

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 585**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2004 E 04803978 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1697541**

54 Título: **Oligonucleótidos, métodos y kits para detectar Neisseria gonorrhoeae**

30 Prioridad:

19.12.2003 US 530962 P
12.03.2004 US 552460 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2013

73 Titular/es:

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH

72 Inventor/es:

KAWA, DIANE;
LU, SHI-DA y
DAILEY, PETER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 410 585 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

Oligonucleótidos, métodos y kits para detectar *Neisseria gonorrhoeae*

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los campos de la biología molecular y química de los ácidos nucleicos. La invención proporciona métodos y reactivos para detectar patógenos, tales como *Neisseria gonorrhoeae* y, por consiguiente, se refiere además a los campos del diagnóstico y pronóstico médico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El género *Neisseria* consiste de bacterias aeróbicas Gram-negativas, incluyendo el patógeno humano *N. gonorrhoeae*, que es el agente causativo de la gonorrea. Las infecciones por *N. gonorrhoeae*, que presentan una elevada prevalencia y una baja mortalidad, generalmente se adquieren por contacto sexual y típicamente afectan a las membranas mucosas de la uretra en el varón y al endocervix en la hembra. Sin embargo, la infección también puede extenderse a otros tejidos. Por ejemplo, una infección genital en el varón puede ascender la uretra y producir síntomas de prostatitis, mientras que en la hembra, una infección por *N. gonorrhoeae* del cervix puede extenderse a los conductos de Falopio y finalmente provocar esterilidad, entre otras condiciones, si no se trata. El mecanismo patológico de *N. gonorrhoeae* implica la unión de las bacterias a células epiteliales no ciliadas mediante pili. El mecanismo también incluye la producción de endotoxina y proteasas de IgA.

Con frecuencia se observa coinfección de *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*. Ambas infecciones son dos causas conocidas de embarazo ectópico y también pueden conducir a infertilidad si no se tratan. También son causas conocidas de los síndromes clínicos agudos de cervicitis mucopurulenta y enfermedad inflamatoria pélvica. Por lo tanto, la detección de las infecciones por *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, que pueden ser asintomáticas, especialmente en hembras, presentan consecuencias para los individuos que necesitan tratamiento y para poblaciones más amplias en riesgo de adquirir y propagar adicionalmente las infecciones.

La detección e identificación de las infecciones bacterianas tradicionalmente se ha llevado a cabo mediante procedimientos de aislamiento y determinación de cultivos puros que aplican conocimientos sobre la origen de los especímenes, los requisitos de crecimiento, las características visibles del crecimiento, la morfología microscópica, las reacciones de tinción y las características bioquímicas. Por ejemplo, entre los métodos preexistentes de detección e identificación de las infecciones por *N. gonorrhoeae* se incluyen la tinción Gram, el cultivo en medio agar selectivo y el ensayo de citocromo oxidasa y de utilización de carbohidratos. Los ensayos serológicos, incluyendo la coaglutinación y la tinción con anticuerpos fluorescentes también han sido descritos para la detección de *N. gonorrhoeae*. Los métodos basados en cultivos, aunque relativamente sensibles, generalmente resultan de ejecución larga, incluyendo con frecuencia la incubación durante la noche, y son laboriosos. La tinción Gram y los ensayos basados en anticuerpos típicamente proporcionan resultados en menos de una hora, aunque generalmente presentan menor sensibilidad que los métodos basados en cultivos.

La utilización de secuencias polinucleótidas específicas como sondas para el reconocimiento de agentes infecciosos es una alternativa a los problemáticos ensayos de identificación inmunológica y otras metodologías preexistentes. Por ejemplo, las sondas de ácidos nucleicos complementarias a secuencias de ácidos nucleicos diana se han utilizado en procedimientos de hibridación, tales como las transferencias southern y las transferencias por puntos, con el fin de detectar la secuencia de ácidos nucleicos diana. Muchos de dichos procedimientos de hibridación han dependido del cultivo y/o enriquecimiento del organismo y, de esta manera, resultan inadecuados para el diagnóstico rápido. La aparición de técnicas para la amplificación rápida de secuencias específicas de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa entre muchas otras, han proporcionado un mecanismo para utilizar sondas específicas de secuencia directamente en especímenes clínicos, eliminando de esta manera el enriquecimiento y cultivo in vitro del patógeno previamente a la realización del ensayo de hibridación. De esta manera, los ensayos de hibridación basados en la amplificación pueden proporcionar técnicas diagnósticas simples y rápidas para la detección de patógenos en muestras clínicas.

Muchas de las sondas utilizadas hasta hoy no presentan suficiente especificidad para diferenciar entre agentes patológicos que presentan secuencias de ácidos nucleicos altamente homólogas, tales como *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y similares. Esto ha conducido a resultados de ensayo sesgados, incluyendo resultados falsos positivos. Una consecuencia de dicho diagnóstico erróneo podría ser la administración de un curso de tratamiento inapropiado para el paciente.

El documento WO nº 02/079423 da a conocer un número elevado de secuencias que se expresan en *Neisseria gonorrhoeae* y que no presentan homología con secuencia de otras bases de datos. En particular, las SEC ID nº 33 y nº 51 del documento WO nº 02/079423 se solapan con SEC ID nº 1 de la presente solicitud y SEC ID nº 121 y nº 125 se solapan con SEC ID nº 2.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos y reactivos para la detección rápida de *Neisseria gonorrhoeae* que son específicos de especie, es decir, sin detección sustancial de otras especies en el género *Neisseria* o de otras especies de otros géneros. Por ejemplo, los reactivos de detección de ácidos nucleicos de la invención (por ejemplo sondas de ácidos nucleicos, anticuerpos específicos de secuencia, etc.) típicamente se unen a secuencias de nucleótidos presentes en *N. gonorrhoeae* pero no en otras especies. Además, debido a que los pacientes infectados por *N. gonorrhoeae* con frecuencia también resultan infectados por *Chlamydia trachomatis*, la invención proporciona además métodos para detectar concurrentemente *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* en muestras. Este enfoque minimiza el número de procedimientos diagnósticos a los que se somete un paciente, lo que típicamente también minimiza el coste total del diagnóstico. Además de las composiciones y mezclas de reacción, la invención se refiere además a kits y sistemas para detectar dichos agentes patogénicos, y a medios informáticos y medios legibles por ordenador relacionados.

