Mezcla 4 (MM4) tenía las SEC IDN N° 14, 15 cebadores de CTSW y 3 (sonda de CTSW). Las sondas candidatas se marcaron en el extremo 5' con QUASAR™ Q670 y el inactivador con BHQ-2™ en el extremo 3'. Las

concentraciones para cebadores y sondas son como se indica en la Tabla 5. A cada mezcla se añadió el CI para crear una concentración final del CI de 84 copias/reacción. El valor de corte de CT/NG control con respecto al kit control de CT/NG REALTIME™ (Abbott Laboratories) se analizó como muestra para las tres mezclas.

5 Las muestras se cargaron en la placa de reacción óptica y se sellaron. Después, la placa se cargó en el dispositivo del ciclador/lector y se sometió a condiciones de ciclado como se especifica en el *Ejemplo 2*.

10 La adición de la SEC ID N° 3 de sonda y las SEC ID N° 1, 2, 14 y 15 de cebadores no afectó a la amplificación de las dianas (CT, NG o CI dianas actuales) por la diferencia en la señal detectada entre la Mezcla 0 y las Mezclas 1 y 4 no difirieron significativamente.

**Ejemplo 4 Valoración del potencial de introducir amplificación no específica**

15 En este experimento se analizó la hipótesis de que los controles negativos no se amplifican con los cebadores/sonda de la invención.

20 Se preparó una mezcla maestra (MM1) introduciendo en la mezcla de reacción de CT/NG disponible comercialmente con las SEC ID N° 1 y 2, combinados con la sonda que tiene la secuencia de SEC ID N° 3. La SEC ID N° 3 de la sonda de CT se marcó en el extremo 5' con QUASAR™ Q670 y el inactivador con BHQ-2™ en el extremo 3'. Las concentraciones para cebadores y sondas son como se indica en la Tabla 6. A cada mezcla se añadió el CI para crear una concentración final del CI de 84 copias/reacción.

25 El diluyente negativo se analizó como muestras negativas a 94 duplicados por placa de muestras para PCR junto con dos duplicados de los controles positivos. Los controles positivos se prepararon a partir de una dilución de una preparación de ADN genómico de CT y 25 µl de las preparaciones positivas para el genoma de CT. Las muestras se cargaron en la placa de reacción óptica y se sellaron. Después, la placa se cargó en el dispositivo del ciclador/lector y se sometió a condiciones de ciclado como se especifica en el *Ejemplo 2*. La placa se analizó después para determinar la señal del fluoróforo, analizando con FAM™, VIC™ y CY5™. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7.

30

TABLA 7  
Resultados de los experimentos que analizan la amplificación no específica

Ciclo	FAM™	VIC™	CY5™
1	94/94 no reactivo	1/94 ligeramente elevado, 93/94 no reactivo	94/94 no reactivo
2	94/94 no reactivo	1/94 reactivo MR -0,17 FCN ~41 1 /94 ligeramente elevado, 92/94 no reactivo	1/94 ligeramente elevado, 1/94 reactivo MR -0,16 FCN ~41, 92/94 no reactivo
3	1/94 reactivo MR -0,1 FCN ~40 93/94 no reactivo	94/94 no reactivo	94/94 no reactivo
4	94/94 no reactivo	1/94 elevado 93/94 no reactivo	94/94 no reactivo
5	1/94 elevado 93/94 no reactivo	94/94 no reactivo	94/94 no reactivo
6	94/94 no reactivo	94/94 no reactivo	94/94 no reactivo
7	94/94 no reactivo	94/94 no reactivo	94/94 no reactivo

35 Esporádicamente se observaron niveles bajos de las señales CT FAM™, NG VIC™ y CT CY5™ en los ciclos 1-3, como se muestra en la Tabla 7. Para determinar si había contaminación del ambiente del laboratorio, se lavaron todas las bancadas del laboratorio con lejía y el experimento se repitió cuatro veces más (ciclos 4-7 en la Tabla 7). De un total de 376 duplicados de muestras negativas (ciclos 4-7), un duplicado mostró un nivel bajo de amplificación tardía en FAM™ y otro duplicado mostró un nivel bajo de amplificación tardía en VIC™. Los demás duplicados produjeron una señal de amplificación en los tres canales (FAM™, VIC™ y CY5™). Ambas incidencias de amplificación de bajo nivel tenían un número de ciclos tardío y no se habrían notificado como positivos en el ensayo REALTIME™ CT/NG disponible comercialmente. Los controles positivos produjeron curvas de amplificación positivas válidas.

45 Excepto por alguna señal esporádica de bajo nivel, todas las repeticiones de los controles negativos no produjeron señales en los tres canales. Por tanto, la adición de los cebadores que tienen la secuencia de las SEC ID N° 1 y 2, y la sonda que tiene la secuencia de SEC ID N° 3 a la mezcla de reactivos de oligonucleótidos de CT/NG (Tabla 4) no produjeron ninguna señal elevada en ninguno de los canales.

50



**Ejemplo 5 Valoración de la potencial diferencia en la detección de dianas de CT de nivel bajo entre el conjunto de cebadores/sondas candidatos original y nuevo**

En este ejemplo, el conjunto de cebadores/sondas que tienen las secuencias de las SEC ID N° 1-3 se analizó para determinar la sensibilidad usando tres diluciones diferentes de la preparación de ADN genómico de CT (ADN diluido en TE a pH 8,0 y ADN de testículo de salmón como vehículo). Las diluciones relativas fueron 1,1:7,5 y 1:50, lo que crea muestras que imitan los niveles bajos de CT de las muestras de pacientes.

Se preparó una mezcla maestra (MM1) introduciendo en la mezcla de reacción de CT/NG para PCR disponible comercialmente (Tabla 4) con las SEC ID N° 1 y 2, combinados con la sonda que tiene la secuencia de SEC ID N° 3. La SEC ID N° 3 de la sonda de CT se marcó en el extremo 5' con QUASAR™ Q670 y el inactivador con BHQ-2™ en el extremo 3'. Las concentraciones para cebadores y sondas fueron como se indica en la Tabla 6. A cada mezcla se añadió el CI para crear una concentración final del CI de 84 copias/reacción. Las muestras se cargaron en la placa de reacción óptica y se sellaron. Después, la placa se cargó en el dispositivo del ciclador/lector y se sometió a condiciones de ciclado como se especifica en el *Ejemplo 2*. La placa se analizó después para determinar la señal del fluoróforo (FAM™ y CY5™). Los resultados se muestran más adelante en las tablas 8 y 9.