En un aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido según las reivindicaciones que consiste de un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 ó complementos de las mismas. En otro aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que comprende un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 y complementos de las mismas, presentando dicho oligonucleótido 100 ó menos nucleótidos. En todavía otro aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que incluye un ácido nucleico que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% (por ejemplo de por lo menos 95%, etc.) respecto a una de SEC ID nº 3 a nº 27 ó un complemento de las mismas, presentando dicho oligonucleótido 100 ó menos nucleótidos. Típicamente, dichos oligonucleótidos son cebadores de ácidos nucleicos, sondas de ácidos nucleicos o similares en dichas realizaciones. En algunas de dichas realizaciones, los oligonucleótidos presentan 40 ó menos nucleótidos (por ejemplo 35 ó menos nucleótidos, 30 ó menos nucleótidos, etc.). En algunas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden por lo menos un nucleótido modificado. Opcionalmente, los oligonucleótidos comprenden por lo menos un marcaje y/o por lo menos una fracción inhibidora. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos incluyen por lo menos una variación modificada conservadoramente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de detección de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra, según se definen en las reivindicaciones 8 a 17.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra según las reivindicaciones 18 y 19. En la presente invención, el seguimiento se lleva a cabo, por ejemplo, en un sólo tiempo, en múltiples tiempos discretos, continuamente durante un periodo de tiempo seleccionado, etc. En algunas realizaciones, por ejemplo, los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos comprenden por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 28 a nº 33. En determinadas realizaciones, (a) comprende poner en contacto los ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos con los oligonucleótidos en solución a una temperatura de por lo menos 42°C durante como mínimo 15 minutos en los que un peso total de la solución comprende formalina aproximadamente al 50% y comprende heparina a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml. Además, el método típicamente comprende una reacción aparte de una reacción de secuenciación. La muestra generalmente se deriva de un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano. En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos y los oligonucleótidos se ponen en contacto en solución. Opcionalmente, un soporte sólido comprende los ácidos nucleicos y/o amplicones (por ejemplo dispuestos sobre el soporte sólido). A modo de opción adicional, un soporte sólido comprende los oligonucleótidos.

En determinadas realizaciones de la invención, el método incluye además poner en contacto los ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos de la muestra con por lo menos un oligonucleótido adicional que se une detectablemente a un ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*. En dichas realizaciones, el método incluye además el seguimiento de la unión entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos y el oligonucleótido adicional, detectando de esta manera *Chlamydia trachomatis* en la muestra. En algunas realizaciones, el método incluye repetir (a) y (b) por lo menos en una ocasión utilizando por lo menos una muestra adicional (por ejemplo del mismo sujeto) y comparar la unión entre los ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos, y los oligonucleótidos de (b) con por lo menos un (b) repetido para llevar a cabo el seguimiento de, por ejemplo, el curso del tratamiento de un sujeto diagnosticado con una infección por *Neisseria gonorrhoeae* y/o por *Chlamydia trachomatis*, de la recurrencia de la infección o similar.

Entre los reactivos de detección de ácidos nucleicos de la invención se incluyen diversas realizaciones. A título ilustrativo, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos puede comprender un oligonucleótido (por ejemplo una sonda de ácidos nucleicos, un cebador de ácidos nucleicos, etc.). El oligonucleótido comprende con una identidad de secuencia de 90% una subsecuencia de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 según la reivindicación 1. Opcionalmente, por lo menos un nucleótido del oligonucleótido ha sido modificado. En algunas realizaciones, por ejemplo, se modifica el nucleótido para alterar la estabilidad de hibridación del ácido nucleico respecto a los nucleótidos no modificados.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos, los amplicones de los mismos y/o los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprenden por lo menos un marcaje y/o por lo menos una fracción inhibidora. Por ejemplo, el marcaje comprende opcionalmente un pigmento fluorescente, un marcaje débilmente fluorescente, un marcaje no fluorescente, un marcaje colorimétrico, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje bioluminiscente, un anticuerpo, un antígeno, biotina, un hapteno, un grupo modificador de la masa, un isótopo radioactivo, un enzima o similar. En dichas realizaciones, (b) típicamente comprende la detección de una señal detectable producida por el marcaje. A título ilustrativo, (b) opcionalmente comprende (i) amplificar una señal detectable producida por el marcaje para producir una señal amplificada, e (ii) detectar la señal amplificada.

En algunas realizaciones, por lo menos un segmento de los ácidos nucleicos se amplifica antes o durante (a) utilizando por lo menos una técnica de amplificación de ácidos nucleicos para producir los amplicones, y (b) comprende el seguimiento de la unión entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos, y los reactivos de detección de ácidos nucleicos, durante o después de la amplificación. Por ejemplo, la técnica de amplificación de ácidos nucleicos típicamente comprende una reacción en cadena de polimerasa, una reacción en cadena de ligasa y/o similar. En dichas realizaciones, el segmento se amplifica opcionalmente utilizando por lo menos un cebador de ácidos nucleicos según la reivindicación 1. En algunas de dichas realizaciones, el cebador de ácidos nucleicos comprende por lo menos un marcaje, tal como se describe en la presente memoria o de otro modo conocido de la técnica. Opcionalmente, el cebador de ácidos nucleicos comprende un cebador de ácidos nucleicos modificado (por ejemplo una modificación alteradora de la especificidad de amplificación de los ácidos nucleicos, un conector de sitio de restricción y/o similar).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para detectar *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra. El método incluye: (a) poner en contacto los ácidos nucleicos de la muestra con por lo menos una primera pareja de cebadores de ácidos nucleicos que comprende por lo menos un oligonucleótido según la reivindicación 1. Adicionalmente, el método incluye además: (b) detectar los ácidos nucleicos y/o uno o más amplicones de los mismos de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos durante o después de (a), detectando de esta manera *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra. En determinadas realizaciones, por ejemplo, los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos comprenden por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 28 a nº 33. La muestra típicamente se deriva de un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano. Opcionalmente, por lo menos uno de los cebadores de ácidos nucleicos comprende un cebador de ácidos nucleicos modificado. En algunas realizaciones, por ejemplo, el cebador de ácidos nucleicos modificado comprende una modificación alteradora de la especificidad de amplificación de los ácidos nucleicos y/o una modificación de conector de sitio de restricción. En determinadas realizaciones, (a) comprende poner en contacto los ácidos nucleicos de la muestra con por lo menos una segunda pareja de cebadores de ácidos nucleicos que son por lo menos parcialmente complementarios a un ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*, y (b) comprende detectar uno o más amplicones adicionales de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos durante o después de (a), detectando de esta manera *Chlamydia trachomatis* en la muestra.

En algunas realizaciones, por lo menos uno de los cebadores de ácidos nucleicos comprende por lo menos un marcaje. El marcaje comprende opcionalmente, por ejemplo, un pigmento fluorescente, un marcaje débilmente fluorescente, un marcaje no fluorescente, un marcaje colorimétrico, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje bioluminiscente, un anticuerpo, un antígeno, biotina, un hapteno, un grupo modificador de la masa, un isótopo radioactivo, un enzima, etc. En dichas realizaciones, (b) típicamente comprende detectar una señal detectable producida por el marcaje. Opcionalmente, (b) comprende (i) amplificar una señal detectable producida por el marcaje para producir una señal amplificada, e (ii) detectar la señal amplificada.

En determinadas realizaciones, (b) comprende el seguimiento de la unión entre los amplicones y uno o más reactivos de detección de ácidos nucleicos que se unen específicamente a un ácido nucleico con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante. Opcionalmente, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprende un oligonucleótido (por ejemplo una sonda de ácidos nucleicos, etc.). En algunas de dichas realizaciones, (b) comprende detectar la hibridación entre el oligonucleótido y los amplicones. Opcionalmente, el oligonucleótido comprende una secuencia de longitud comprendida entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos. En determinadas realizaciones, por lo menos un nucleótido del oligonucleótido ha sido modificado (por ejemplo para alterar la estabilidad de hibridación del ácido nucleico en comparación con la de nucleótidos no modificados o similares). Por ejemplo, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 3 a nº 27, y complementos de SEC ID nº 3 a nº 27 y la variante. A título ilustrativo adicional, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos opcionalmente se une detectablemente a un segmento de ácidos nucleicos que comprende una o más posiciones nucleótidas de SEC ID nº 1 seleccionadas de entre el grupo que consiste de: 259, 260, 262, 264, 265, 266, 268, 269, 273, 275, 276, 277, 279, 297, 298, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 308, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 325, 326, 428, 429, 431, 432, 433, 434, 435, 440, 441 y 447. A modo de opción adicional, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos se une detectablemente a un segmento de ácidos nucleicos que

comprende una o más posiciones nucleótidas de SEC ID nº 2 seleccionadas de entre el grupo que consiste de: 89, 90, 91, 92, 95, 98, 101, 105, 106, 107, 216, 217, 220, 222, 223, 225, 233, 235, 236, 238, 335, 336, 337, 338, 339, 342, 345, 346 y 351. En algunas realizaciones, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprende un anticuerpo específico de secuencia o similar. Opcionalmente, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprende por lo menos un marcaje y/o por lo menos una fracción inhibidora. Un marcaje ejemplar comprende opcionalmente un pigmento fluorescente, un marcaje débilmente fluorescente, un marcaje no fluorescente, un marcaje colorimétrico, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje bioluminiscente, un anticuerpo, un antígeno, biotina, un hapteno, un grupo modificador de la masa, un isótopo radioactivo, un enzima o similar. En dichas realizaciones, (b) típicamente comprende la detección de una señal detectable producida por el marcaje. En algunas de dichas realizaciones, (b) comprende (i) amplificar una señal detectable producida por el marcaje para producir una señal amplificada, e (ii) detectar la señal amplificada.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra en la que el método incluye: (a) poner en contacto ácidos nucleicos de la muestra con por lo menos una primera pareja de cebadores de ácidos nucleicos en por lo menos una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, en la que cada uno de los cebadores de ácidos nucleicos presenta entre 12 y 100 nucleótidos, y en la que por lo menos uno de los cebadores de ácidos nucleicos es un oligonucleótido según la reivindicación 1. El método incluye además: (b) detectar los ácidos nucleicos y/o uno o más amplicones de los mismos de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos durante o después de (a), detectando de esta manera *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra. Típicamente, la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra es desconocida o no ha sido demostrada antes de (a). En algunas realizaciones, uno o más de los cebadores de ácidos nucleicos presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 3 a nº 27, y complementos de SEC ID nº 3 a nº 27 y la variante.

En todavía otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra, en la que el método incluye: (a) poner en contacto ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos procedentes de la muestra con por lo menos un oligonucleótido según la reivindicación 1. Adicionalmente, el método incluye además (b) el seguimiento de la unión entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos, y el oligonucleótido, en el que la unión detectable entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos, y el oligonucleótido, determina la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra. Típicamente, la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra es desconocida o no ha sido demostrada antes de (a). En determinadas realizaciones, uno o más de los cebadores de ácidos nucleicos presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27, o un oligonucleótido según la reivindicación 1.