20 TABLA 8  
Indicaciones para el número de ciclo para la dilución 1X de la preparación de ADN genómico de CT

Canal	FAM™		CY5™	
	Número medio de ciclo (n=28)	SD	Número medio de ciclo (n=28)	SD
Botella 1	34,91	0,151	3422	0,152
Botella 2	35,09	0,179	3432	0,184
Media Grade	35,00		3427	

25 TABLA 9  
Diferencia media en el número de ciclo entre el ADN genómico de CT más diluido y la dilución 1x

	Botella 1	Botella 2
FAM™ (1:7,5 dilución diana)	2,69	2,82
CY5™ (1:7,5 dilución diana)	2,68	2,87
FAM™ (1:50 dilución diana)	3,9	4,04
CY5™ (1:50 dilución diana)	3,89	4,29

Las botellas 1 y 2 eran dos preparaciones manuales diferentes de la misma mezcla maestra MM1. Como se muestra en la Tabla 8, se observaron pocas diferencias entre las dos botellas de las CALLS del número de ciclo medio para FAM™ y CY5™. Se observó un ligero retraso del número de ciclos medios en FAM™ en comparación con el canal CY5™. Para las muestras más diluidas de la preparación de ADN genómico de CT, la Tabla 9 muestra la diferencia media en el número de ciclos entre las diluciones 1:7,5 o 1:50 y la de la dilución 1x. En cada caso, la Tabla 9 muestra que se observaba un ligero retraso del número de ciclo en la botella 2 en ambos canales FAM™ y CY5™. Por tanto, a cada nivel diana, con independencia de la dilución, el rendimiento del ensayo fue similar, con independencia del marcador (FAM™, CY5™).

**Ejemplo 6 Detección de todas las serovariedades de CT**

Habiendo demostrado que la combinación de cebadores/sondas que tienen las SEC ID N° 1-3 son sensibles y específicos de los moldes control, se analizó la capacidad de la combinación de cebadores/sondas para detectar CT en diferentes serovariedades (CT que difieren en su composición proteica como se expresa en sus superficies celulares). Se analizaron dieciséis serovariedades a 100 copias/reacción y se compararon con los controles negativos. Si la combinación de cebadores/sondas amplificó y detectó la región diana de las serovariedades se genera una señal, de lo contrario, solo se observaría la señal de fondo igual a la generada por los controles negativos.

Se formularon dos mezclas maestras: La Mezcla 0 solo contenía los cebadores y sondas de CT y NG disponibles comercialmente (Tabla 4), mientras que la MM1 se preparó introduciendo la mezcla de reacción de CT/NG disponible comercialmente con las SEC ID N° 1 y 2, combinados con la sonda que tiene la secuencia de SEC ID N° 3. La SEC ID N° 3 de la sonda de CT se marcó en el extremo 5' con QUASAR™ Q670 y el inactivador con BHQ-2™ en el extremo 3'. Las concentraciones para cebadores y sondas fueron como se indica en la Tabla 6. A cada mezcla se añadió el CI para crear una concentración final del CI de 84 copias/reacción. Las muestras se cargaron en la placa de reacción óptica y se sellaron. Después, la placa se cargó en el dispositivo del ciclador/lector y se sometió a condiciones de ciclado como se especifica en el *Ejemplo 2*. La placa se analizó después para determinar la señal del

fluoróforo (FAMTM y CY5™).

La señal se observó en todas las muestras que contienen ADN de diferentes serovariedades de CT, mientras que los controles negativos no mostraron señal. Por tanto, la combinación de cebadores/sondas que tienen la secuencia de las SEC ID N° 1-3 detectó las 16 serovariedades analizadas.

#### Ejemplo 7 Detección selectiva usando un panel de potenciales sustancias de reactividad cruzada

En este ejemplo se analizó la reactividad cruzada del conjunto de cebadores/sondas que tienen las secuencias de las SEC ID N° 1-3 (MM1 como en el Ejemplo 6). El rendimiento de cada conjunto de cebadores se analizó con 107 potenciales organismos de reactividad cruzada. Las cepas se recogieron como paneles de reactividad cruzada del ensayo de PCR CT/NG REALTIME™.

La lista de potenciales organismos de reacción cruzada se muestra más adelante en la Tabla 10.

TABLA 10  
Potenciales organismos de reacción cruzada analizados

ID	Nombre de la cepa	ID	Nombre de la cepa
001	<i>Achromobacter xerosis</i>	054	<i>Lactobacillus brevis</i>
002	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	055	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>
003	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	056	<i>Lactobacillus jensonii</i>
004	<i>Actinomyces israelii</i>	057	<i>Legionella pneumophila</i>
005	<i>Aerococcus viridans</i>	058	<i>Listeria monocytogenes</i>
006	<i>Aeromonas hydrophila</i>	059	<i>Micrococcus luteus</i>
007	<i>Alcaligenes faecalis</i>	060	<i>Mobifuncus mulieris</i>
008	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	061	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>
009	<i>Bacillus subtilis</i>	062	<i>Moraxella lacunata</i>
010	<i>Bacteroides fragilis</i>	063	<i>Moraxella osloensis</i>
011	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	064	<i>Morganella morganii</i>
012	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	065	<i>Mycobacterium gordonae</i>
013	<i>Bifidobacterium breve</i>	066	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
014	<i>Brevibacterium linens</i>	067	<i>Mycoplasma genitalium</i>
015	<i>Campylobacter jejuni</i>	068	<i>Mycoplasma bovis</i>
016	<i>Candida albicans</i>	069	<i>Neisseria flava</i>
017	<i>Candida glabrata</i>	070	<i>Neisseria meningitidis-A</i>
018	<i>Candida parapsilosis</i>	071	<i>Neisseria meningitidis-B</i>
019	<i>Candida tropicalis</i>	072	<i>Neisseria meningitidis-C</i>
020	<i>Chlamydia psittaci</i>	073	<i>Neisseria meningitidis D</i>
021	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	074	<i>Neisseria perflava</i>
022	<i>Chromobacterium violaceum</i>	075	<i>Pantoea agglomerans</i>
023	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	076	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
024	<i>Citrobacter freundii</i>	077	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
025	<i>Clostridium sporogenes</i>	078	<i>Proteus mirabilis</i>
026	<i>Corynebacterium genitalium</i>	079	<i>Proteus vulgaris</i>
027	<i>Corynebacterium xerosis</i>	080	<i>Providencia stuartii</i>
028	<i>Cryptococcus neoformans</i>	081	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
029	<i>Cytomegalovirus</i>	082	<i>Pseudomonas putida</i>
030	<i>Deinococcus radiodurans</i>	083	<i>Rahnella aquatilis</i>
031	<i>Derxia gummosa</i>	084	<i>Rhizobium radiobacter</i>
032	<i>Eikenella corrodens</i>	085	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
033	<i>Enterobacter cloacae</i>	086	<i>Ruminococcus productus</i>
034	<i>Enterobacter aerogenes</i>	087	<i>Salmonella Minnesota (choleraesnis)</i>
035	<i>Enterococcus avium</i>	088	<i>Salmonella typhimurium</i>
036	<i>Enterococcus faecalis</i>	089	<i>Serratia marcescens</i>
037	<i>Enterococcus faecium</i>	090	<i>Staphylococcus aureus</i>
038	<i>Escherichia coli</i>	091	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
039	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	092	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
040	<i>Gardnerella vaginalis</i>	093	<i>Streptococcus agalactiae</i>
041	<i>Gemella haemolysans</i>	094	<i>Streptococcus bovis</i>
042	<i>Haemophilus ducreyi</i>	095	<i>Streptococcus mitis</i>
043	<i>Haemophilus influenzae</i>	096	<i>Streptococcus mutans</i>
044	<i>Helicobacter pylori</i>	097	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
045	<i>Herpes Simplex Virus, type I</i>	098	<i>Streptococcus pyogenes</i>
046	<i>Herpes Simplex Virus, type II</i>	099	<i>Streptococcus salivarius</i>
047	<i>Human Papilloma Virus 16</i>	100	<i>Streptococcus sanguinis</i>

ID	Nombre de la cepa	ID	Nombre de la cepa
048	<i>Human Papilloma Virus 18</i>	101	<i>Streptomyces griseinus</i>
049	<i>Kingella dentrificans</i>	102	<i>Trichomonas vaginalis</i>
050	<i>Kingella kingae</i>	103	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
051	<i>Klebsiella oxytoca</i>	104	<i>Veillonella parvula</i>
052	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	105	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
053	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	106	<i>Weissella ramensenteroides</i>
		107	<i>Yersinia enterocolitica</i>

La SEC ID N° 3 de la sonda de CT se marcó en el extremo 5' con QUASAR™ Q670 y el inactivador con BHQ-2™ en el extremo 3'. Las concentraciones para cebadores y sondas son como se indica en la Tabla 6. A cada mezcla se añadió el CI para crear una concentración final del CI de 84 copias/reacción. Veinticinco µl de la mezcla maestro y 25 µl del diluyente negativo se añadieron a cada pocillo, que se designó par alas muestras de potenciales organismos de reacción cruzada o controles negativos. A los pocillos designados como una potencial muestra de reacción cruzada se añadieron 1,1 µl del AND de reacción cruzada (cada organismo de reacción cruzada de n= 3) y se añadieron 25 µl del AND genómico de CT a los pocillos que se usaron como controles positivos. Se selló la bandeja y después se cargó en un ciclador/lector Abbott m2000rt y se sometió a condiciones de ciclado como se especifica en el *Ejemplo 2*. La placa se analizó después para determinar la señal del fluoróforo (FAM™ y CY5™).

Todos los potenciales organismos de reacción cruzada no fueron reactivos excepto las cinco cepas mostradas más adelante en la Tabla 11, que exhibieron una señal VIC™ elevada. Cada muestra se analizó a  $2 \times 10^6$  moléculas/reacción.

TABLA 11  
Cepas de reacción cruzada analizada a  $2 \times 10^6$  moléculas/reacción.

ID	Resultados de CY5™	Resultados DE VIC™	Resultados de FAM™
10	NR	1/3 reactivo w/MRB -0,14, FCNB -37-38	NR
21	NR	3/3 reactivo w/MRB -0,14-0,15, FCNB -37-38	NR
70	NR	3/3 reactivo w/ MRB -0,15, FCNB -35	NR
71	NR	3/3 reactivo w/ MRB -0,15, FCNB -36-37	NR
89	NR	2/3 reactivo w/MRB-0,09, FCNB-39, 1/3 pocillos con MRB-0,11, FCNB-43	NR

NR, no reactivo  
MRB y FCNB son la proporción máxima y el número de ciclo fraccional, respectivamente. Ambos son resultados del análisis de la forma de la curva de la amplificación por PCR.

Las cepas enumeradas en la Tabla 11 se sometieron después a otra ronda de análisis para compararlas con los reactivos para MM0 y MM1 (como en el *Ejemplo 6*). Estas cepas se analizaron a  $1 \times 10^6$  y  $3,3 \times 10^5$  moléculas/reacción. Los resultados de este segundo conjunto de análisis se muestran a continuación en la Tabla 12.

TABLA 12  
Resultados de la repetición del ensayo de potenciales cepas con reactividad cruzada

ID de la cepa	CY5™	MM0 VIC™	FAM™	CY5	MM1 VIC™	FAM™
10	NR	NR	NR	NR	$1 \times 10^6$ : 2/3 Reactivo; MRB ~ 0,08 - 0,1, FCNB ~ 40; $3,3 \times 10^5$ : 3/3 NR	NR
21	NR	$1 \times 10^6$ : 3/3 Reactivo MRB ~0,13 - 0,15, FCNB - 37 – 39; $3,3 \times 10^5$ : 1/3 Reactivo MRB ~0,12, FCNB - 42	NR	NR	$1 \times 10^6$ : 2/3 Reactivo MRB ~ 0,14 - 0,15, FCNB ~ 39 – 41; $3,3 \times 10^5$ : 2/3 Reactivo MRB 0,14, 0,07, FCNB 40,44	NR
70	NR	$1 \times 10^6$ : 3/3 Reactivo MRB - 0,15, FCNB - 36; $3,3 \times 10^5$ : 2/3 Reactivo MRB ~ 0,12 - 0,15, FCNB ~ 39 - 40	NR	NR	$1 \times 10^6$ : 3/3 Reactivo MRB 0,15 FCNB ~36; $3,3 \times 10^5$ : 2/3 Reactivo; MRB 0,14 - 0,15, FCNB 36 - 37	NR

ID de la cepa	CY5™	MM0 VIC™	FAM™	CY5	MM1 VIC™	FAM™
71	NR	1 x 10 <sup>6</sup> : 3/3 Reactivo MRB ~ 0,13 - 0,15, FCNB ~ 37 – 39;  3,3 x 10 <sup>5</sup> : 2/3 reactivo MRB 0,12 - 0,13, FCNB ~ 36 - 37	NR	NR	1 x 10 <sup>6</sup> : 3/3 Reactive MRB ~ 0,15 FCNB ~ 37 3,3 x 10 <sup>5</sup> : 2/3 Reactivo MRB 0,1, 0,13, FCNB 39,41	NR
NR, no reactivo						

Como se muestra en la Tabla 12, los resultados de los reactivos MM0 y MM1 fueron comparables, a excepción de la cepa ID 10, que no fue reactiva con MM0.