También se da a conocer una composición que comprende una muestra derivada de un sujeto y uno o más reactivos de detección de ácidos nucleicos que se unen específicamente a un ácido nucleico con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó nº 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante. La presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra generalmente es desconocida o no ha sido demostrada. Típicamente, los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprenden por lo menos un ácido nucleico sintetizado químicamente. Por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos puede comprender un oligonucleótido (por ejemplo una sonda de ácidos nucleicos, un cebador de ácidos nucleicos, o similar). Típicamente, el oligonucleótido comprende una identidad de secuencia de por lo menos 85% (por ejemplo aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, etc.) respecto a una subsecuencia de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó el complemento de las mismas. En la presente memoria, el oligonucleótido puede presentar una secuencia de una longitud de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos (por ejemplo de una longitud de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 50 nucleótidos). Además, por lo menos un nucleótido del oligonucleótido ha sido modificado (por ejemplo para alterar la estabilidad de hibridación del ácido nucleico en comparación con los nucleótidos no modificados). Por ejemplo, los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprenden opcionalmente por lo menos un ácido nucleico que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 3 a nº 27, y complementos de SEC ID nº 3 a nº 27 y la variante. A título ilustrativo adicional, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos opcionalmente se une detectablemente a un segmento de ácidos nucleicos que comprende una o más posiciones nucleótidas de SEC ID nº 1 seleccionadas de entre el grupo que consiste de: 259, 260, 262, 264, 265, 266, 268, 269, 273, 275, 276, 277, 279, 297, 298, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 308, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 325, 326, 428, 429, 431, 432, 433, 434, 435, 440, 441 y 447. A modo de opción adicional, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos se une detectablemente a un segmento de ácidos nucleicos que comprende una o más posiciones nucleótidas de SEC ID nº 2 seleccionada de entre el grupo que consiste de 89, 90, 91, 92, 95, 98, 101, 105, 106, 107, 216, 217, 220, 222, 223, 225, 233, 235, 236, 238, 335, 336, 337, 338, 339, 342, 345, 346 y 351. Los reactivos de detección de ácidos nucleicos pueden comprender por lo menos un anticuerpo específico de secuencia. La composición puede incluir además por lo menos un reactivo adicional de detección de ácidos nucleicos que se une detectablemente a un ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*.

Típicamente, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprende por lo menos un marcaje y/o por lo menos una fracción inhibidora. A título ilustrativo, el marcaje comprende opcionalmente un pigmento fluorescente, un marcaje débilmente fluorescente, un marcaje no fluorescente, un marcaje colorimétrico, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje bioluminiscente, un anticuerpo, un antígeno, biotina, un hapteno, un grupo modificador de la masa, un isótopo radioactivo, un enzima o similar.

Los reactivos de detección de ácidos nucleicos de dichas composiciones se proporcionan en diversos formatos. Por ejemplo, por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos se encuentra en solución. En otros ejemplos, un soporte sólido comprende por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos. En la presente memoria, los reactivos de detección de ácidos nucleicos se unen covalente o no covalentemente al soporte sólido. Los soportes sólidos ejemplares utilizados se seleccionan opcionalmente de entre, por ejemplo, una placa, una placa de micropocillos, una perla, una microperla (por ejemplo una microperla magnética, etc.), un tubo (por ejemplo un microtubo, etc.), una fibra, una cerda, un peine, un chip de hibridación, una membrana, un cristal simple, una capa cerámica, una monocapa autoensamblante, y similares.

A título ilustrativo adicional, los reactivos de detección de ácidos nucleicos se conjugan opcionalmente con biotina o con un derivado de biotina y el soporte sólido se conjuga opcionalmente con avidina o con un derivado de avidina, o con estreptavidina o un derivado de estreptavidina. Un conector une los reactivos de detección de ácidos nucleicos al soporte sólido. El conector típicamente se selecciona de entre, por ejemplo, un oligopéptido, un oligonucleótido, una oligopoliamida, un oligoetilenglicerol, una oligoacrilamida, una cadena alquilo y similar. Opcionalmente, una unión cortable une los reactivos de detección de ácidos nucleicos al soporte sólido. La unión cortable generalmente es cortable mediante, por ejemplo, calor, un enzima, un agente químico, radiación electromagnética, etc.

También se da a conocer una mezcla de reacción que incluye un juego de amplicones que presentan secuencias que corresponden a las subsecuencias de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante, los amplicones de las cuales no presentan nucleótidos terminadores. Típicamente, por lo menos un subconjunto del conjunto de amplicones se produce utilizando por lo menos un cebador de ácidos nucleicos que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 3 a nº 27, y complementos de SEC ID nº 3 a nº 27 y la variante. En determinadas realizaciones, el cebador de ácidos nucleicos comprende un cebador de ácidos nucleicos modificado. Por ejemplo, el cebador de ácidos nucleicos modificado comprende opcionalmente una modificación alteradora de la especificidad de amplificación de los ácidos nucleicos, una modificación de conector de sitio de restricción y/o similar. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción incluye además un conjunto adicional de amplicones que comprende secuencias que corresponden a una secuencia de ácidos nucleicos de *Chlamydia trachomatis*.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit según la reivindicación 20 que incluye: (a) por lo menos un oligonucleótido según la reivindicación 1 y uno o más de entre: (b) instrucciones para determinar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra mediante el seguimiento de la unión entre ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos de la muestra y el oligonucleótido en el que la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra es desconocida o no ha sido demostrada, o (c) por lo menos un recipiente para empaquetar por lo menos el oligonucleótido. En algunas de dichas realizaciones, el oligonucleótido presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27. A título ilustrativo adicional, el oligonucleótido opcionalmente se une detectablemente a un segmento de ácidos nucleicos que comprende una o más posiciones nucleótidas de SEC ID nº 1 seleccionadas de entre el grupo que consiste de: 259, 260, 262, 264, 265, 266, 268, 269, 273, 275, 276, 277, 279, 297, 298, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 308, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 325, 326, 428, 429, 431, 432, 433, 434, 435, 440, 441 y 447. A modo de opción adicional, el oligonucleótido se une detectablemente a un segmento de ácidos nucleicos que comprende una o más posiciones nucleótidas de SEC ID nº 2 seleccionadas de entre el grupo que consiste de: 89, 90, 91, 92, 95, 98, 101, 105, 106, 107, 216, 217, 220, 222, 223, 225, 233, 235, 236, 238, 335, 336, 337, 338, 339, 342, 345, 346 y 351. En otras realizaciones, el kit comprende además un reactivo de detección de ácidos nucleicos que es un anticuerpo específico de secuencia. En determinadas realizaciones, el kit incluye además uno o más reactivos de detección de ácidos nucleicos que se unen específicamente a un ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*. En dichas realizaciones, el kit típicamente incluye además instrucciones para detectar *Chlamydia trachomatis* en la muestra mediante el seguimiento de la unión entre ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos procedentes de la muestra y los reactivos adicionales de detección de ácidos nucleicos, y/o uno o más recipientes para el empaquetamiento de los reactivos adicionales de detección de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el kit típicamente incluye además por lo menos un enzima (por ejemplo una polimerasa, etc.) y/o uno o más nucleótidos.