**5 Ejemplo 8- Estudio de Banda de Guarda**

En este estudio, las SEC ID N° 1-3 se titularon entre sí para determinar las concentraciones óptimas. La Tabla 13 muestra las mezclas maestra diferentes (MM) usadas en este estudio, lo que indica las diversas concentraciones de los cebadores y sondas. Se añadió un CI a cada mezcla para crear una concentración final del CI de 84 copias/reacción.

**TABLA 13**  
**Concentraciones del Cebador (SEC ID N° 12) y sonda (SEC ID N°: 3)**  
**en las mezclas maestras analizadas (MM)**

	SEC ID N° 1	SEC ID N° 2	SEC ID N° 3
Nominal*	500 nM	500 nM	200 nM
MM1	250 nM	250 nM	200 nM
MM2	375 nM	375 nM	200 nM
MM3	625 nM	625 nM	200 nM
MM4	750 nM	750 nM	200 nM
MM5	375 nM	500 nM	200 nM
MM6	625 nM	500 nM	200 nM
MM7	500 nM	375 nM	200 nM
MM8	500 nM	625 nM	200 nM
MM9	500 nM	500 nM	150 nM
MM10	500 nM	500 nM	250 nM

La diana estaba constituida por una preparación de ADN genómico de CT diluida a 1:7,5 como en el Ejemplo 4. A cada pocillo se añadieron veinticinco µl de la mezcla maestro y 25 µl de la Diana. La bandeja se selló y después se cargó en un ciclador/lector as condiciones de ciclado Abbott m2000rt y se sometió a un ciclo de 95 °C durante 570 segundos, después, 45 ciclos de 92 °C durante 10 segundos, 58 °C durante 30 segundos y 65 °C durante 60 segundos. La placa se analizó después para determinar la señal del fluoróforo (FAM™ y CY5™).

Los resultados mostraron que, en el canal de CY5™, FCN fuer ligeramente más tarde con MM1 (~25 % para ambos cebadores (SEC ID N1 1,2) que en la condición nominal. FCN fue ligeramente antes con MM4 (+50 % de ambos cebadores) en comparación con la condición nominal, lo que indica una amplificación ligeramente más eficiente. En general, todas las mezclas maestras eran comparables con la condición nominal. Para el CI, FCN y MR eran comparables en todas las condiciones de la mezcla maestra en comparación con la condición nominal. FCN y MR fueron idénticos a FCNB y MRB para todas las muestras positivas (Tabla 13).

**30 Ejemplo 9 Análisis de las muestras de pacientes y comparación de la amplificación en los canales FAM™ (conjunto original) y CY5™ (nuevo conjunto)**

En este ejemplo, la mezcla maestra MM1 (véase el *Ejemplo 6*) que contiene las SEC ID N° 1-3 se analizó en muestras de orina de sujeto humano con el archivo de especificación de aplicación experimental m2000 en m2000sp y m2000rt. En total se analizaron 43 muestras de orina. La porción de la preparación de la muestra del archivo de especificación de aplicación experimental m2000 es una modificación del archivo de especificación de la solicitud CT/NG m2000, versión 2.00 actuales en el Mercado. Las muestras de orina se recopilaron en el tubo de transporte Abbott Multi-Collect para Abbott en los protocolos aprobados por el Comité de Revisión Interna y con el consentimiento del paciente. La placa para PCR se preparó en m2000sp y después se transfirió a m2000rt para amplificación por PCR y detección. Las condiciones de ciclado fueron como se ha descrito en el *Ejemplo 2*. La porción de detección m2000rt de este archive de especificación para aplicación experimental difirió de la versión 2.0 del archivo de especificación de la aplicación en CT/NG m2000 en el Mercado en que se añadió la detección en el

canal CY5™. Los resultados se compararon después con los resultados de estas mismas muestras de orina preparadas a partir de un protocolo de preparación de una muestra idéntica (archivo v0.24 de la especificación de la aplicación experimental en CT/NG) y se analizó con los reactivos de ensayo para CT/NG m2000 en el mercado actuales (MMO, *Ejemplo 6*).

5 A cada pocillo se añadieron veinticinco µl de la mezcla maestra y 25 µl de la preparación de la muestra de orina. Las concentraciones para los cebadores y las sondas fueron las indicadas en la Tabla 6. La bandeja se selló y después se cargó en un ciclador/lector Abbott m2000rt y se sometió a un ciclo de 95 °C durante 570 segundos, y, después, 45 ciclos de 92 °C durante 10 segundos, 58 °C durante 30 segundos y 65 °C durante 60 segundos. La placa se analizó después para determinar la señal del fluoróforo (FAM™ y CY5™).

10 Los dos ciclos m2000sp y m2000rt tuvieron éxito. Todos los resultados de las muestras de MM1 se correlacionaron bien con aquéllos previamente analizados MM0 con la excepción de la muestra de orina nº 114. Esta muestra se notificó previamente como negativa con MM0 pero mostró amplificación tardía con MM1 en el canal CY5™. Una revisión de los datos de análisis en MM0 en la muestra del frotis tomada del mismo sujeto mostró que la prueba del frotis era positiva. Por tanto, la muestra de orina nº 114 era, probablemente, una muestra de CT verdaderamente positiva baja y la amplificación observada en el canal CY5™ en esta muestra es, probablemente, específica para CT.

## 20 **Ejemplo 10 Marcaje de la sonda para proporcionar un único resultado de CT**

En este ejemplo, la SEC ID Nº 3 se marcó con FAM™. En esta configuración solo se da un resultado de CT, con independencia si se detectar CT o CTSW.