En algunas realizaciones, el reactivo de detección de ácidos nucleicos se encuentra en solución, mientras que en otras, un soporte sólido comprende el reactivo de detección de ácidos nucleicos. El soporte sólido opcionalmente se selecciona de entre, por ejemplo, una placa, una placa de micropocillos, una perla, una microperla, un tubo, una fibra, una cerda, un peine, un chip de hibridación, una membrana, un cristal simple, una capa cerámica, una monocapa autoensamblante o similares.

Típicamente, el oligonucleótido comprende por lo menos un marcaje y/o por lo menos una fracción inhibidora. Entre los marcajes ejemplares se incluyen, por ejemplo, un pigmento fluorescente, un marcaje débilmente fluorescente, un marcaje no fluorescente, un marcaje colorimétrico, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje bioluminiscente, un anticuerpo, un antígeno, biotina, un hapteno, un grupo modificador de la masa, un isótopo radioactivo, un enzima o similar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una alineación de la secuencia de la repetición directa 9 de *Neisseria gonorrhoeae* (NGDR9) con las secuencias de amplicones de ADN genómico de diversas cepas de *N. gonorrhoeae*.

La figura 2 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de sistema para detectar *N. gonorrhoeae* en una muestra.

La figura 3 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de sistema que incluye un ordenador y un medio legible por ordenador en el que pueden encontrarse realizados diversos aspectos de la presente invención.

La figura 4 muestra una alineación de ClustalW de la secuencia NGDR9 con una parte de la secuencia sección 155 del cromosoma I de *Brucella suis* 1330 (nº de acceso de GenBank® AE014469).

Las figuras 5A y B son fotografías de geles de agarosa que muestran la detección de un segmento de 190 pares de bases de NGDR9.

Las figuras 6 A y B son fotografías de geles de agarosa que muestran la detección de un segmento de 190 pares de bases de NGDR9.

La figura 7 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra la detección de un segmento de 416 pares de bases de NGDR9.

La figura 8 muestra una alineación de ClustalW de la repetición directa 33 de *Neisseria gonorrhoeae* (NGDR33) con una parte de la secuencia sección 77 de *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa MC58 (nº de acceso de GenBank® AE002435).

Las figuras 9 A y B son fotografías de geles de agarosa que muestran la detección de un segmento de 265 pares de bases de NGDR33.

La figura 10 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra la detección de un segmento de 265 pares de bases de NGDR33.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. DEFINICIONES

Una "sonda 5'-nucleasa" se refiere a una sonda oligonucleótida que comprende por lo menos dos marcajes y que emite radiación de intensidad incrementada tras el corte o separación de uno de los dos marcajes respecto de la sonda. En determinadas realizaciones, por ejemplo, se marca una sonda 5'-nucleasas con dos pigmentos fluorescentes diferentes, por ejemplo un pigmento informador en el extremo 5'-terminal y el pigmento o fracción inhibidora en el extremo 3'-terminal. En el caso de que la sonda se encuentre intacta, la transferencia de energía típicamente se produce entre los dos fluoróforos, de manera que la emisión fluorescente del pigmento informador resulta inhibida. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de polimerasa, por ejemplo, una sonda 5'-nucleasa unida a un ácido nucleico molde resulta cortada por la actividad de 5'-nucleasa de, por ejemplo, una polimerasa Taq, de manera que la emisión fluorescente del pigmento informador ya no se encuentra inhibida. Se describen sondas 5'-nucleasa ejemplares en, por ejemplo, la patente US nº 5.210.015, titulada "HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM USING THE NUCLEASE ACTIVITY OF A NUCLEIC ACID POLYMERASE", concedida el 11 de mayo de 1993 a Gelfand et al., en la patente US nº 5.994.056, titulada "HOMOGENEOUS METHODS FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION AND DETECTION", concedida el 30 de noviembre de 1999 a Higuchi, y en la patente US nº 6.171.785, titulada "METHODS AND DEVICES FOR HOMOGENEOUS NUCLEIC ACID AMPLIFICATION AND DETECTOR", concedida el 9 de enero de 2001 a Higuchi.

El término "alteración" se refiere a un cambio en una secuencia de ácidos nucleicos, incluyendo, aunque sin limitación, una sustitución, una inserción y/o una delección.

Una "reacción de amplificación" se refiere a una replicación iniciada por un cebador, de una o más secuencias de un ácido nucleico diana o de complemento de las mismas.

Un "amplicón" se refiere a una molécula producida mediante copia o transcripción de otra molécula, por ejemplo tal como ocurre en la transcripción, clonación y/o en una reacción en cadena de polimerasa ("PCR") (por ejemplo amplificación mediante PCR por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediante PCR dúplex, etc.) u otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos. Típicamente, un amplicón es una copia de un ácido nucleico seleccionado (por ejemplo un ácido nucleico molde o diana) o es complementario al mismo.