25 En la primera parte de este Ejemplo se preparó una mezcla maestra para MM0 (*Ejemplo 6*), las SEC ID Nº 1, 2 (cebadores) y 3 (sonda), y las SEC ID Nº 14, 15 (cebadores) y 3 (sonda). La sonda para la SEC ID Nº 3 se marcó en el extremo 5' con FAM™ y el inactivador BHQ-1™ y en el extremo 3'-  
Las concentraciones para cebadores y sondas son como se indica en la Tabla 5. A cada mezcla se añadió el CI para crear una concentración final del CI de 84 copias/reacción. Las mezclas se analizaron a cuatro niveles diana: (1) una preparación de ADN genómico 1 xCT; (2) una dilución 1:7,5; y (3) una dilución 1:50 de esta preparación de la muestra (1-3 como para el *Ejemplo 4*) y (4) un control negativo. Las concentraciones para los cebadores y las sondas fueron como se indica en la Tabla 6.

35 En la segunda parte de este Ejemplo, las mezclas maestras que contienen (1) reactivos para CT/NG (MM0); (2) MM1 (SEC ID Nº 1, 2 y 3; estando 3 marcado con FAM™) y (3) las SEC ID Nº 13 y 15 y la SEC ID Nº: 3, de nuevo marcada con FAM™ (MM4) en dos placas de PCR. La primera placa contenía el control de corte para CT/NG y tres diluciones del ADN genómico de CT diana (véase el *Ejemplo 4*) y la segunda usó preparaciones de ADN de CTSW como diana (diluidas a 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 del eluato de una muestra clínica como en el *Ejemplo 2*). Las concentraciones para cebadores y sondas son como se indica en la Tabla 5. MM4 fue la misma que MM1, excepto que los cebadores tenían las SEC ID Nº 13 y 15..

45 Después de cargar las muestras en la bandeja y sellar la bandeja, se cargó en un ciclador/lector Abbott m2000rt y se sometió a un ciclo de 95 °C durante 570 segundos, y, después, 45 ciclos de 92 °C durante 10 segundos, 58 °C durante 30 segundos y 65 °C durante 60 segundos. La placa se analizó después para determinar la señal del fluoróforo (FAM™ y CY5™).

A todos los niveles diana con la SEC ID Nº 3 como una sonda de FAM™, con independencia de la diana, los cebadores de las SEC ID Nº 1 y 2 fueron ligeramente más "sólidos" que los cebadores de las SEC ID Nº 13 y 15.

## 50 **REFERENCIAS**

- Abravaya, K, J. Hackett Jr, S. Huang, K.-C. Luk, J. Salituro, and L Morrison. 2005. DOUBLE STRANDED LINEAR NUCLEIC ACID PROBE AND USES THEREOF. Publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 20050227257.
- 55 Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.O. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Black, C.M., J.E. Johnson, C.E. Farshy, T.M. Brown, and B.P. Berdal. 1991. Antigenic variation among strains of Chlamydia pneumoniae. J Clin Microbiol. 29:1312-6.
- Buchardt, O., P.E. Nielsen, and R.H. Berg. 1992. PEPTIDE NUCLEIC ACIDS. WO 92/20702.
- 60 Comanducci, M., S. Ricci, R. Cevenini, and G. Ratti. 1990. Diversity of the Chlamydia trachomatis common plasmid in biovars with different pathogenicity. Plasmid. 23: 149-54.
- Fino, J. 1995. HAPTENS, TRACERS, IMMUNOGENS AND ANTIBODIES FOR CARBAZOLE AND DIBENZOFURAN DERIVATIVES. US Patent No. 5,464,746.
- Gelfand, D., P. Holland, R. Saiki, and R. Watson. 1993. Patente de EE.UU. Nº 5.210.015.
- 65 Jalal, H., H. Stephen, M.D. Curran, J. Burton, M. Bradley, and C. Carne. 2006. Development and validation of a rotor-gene real-time PCR assay for detection, identification, and quantification of Chlamydia trachomatis in a single reaction. J Clin Microbiol. 44:206-13.

Marras, SA., F.R. Kramer, and S. Tyagi. 1999. Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. *Genet Anal.* 14:151-6.

Mattingly, P. 1995. HAPTENS, TRACERS, IMMUNOGENS AND ANTIBODIES FOR 3-PHENYL-ADAMANTANEACETIC ACIDS. Patente de EE.UU. N° 5.424.414.

5 Ngeow, Y. F. 1996. Limitations of serodiagnosis in chlamydial genital tract infections. *Ann Acad Med Singapore.* 25: 300-4.

Nielsen, P.E., M. Egholm, R.H. Berg, and O. Buchardt. 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.* 254: 1497-500.

10 Pabich, E., R. Marshall, and H. Yu. 2004. POLYNUCLEOTIDES FOR THE AMPLIFICATION AND DETECTION OF CHLAMYDIA TRACHOMA TIS AND NEISSERIA GONORRHOEA. Publicación de solicitud de patente N° US 2004/0091870.

Palmer, L., and S. Falkow. 1986. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid.* 16:52-62.

Pandian, S., E. Aw, and D. Smith. 1997. METHOD OF AMPLIFICATION FOR INCREASING THE SENSITIVITY OF DETECTING NUCLEIC ACID-PROBE TARGET HYBRIDS. Patente de EE.UU. N° 5.627.030.

15 Pickett, MA., J.S. Everson, P.J. Pead, and I.N. Clarke. 2005. The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology.* 151 :893-903.

Ripa, T., and P. Nilsson. 2006. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill.* 11: E0611 092.

20 Ruth, J. 1990. SINGLE-STRANDED LABELED OLIGONUCLEOTIDES, REACTIVE MONOMERS AND METHODS OF SYNTHESIS. Patente de EE.UU. N° 4.948.882.

Tam, J.E., C.H. Davis, R.J. Thresher, and P.B. Wyrick. 1992. Location of the origin of replication for the 7.5-kb *Chlamydia trachomatis* plasmid. *Plasmid.* 27:231 -6.

25 Tyagi, S., D.P. Bratu, and F. R. Kramer. 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol.* 16:49-53.

van der Krol, A.R., J.N. Mol, and A.R. Stuitje. 1988. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques.* 6:958-76.

Zon, G. 1988. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm Res.* 5:539-49.

30 La presente invención abarca además las siguientes realizaciones:

1. Una combinación de reactivos polinucleotídicos que comprende un primer y un segundo polinucleótidos, donde

35 el primer polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 5-9, 11-13 y 14, y sus complementarias; y

40 el segundo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 2, 10, 15, 16 y 26, y sus complementarias.