Una "señal amplificada" se refiere a una señal detectable incrementada que puede ser producida en ausencia, o conjuntamente, con una reacción de amplificación. Las técnicas ejemplares de amplificación de señales se describen en, por ejemplo, Cao et al., "Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type 1 in human plasma", *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(3):353-361, 1995, y en la patente US nº 5.437.977, de Segev, en la patente US nº 6.033.853, de Delair et al., y en la patente US nº 6.180.777, de Horn.

El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado sustancialmente por como mínimo un gen de inmunoglobulina, o fragmentos de por lo menos un gen de inmunoglobulina, que puede participar en la unión detectable a un ligando. El término incluye formas naturales, así como fragmentos y derivados. Entre los fragmentos dentro del alcance del término tal como se utiliza en la presente memoria se incluyen aquellos producidos mediante digestión con diversas peptidasas, tales como los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, aquellos producidos mediante disociación química, mediante corte químico, con la condición de que el fragmento siga siendo capaz de unión detectable a una molécula diana, tal como un antígeno indicador de una enfermedad.

Una "matriz" se refiere a un ensamblaje de elementos. El ensamblaje puede encontrarse ordenado espacialmente (una "matriz con patrón") o desordenado (una matriz "de patrón aleatorio"). La matriz puede formar o comprender uno o más elementos funcionales (por ejemplo una región sonda en una micromatriz) o puede ser no funcional.

El término "unido" o "conjugado" se refiere a interacciones y/o estados en los que el material o los compuestos se encuentran conectados o de otro modo unidos entre sí. Estas interacciones y/o estados típicamente se producen mediante, por ejemplo, unión covalente, unión iónica, quimiosorción, fisisorción y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, por ejemplo, las sondas oligonucleótidas se unen a soportes sólidos. En algunas de dichas realizaciones, se conjuga una sonda oligonucleótida con biotina (es decir, se biotinila) y se conjuga un soporte sólido con avidina de manera que la sonda se une al soporte sólido mediante la interacción de unión de, por ejemplo, biotina y avidina.

Las especies moleculares "se unen" en el caso de que se asocien entre sí mediante interacciones covalentes y/o no covalentes. Por ejemplo, dos ácidos nucleicos de cadena sencilla complementarios pueden hibridarse entre sí para formar un ácido nucleico con por lo menos una región de doble cadena. A título ilustrativo adicional, los anticuerpos y antígenos correspondientes también pueden asociarse entre sí no covalentemente.

El término "corte" se refiere a un procedimiento de liberación de un material o compuesto respecto de la unión a otro material o compuesto. En determinadas realizaciones, por ejemplo, los oligonucleótidos se cortan de, por ejemplo, un soporte sólido para permitir el análisis de los oligonucleótidos mediante métodos en fase líquida. Ver, por ejemplo, Wells et al., "Cleavage and Analysis of Material from Single Resin Beads", *J. Org. Chem.* 63:6430, 1998.

Un "carácter", utilizado en referencia a un carácter de una cadena de caracteres, se refiere a una subunidad de la cadena. En una realización, el carácter de una cadena de caracteres codifica una subunidad de una molécula biológica codificada. De esta manera, por ejemplo en el caso de que la molécula biológica codificada sea un polinucleótido u oligonucleótido, un carácter de la cadena codifica un único nucleótido.

Una "cadena de caracteres" representa cualquier entidad capaz de almacenar información de secuencia (por ejemplo la estructura de subunidades de una molécula biológica, tal como la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico, etc.). En una realización, la cadena de caracteres puede ser una secuencia simple de caracteres (letras, números u otros símbolos) o puede ser una representación numérica o codificada de dicha información en forma tangible o intangible (por ejemplo electrónica, magnética, etc.). La cadena de caracteres no es necesario que sea "lineal", sino que también puede existir en varias otras formas, por ejemplo de lista encadenada u otra matriz no lineal (por ejemplo utilizada como un código para generar una matriz lineal de caracteres) o similar. Las cadenas de caracteres típicamente son aquellas que codifican cadenas oligonucleótidas o polinucleótidas, directa o indirectamente, incluyendo cualesquiera cadenas encriptadas, o imágenes, o disposiciones de objetos que pueden transformarse sin ambigüedad en cadenas de caracteres que representan secuencias de monómeros o multímeros en polinucleótidos, o similares (constituídos de monómeros naturales o artificiales).

La expresión "Chlamydia trachomatis", "C. trachomatis" o "CT" se refiere a la especie bacteriana trachomatis del género Chlamydia. Ver, por ejemplo, Stephens et al., "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis", *Science* 282:754-759, 1998; Kalman et al., "Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis", *Nature Genetics* 21:385-389, 1999, y Stephens, Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity, ASM Press, 1999. Un número de acceso ejemplar de GenBank® para la secuencia

completa del genoma de *Chlamydia trachomatis* es NC_000117. Ver también la base de datos de *Chlamydia trachomatis*, que se encuentra en Internet en stdgen.lanl.gov desde 12 de marzo de 2004.

5 La expresión "ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*" o "ácido nucleico de *C. trachomatis*" se refiere a un ácido nucleico (y/o un amplicón del mismo) que se deriva o se aísla a partir de *Chlamydia trachomatis*.

La expresión "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que es tanto de la misma longitud como exactamente complementario a un ácido nucleico dado.

10 Una "composición" se refiere a una combinación de dos o más componentes diferentes. En determinadas realizaciones, por ejemplo, una composición incluye un soporte sólido que comprende una o más sondas oligonucleótidas, por ejemplo unidas covalente o no covalentemente a una superficie del soporte. En otras realizaciones, una composición incluye una o más sondas oligonucleótidas en solución.

15 El término "deleción" en el contexto de una secuencia de ácidos nucleicos se refiere a una alteración en la que se elimina por lo menos un nucleótido de la secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo de un extremo 5', de un extremo 3' y/o de una posición interna de la secuencia de ácidos nucleicos.