2. La combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 1, que comprende además un tercer polinucleótido, donde el tercer polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 17-25, 27, 42 y un polinucleótido que comprende  $n$  nucleótidos, donde  $10 \leq n \leq 140$  nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 44, o complementarias de las mismas.

45 3. La combinación de reactivos polinucleotídicos de 2, donde al menos un reactivo polinucleotídico comprende un marcador detectable.

50 4. La combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 2, que comprende además un cuarto, un quinto y un sexto polinucleótido, donde el cuarto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 28-30 y sus complementarias;

55 el quinto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 31 y sus complementarias; y

el sexto polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32-34 y sus complementarias.

60 5. La combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 4, donde al menos un reactivo polinucleotídico comprende un marcador detectable.

6. La combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 4, donde al menos un reactivo polinucleotídico comprende además un inactivador.

65 7. La combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 4, donde el primer polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 5-9,

- 11-13 y 14, y sus complementarias;  
 el segundo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 10, 15, 16 y 26, y sus complementarias; y
- 5 el tercer polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3, 17-25, 27, 42 y un polinucleótido que comprende  $n$  nucleótidos, en donde  $10 \leq n \leq 140$  nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 44 y complementarias de las mismas.
- 10 8. La combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 4, donde el primer polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 5-9, 11-13 y 14, y sus complementarias;  
 el segundo polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 10, 15, 16 y 26, y sus complementarias; y
- 15 el tercer polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 3, 17-25, 27, 42 y un polinucleótido que comprende  $n$  nucleótidos, en donde  $10 \leq n \leq 140$  nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 44 y complementarias de las mismas.
- 20 9. La combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 4, donde el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 5-9, 11-13 y 14, y sus complementarias;  
 el segundo polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 10, 15, 16 y 26, y sus complementarias; y
- 25 el tercer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 3, 17-25, 27, 42 y un polinucleótido que comprende  $n$  nucleótidos, en donde  $10 \leq n \leq 140$  nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 44 y complementarias de las mismas.
- 30 10. La combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 4, donde el tercer polinucleótido comprende un marcador y un inhibidor.
11. Un kit, que comprende la combinación de reactivos polinucleotídicos del punto 2 y reactivos de amplificación.
12. Un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis* en una muestra, que comprende
- 35 (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación, una muestra sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis* y la combinación de polinucleótidos del punto 1; y  
 (b) someter la mezcla a condiciones para promover los reactivos de amplificación para amplificar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a un tercer polinucleótido que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 17-25, 27, 42 y un polinucleótido que comprende  $n$  nucleótidos, en donde  $10 \leq n \leq 140$  nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 44, o complementarias de las mismas.
- 40
13. El método del punto 12, donde la mezcla de reacción comprende además un polinucleótido diana de control y una sonda de polinucleótido de control.
- 45 14. Un método de detección de *Chlamydia trachomatis* en una muestra, que comprende
- 50 (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación, una muestra sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis* y la combinación de polinucleótidos del punto 1; y  
 (b) someter la mezcla a condiciones para promover los reactivos de amplificación para amplificar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a un tercer polinucleótido que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 17-25, 27, 42 y un polinucleótido que comprende  $n$  nucleótidos, en donde  $10 \leq n \leq 140$  nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 44, o complementarias de las mismas;
- 55 (c) someter la mezcla a condiciones para promover la hibridación específica del tercer reactivo polinucleotídico a una secuencia diana; y  
 (d) detectar los híbridos tercer polinucleótido: secuencia diana.
- 60
15. El método del punto 14, donde la mezcla de reacción comprende además un polinucleótido diana de control y una sonda de polinucleótido de control.
16. El método del punto 14, donde si la reacción consiste en 7,5 unidades de una ADN polimerasa, Tris-HCl 15 mM, pH 8,0, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 9,5 mM, DNTP 0,2 mM, 500 nM del primer y segundo polinucleótido y ROX 60 nM, luego
- 65 si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o una complementaria

de la misma, entonces

5 el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 16 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 23;

si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o una complementaria de la misma, entonces

10 el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 22 o una complementaria de la misma;

15 si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5 o 6 o sus complementarias, entonces

20 el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 10 o sus complementarias, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 19 o una complementaria de la misma;

si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8 o 9 o una complementaria de la misma, entonces

25 el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 10 o 26 o sus complementarias, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17 o una complementaria de la misma; y

30 si el primer polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 14 o una complementaria de la misma, entonces

35 el segundo polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o una complementaria de la misma, y el tercer polinucleótido no consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 22, o una complementaria de la misma.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 40 <110>
- <120> SECUENCIAS DE CEBADOR Y SONDA PARA CHLAMYDIA TRACHOMATIS
- 45 <130> 8713WOO1
- <150> 60/911.684
- <151> 13-04-2007
- 50 <160> 44
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 55 <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 60 <223> Cebador directo (CP2512\_2537) para detección de clamidia
- <400> 1
- caagcttaga tccgtttctc atacgg 26
- 65 <210> 2
- <211> 28



ES 2 659 145 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> cebador inverso (CP 2624\_2651) para la detección de Chlamydia <400> 2  
gcaatagaaa cggagatcta cgcaatgg 28

<210> 3  
<211> 27  
10 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
15 <223> Sonda para la detección de clamidia

<400> 3  
cctcgatgat ttgagcgtgt gtagcgc 27

<210> 4  
<211> 377  
20 <212> ADN  
<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 4  
25

aagttagacg aaatdddgtc tttgdcgaca gacgatctat tttttgcatc caatcagatt 60

tcctttcgca ttaaaaaaag acagaataaa gaaacccaaaa ttctaatacac atttccctatc 120

agcttaatgg aggagttgca aaaatacact tgtgggagaa atgggagagt atttgtttct 180

aaaatagggga ttccctgtaac aacaagtccag gttgdcgata attttaggct tgcagagttc 240

tatagtgcta tgaaaaataaa aattactcct agagtacttc gtgcaagcgc tttgattcat 300

ttaaagcaaa taggattaaa agatgaggaa atcatgcgta tttccctgtct ttcacgcgaga 360

caaagtgtgt gttctta 377

<210> 5  
<211> 27  
30 <212> ADN  
<213> *Chlamydia trachomatis*

<400>5  
35 ccttcattat gtcggagtct gagcacc 27

<210> 6  
<211> 26  
<212> ADN  
40 <213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 6  
cttcattatg tcggagtctg agcacc 26

<210> 7  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 7  
50 gtcggagtct gagcacccta ggcg 24

<210> 8  
<211> 27  
55 <212> ADN

	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
	<400> 8	
5	cacagcgggtt gctcgaagca cgtgcgg	27
	<210> 9	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
	<400> 9	
	agcggttgct cgaagcacgt gcgg	24
	<210> 10	
15	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
	<400> 10	
20	caagagtaca tcggtcaacg aagagg	26
	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
	<400> 11	
	cggcttgga agagctttg cggcg	25
30	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
35	<400> 12	
	gggaagagct ttgpcggcg	19
	<210> 13	
	<211> 27	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
	<400> 13	
45	cgtatctcgg gttaatgtg catgat	27
	<210> 14	
	<211> 24	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
	<400> 14	
	cgtatctcgg gttaatgtg catg	24
	<210> 15	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
	<400> 15	
60	cattgtactc attaaacgag egg	23
	<210> 16	
	<211> 28	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	

	<400> 16 gtcaagcctt ccctttatac gctcaagc	28
5	<210> 17 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
10	<400> 17 ggtgggggta aggcaaatcg cccgcacg	28
15	<210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i> <400> 18 gccttaacct caccattttt ccggagcgag	30
20	<210> 19 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
25	<400> 19 ccccaccatt ttccggagc gagttacg	28
30	<210> 20 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
35	<400> 20 gacaagctta gatccgttc tcatacgg	28
40	<210> 21 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
45	<400> 21 ccgatgaga aacggatcta agcttgtc	28
50	<210> 22 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
55	<400> 22 gcgctacaca cgctcaaac atcgagg	27
60	<210> 23 <211> 29 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
65	<400> 23 cagcgctaca cagctcaaa tcacgagg	29
70	<210> 24 <211> 32 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
75	<400> 24 cttcagcgct acacagcgtc aaatcatcga gg	32

<210> 25  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 5  
 <400> 25  
 cgatgattg agcgtgtgta gcgc 24  
 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 10  
 <400> 26  
 caagagtaca tcggtcaacg aaga 24  
 <210> 27  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 20  
 <400> 27  
 cccaccatt tttccggagc ga 22  
 <210> 28  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 25  
 <400> 28  
 gggattctg taacaacaag tcagg 25  
 <210> 29  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 30  
 <220>  
 <221 > misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> "d" no es C  
 35  
 <400> 29  
 ctgggattcd tgtaacaaca agtcagg 27  
 <210> 30  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 40  
 <400> 30  
 gggattcgtg taacaacaag tcagg 25  
 <210> 31  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 45  
 <400> 31  
 gcttcacga agtactctag gag 23  
 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 50  
 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 55  
 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 60  
 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*  
 65

ES 2 659 145 T3

	<400> 32		
	atagcactat agaactctgc aa	22	
5	<210> 33 <211> 26 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>		
10	<400> 33		
	catagcacta tagaactctg caagcc	26	
15	<210> 34 <211> 32 <212> ADN <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>		
20	<220> <221 > tallo-bucle <222> (1)..(5) <223 no bacteriano, autocomplementario para formar un tallo de baliza molecular en condiciones adecuadas con los residuos 28-32.		
25	<220> <221 > tallo-bucle <222> (28)..(32) <223> secuencia no bacteriana autocomplementaria para formar un tallo de baliza molecular en condiciones adecuadas para los residuos 1-5.		
30	<400> 34		
	ctggcatagc actatagaac tctgcaagcc ag	32	
35	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
40	<400> 35		
	cgacgtaccg gttttgttc	20	
45	<210> 36 <211> 22 <212> ADN <213> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
50	<400> 36		
	cggctccta ttcggttga cc	22	
55	<210> 37 <211> 18 <212> ADN <213> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
60	<400> 37		
	acaccgcccg gaaccgga	18	
65	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
	<400> 38		
	gaaacaccgc ccggaaccg at	22	
	<210> 39 <211> 24 <212> ADN		

ES 2 659 145 T3

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<220>  
 <221> tallo-bucle  
 5 <222> (1)..(5)  
 <223> no bacteriana autocomplementaria para formar un tallo de baliza molecular en condiciones adecuadas para los residuos 20-24.

<220>  
 10 <221 > tallo-bucle  
 <222> (24)..(24)  
 <223> no bacteriana autocomplementaria para formar un tallo de baliza molecular en condiciones adecuadas para los residuos 1-5.

15 <400> 39  
 ctcgacacc gccggaacc cgag 24

<210> 40  
 <211> 28  
 20 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 40  
 25 ctacagcaga gttggcagct tcacttc 28

<210> 41  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*

30 <400> 41  
 gtctggcctt tcagcaagtt tc 22

<210> 42  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*

35 <400> 42  
 aagctgacga gttcatgagg gcagg 25

<210> 43  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia sintética

50 <400> 43  
 cgatgattg agcgtgtgta gcgg 24

<210> 44  
 <211> 140  
 <212> ADN  
 <213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 44