20 El término "derivado" se refiere a una sustancia química relacionada estructuralmente a otra sustancia, o a una sustancia química que puede producirse a partir de otra sustancia (es decir, la sustancia de la que se deriva), por ejemplo mediante modificación química o enzimática. A título ilustrativo, las sondas oligonucleótidas se conjugan opcionalmente con biotina o con un derivado de biotina. A título ilustrativo adicional, un ácido nucleico puede "derivarse" de otro mediante procedimientos tales como la síntesis química basada en conocimientos sobre la secuencia del otro ácido nucleico, la amplificación del otro ácido nucleico o similares.

25 La expresión "unión detectable" se refiere a la unión entre por lo menos dos especies moleculares (por ejemplo una sonda de ácidos nucleicos y un ácido nucleico diana, un anticuerpo específico de secuencia y un ácido nucleico diana, etc.) que es detectable sobre una señal de fondo (por ejemplo ruido) utilizando uno o más métodos de detección.

30 Los ácidos nucleicos se han "extendido" o "alargado" cuando se han incorporado nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico se extiende opcionalmente con un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa, que típicamente añade nucleótidos al extremo 3'-terminal de un ácido nucleico.

35 Un "cebador de ácidos nucleicos extendido" se refiere a un cebador de ácidos nucleicos al que se han añadido o de otro modo incorporado uno o más nucleótidos adicionales (por ejemplo se han unido covalentemente).

40 Los ácidos nucleicos "se hibridan" o "se unen" cuando se asocian entre sí, típicamente en solución. Los ácidos nucleicos se hibridan debido a una diversidad de fuerzas físicoquímicas bien caracterizadas, tales como los enlaces de hidrógeno, la exclusión de solvente, el apilamiento de bases y similares. Puede encontrarse una guía extensa a la hibridación de los ácidos nucleicos en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes* parte 1, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", (Elsevier, New York, 1993), así como en Ausubel (Ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, volúmenes I, II y III, 1997 Hames y Higgins, *Gene Probes 1*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England, 1995 (Hames y Higgins 1), y Hames y Higgins, *Gene Probes 2*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England, 1995 (Hames y Higgins 2) proporcionan detalles sobre la síntesis, marcaje, detección y cuantificación de ADN y ARN, incluyendo oligonucleótidos.

45 La expresión "condiciones de lavado de hibridación restrictiva" en el contexto de los ensayos o experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, las hibridaciones southern y northern, o similares, son dependientes de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Puede encontrarse una guía extensa a la hibridación de los ácidos nucleicos en Tijssen, *supra*, 1993, y en Hames y Higgins, 1 y 2.

50 Para los fines de la presente invención, generalmente la hibridación y condiciones de lavado "altamente restrictivas" se seleccionan para que sean por lo menos aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_f es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia de ensayo se hibrida con una sonda perfectamente correspondiente. Se seleccionan condiciones muy restrictivas para que sean iguales a la T_f para una sonda particular.

55 Un ejemplo de condiciones restrictivas de hibridación para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios sobre un filtro en una transferencia southern o northern es formalina al 50% con 1 mg de heparina a 42°C, llevando a cabo la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado restrictivas es un lavado 0,2x SSC a 65°C durante 15 minutos (ver Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, para una descripción de tampón SSC). Con frecuencia, antes del

lavado altamente restrictivo se lleva a cabo un lavado poco restrictivo para eliminar la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de lavado poco restrictivo es 2x SSC a 40°C durante 15 minutos. En general, una relación de señal a ruido de 5x (o superior) la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica.

La hibridación comparativa puede utilizarse para identificar ácidos nucleicos de la invención.

En particular, la detección de hibridación restrictiva en el contexto de la presente invención indica una fuerte similitud estructural respecto a, por ejemplo, los ácidos nucleicos proporcionados en el listado de secuencias de la presente memoria. Por ejemplo, resulta deseable identificar ácidos nucleicos de ensayo que se hibridan con los ácidos nucleicos ejemplares de la presente memoria bajo condiciones restrictivas. Una medida de la hibridación restrictiva es la capacidad de hibridarse detectablemente con uno de los ácidos nucleicos listados (por ejemplo ácidos nucleicos con las secuencias seleccionados de entre SEC ID nº 3 y nº 27 y complementos de las mismas) bajo condiciones restrictivas. Las condiciones restrictivas de hibridación y de lavado pueden detectarse fácilmente de modo empírico para cualquier ácido nucleico de ensayo.

Por ejemplo, para determinar las condiciones altamente restrictivas de hibridación y de lavado, se incrementa gradualmente la restrictividad de las condiciones de hibridación y lavado (por ejemplo mediante incremento de la temperatura, reducción de la concentración salina, incremento de la concentración de detergente y/o incremento de la concentración de solventes orgánicos, tales como formalina, en la hibridación o en el lavado), hasta satisfacer un conjunto seleccionado de criterios. Por ejemplo, se incrementa gradualmente la restrictividad de las condiciones de hibridación y de lavado hasta que una sonda que consiste o que comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas de entre SEC ID nº 3 y nº 27 y secuencias polinucleótidas complementarias de las mismas, se une a una diana complementaria perfectamente correspondiente (nuevamente, un ácido nucleico que comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas de entre SEC ID nº 3 y nº 27 y secuencias polinucleótidas complementarias de las mismas), con una relación de señal a ruido que es por lo menos 5x la observada para la hibridación de la sonda a un ácido nucleico no diana. En este caso, los ácidos nucleicos no diana son aquellos procedentes de organismos diferentes de *N. gonorrhoeae*, y en determinadas realizaciones, *C. trachomatis*. Entre los ejemplos de dichos ácidos nucleicos no diana se incluyen, por ejemplo, aquellos con números de acceso de GenBank®, tales como AE01469 (sección 155 del cromosoma I de *Brucella suis* 1330) y AE002435 (sección 77 de *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa MC58). El experto en la materia podrá identificar secuencias similares adicionales en, por ejemplo, GenBank®.