caagccttaga tccgtttctc atacggtttt cctcgatgat ttgagcgtgt gtagcgcctga 60

agaaaatttg agcaatttca ttttccgctc gtttaatgag tacaatgaaa atccattgcg 120

60 tagatctccg tttctattgc 140

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación de reactivos polinucleotídicos para detectar una secuencia de ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis* que comprende (i) un primer polinucleótido, (ii) un segundo polinucleótido y (iii) un tercer polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- (a) (i) SEQ ID NO: 5, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 17;
  - (b) (i) SEQ ID NO: 6, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 17;
  - (c) (i) SEQ ID NO: 7, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 17;
  - (d) (i) SEQ ID NO: 5, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (e) (i) SEQ ID NO: 6, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (f) (i) SEQ ID NO: 7, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (g) (i) SEQ ID NO: 8, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (h) (i) SEQ ID NO: 9, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (i) (i) SEQ ID NO: 7, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 19;
  - (j) (i) SEQ ID NO: 8, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 19;
  - (k) (i) SEQ ID NO: 9, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 19;
  - (l) (i) SEQ ID NO: 5, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 17;
  - (m) (i) SEQ ID NO: 6, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 17;
  - (n) (i) SEQ ID NO: 7, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 17;
  - (o) (i) SEQ ID NO: 5, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (p) (i) SEQ ID NO: 6, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (q) (i) SEQ ID NO: 7, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (r) (i) SEQ ID NO: 8, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (s) (i) SEQ ID NO: 9, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 18;
  - (t) (i) SEQ ID NO: 5, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 19;
  - (u) (i) SEQ ID NO: 6, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 19;
  - (v) (i) SEQ ID NO: 7, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 19;
  - (w) (i) SEQ ID NO: 8, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 19;
  - (x) (i) SEQ ID NO: 9, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 19;
  - (y) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 21;
  - (z) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 21;
  - (aa) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 21;
  - (bb) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 21;
  - (cc) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 20;
  - (dd) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 20;
  - (ee) (ix) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 20;
  - (ff) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 20;
  - (gg) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 3;
  - (hh) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 3;
  - (ii) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 22;
  - (jj) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 22;
  - (kk) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 22;
  - (ll) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 23;
  - (mm) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 23;
  - (nn) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 23;
  - (oo) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 23;
  - (pp) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 23;
  - (qq) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 24;
  - (rr) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 24;
  - (ss) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 24;
  - (tt) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 24;
  - (uu) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 24;
  - (vv) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 25;
  - (ww) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 25;
  - (xx) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 25;
  - (yy) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 25;
  - (zz) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 25;
  - (aaa) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 43;
  - (bbb) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 43;
  - (ccc) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 43;
  - (ddd) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 43;
  - (eee) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 2 y (iii) SEQ ID NO: 43;
  - (fff) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 16 y (iii) SEQ ID NO: 21;
  - (ggg) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 16 y (iii) SEQ ID NO: 21;
  - (hhh) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 21;

(iii) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 21;  
 (jjj) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 20;  
 (kkk) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 16 y (iii) SEQ ID NO: 3;  
 5 (lll) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 16 y (iii) SEQ ID NO: 3;  
 (mmm) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 3;  
 (nnn) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 3;  
 (ooo) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 3;  
 (ppp) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 10 (ggg) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 (rrr) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 (sss) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 (ttt) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 (uuu) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 23;  
 15 (vvv) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 16 y (iii) SEQ ID NO: 23;  
 (www) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 23;  
 (xxx) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 23;  
 (yyy) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 (zzz) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 20 (aaaa) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 (bbbb) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 (cccc) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 (dddd) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 (eeee) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 25 (ffff) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 (gggg) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 (hhhh) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 16 y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 (iiii) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 16 y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 (jjjj) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 (kkkk) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 16 y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 30 (llll) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 (mmmm) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 16, y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 (nnnn) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 21;  
 (oooo) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 21;  
 35 (pppp) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 21;  
 (qqqq) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 21;  
 (rrrr) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 20;  
 (ssss) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 20;  
 (tttt) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 20;  
 40 (uuuu) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 20;  
 (vvvv) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 3;  
 (wwww) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 3;  
 (xxxx) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 (aaaa) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 45 (zzzz) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 (aaaaa) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 (bbbbb) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 22;  
 (ccccc) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 23;  
 (dddd) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 15, (iii) SEQ ID NO: 23;  
 (eeee) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 15, (iii) SEQ ID NO: 23;  
 50 (ffff) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 23;  
 (ggggg) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 23;  
 (hhhhh) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 (iiii) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 (jjjj) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 55 (kkkkk) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 (lllll) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 24;  
 (mmmmm) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 15, y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 (nnnnn) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 (ooooo) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 60 (ppppp) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 (ggggg) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 25;  
 (rrrrr) (i) SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 (sssss) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 (ttttt) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 65 (uuuuu) (i) SEQ ID NO: 14, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 (vvvvv) (i) SEQ ID NO: 1, (ii) SEQ ID NO: 15 y (iii) SEQ ID NO: 43;



- (wwwww) (i) SEQ ID NO: 5, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 43;  
 (xxxxx) (i) SEQ ID NO: 6, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 27;  
 (aaaaa) (i) SEQ ID NO: 7, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 27;  
 (zzzzz) (i) SEQ ID NO: 8, (ii) SEQ ID NO: 10, y (iii) SEQ ID NO: 27;  
 5 (aaaaaa) (i) SEQ ID NO: 9, (ii) SEQ ID NO: 10 y (iii) SEQ ID NO: 27;  
 (bbbbbb) (i) SEQ ID NO: 6, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 27;  
 (ccccc) (i) SEQ ID NO: 7, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 27;  
 (dddddd) (i) SEQ ID NO: 8, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 27; y  
 10 (eeeeee) (i) SEQ ID NO: 9, (ii) SEQ ID NO: 26, y (iii) SEQ ID NO: 27;
- donde el primer polinucleótido es un cebador directo, el segundo polinucleótido es un cebador inverso, y el tercer polinucleótido es una sonda.
2. La combinación de reactivos polinucleotídicos de la reivindicación 1, donde al menos un reactivo polinucleotídico  
 15 comprende un marcador detectable.
3. La combinación de reactivos polinucleotídicos de la reivindicación 1, que comprende además un cuarto, un quinto  
 y un sexto polinucleótido, donde  
 20 el cuarto polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90 % de identidad de  
 secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 28-30 y sus  
 complementarias;  
 el quinto polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90 % de identidad de  
 secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 31 y complementarias de las  
 mismas; y  
 25 el sexto polinucleótido consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90 % de identidad de  
 secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 32-34 y sus  
 complementarias.
4. La combinación de reactivos polinucleotídicos de la reivindicación 3, donde al menos un reactivo polinucleotídico  
 30 comprende un marcador detectable.
5. La combinación de reactivos polinucleotídicos de la reivindicación 3, donde al menos un reactivo polinucleotídico  
 comprende además un inactivador.
- 35 6. La combinación de reactivos polinucleotídicos de la reivindicación 3, donde el tercer polinucleótido comprende un  
 marcador y un inactivador.
7. Un kit, que comprende la combinación de reactivos polinucleotídicos de la reivindicación 1 y reactivos de  
 40 amplificación.
8. Un método de detección *Chlamydia trachomatis* en una muestra, que comprende
- (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación, una muestra sospechosa de  
 45 contener una secuencia de ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis* y la combinación de polinucleótidos de la  
 reivindicación 1; y  
 (b) someter la mezcla a condiciones para promover los reactivos de amplificación para amplificar al menos una  
 copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a un tercer polinucleótido de la reivindicación 1;  
 (c) someter la mezcla a condiciones para promover la hibridación específica del tercer reactivo polinucleotídico a  
 una secuencia diana; y  
 50 (d) detectar tercer híbrido de polinucleótido: secuencia diana.
9. El método de la reivindicación 8, donde la mezcla de reacción comprende además un polinucleótido diana de  
 control y una sonda de polinucleótido de control.