Se dice que un ácido nucleico de ensayo se hibrida específicamente con un ácido nucleico sonda en el caso de que se hibride la mitad de bien con la sonda que la diana complementaria perfectamente correspondiente, es decir, con una relación de señal a ruido que es por lo menos la mitad de alta que en la hibridación de la sonda con la diana bajo condiciones en las que la sonda perfectamente correspondiente se une a la diana complementaria perfectamente correspondiente con una relación de señal a ruido que es por lo menos aproximadamente 5x a 10x el nivel observado para la hibridación con los ácidos nucleicos no diana AE01469 (sección 155 del cromosoma I de *Brucella suis* 1330) o AE002435 (sección 77 de *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa MC58).

Las condiciones de lavado e hibridación de restrictividad ultraelevada son aquéllas en las que la restrictividad de las condiciones de hibridación y lavado se incrementan hasta que la relación de señal a ruido para la unión de la sonda al ácido nucleico diana complementario perfectamente correspondiente sea por lo menos 10X tan alto como el observado para la hibridación con los ácidos nucleicos no diana AE01469 (sección 155 del cromosoma I de *Brucella suis* 1330) o AE002435 (sección 77 de *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa MC58). Un ácido nucleico diana que se hibrida con una sonda bajo dichas condiciones, con una relación de señal a ruido como mínimo la mitad de la del ácido nucleico diana complementario perfectamente correspondiente, se dice que se une a la sonda bajo condiciones de restrictividad ultraelevada.

De manera similar, pueden determinarse niveles de restrictividad incluso más altos mediante el incremento gradual de la restrictividad de las condiciones de hibridación y/o lavado del ensayo relevante de hibridación. Por ejemplo, pueden identificarse ensayos en los que las condiciones de lavado e hibridación de restrictividad ultraelevada son aquéllas en las que la restrictividad de las condiciones de hibridación y lavado se incrementan hasta que la relación de señal a ruido para la unión de la sonda al ácido nucleico diana complementario perfectamente correspondiente sea por lo menos 10X tan alto como el observado para la hibridación con los ácidos nucleicos no diana AE01469 (sección 155 del cromosoma I de *Brucella suis* 1330) o AE002435 (sección 77 de *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa MC58). Un ácido nucleico diana que se hibrida con una sonda bajo dichas condiciones, con una relación de señal a ruido como mínimo la mitad de la del ácido nucleico diana complementario perfectamente correspondiente, se dice que se une a la sonda bajo condiciones de restrictividad ultraelevada.

La detección de ácidos nucleicos diana que se hibridan con los ácidos nucleicos representados por SEC ID nº 3 a nº 27 bajo condiciones de restrictividad elevada, ultraelevada y ultra-ultraelevada son una característica de la invención. Entre los ejemplos de dichos ácidos nucleicos se incluyen aquellos con una o unas cuantas sustituciones conservadoras de ácidos nucleicos en comparación con una secuencia de ácidos nucleicos dada.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que presentan un porcentaje especificado de nucleótidos o de residuos aminoácidos que son iguales, al comparar y alinear para la máxima correspondencia, por ejemplo medida utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para el experto en la materia o mediante inspección visual. Los algoritmos ejemplares que resultan adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los programas BLAST, que se describen en, por ejemplo, Altschul et al., "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990; Gish et al., "Identification of protein coding regions by database similarity search", *Nature Genet.* 3:266-272, 1993; Madden et al., "Applications of network BLAST server", *Meth. Enzymol.* 266:131-141, 1996; Altschul et al., "Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997), y Zhang et al., "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation", *Genome Res.* 7:649-656, 1997. También son conocidos de la técnica muchos otros algoritmos de alineación óptima y se utilizan opcionalmente para determinar el porcentaje de identidad de secuencia.

La expresión "en solución" se refiere a una condición de ensayo o reacción en la que los componentes del ensayo o reacción no se encuentran unidos a un soporte sólido y se encuentran presentes en un medio líquido. Entre los medios líquidos ejemplares se incluyen los líquidos acuosos y orgánicos. Por ejemplo, entre determinados ensayos de la invención se incluyen la incubación de sondas oligonucleótidas conjuntamente con ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* y amplicones de ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* en solución de modo que se produzca la hibridación.

El término "inserción" en el contexto de una secuencia de ácidos nucleicos se refiere a una alteración en la que se añade por lo menos un nucleótido a la secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo en un extremo 5', en un extremo 3' y/o de una posición interna de la secuencia de ácidos nucleicos.

Un "marcaje" se refiere a una fracción unida (covalente o no covalentemente) o capaz de unirse a una molécula, proporcionando dicha fracción, o siendo capaz de proporcionar, información sobre la molécula (por ejemplo información descriptiva, identificativa, etc., sobre la molécula) u otra molécula con la que interactúa la molécula marcada (por ejemplo con la que se hibrida, etc.). Entre los marcajes ejemplares se incluyen marcajes fluorescentes (incluyendo, por ejemplo, inhibidores o absorbedores), marcajes débilmente fluorescentes, marcajes no fluorescentes, marcajes colorimétricos, marcajes quimioluminiscentes, marcajes bioluminiscentes, marcajes radioactivos, grupos modificadores de la masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos y enzimas (incluyendo, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa, etc.) y similares.

Un "conector" se refiere a una fracción química que une covalente o no covalentemente un compuesto o grupo sustituyente a otra fracción, por ejemplo un ácido nucleico, una sonda oligonucleótida, un cebador de ácidos nucleicos, un amplicón, un soporte sólido o similar. Por ejemplo, se utilizan opcionalmente conectores para unir sondas oligonucleótidas a un soporte sólido (por ejemplo en una matriz de sondas lineal u otra disposición lógica). A título ilustrativo adicional, un conector opcionalmente une un marcaje (por ejemplo un pigmento fluorescente, un isótopo radioactivo, etc.) a una sonda oligonucleótida, cebador de ácidos nucleicos o similar. Los conectores típicamente son fracciones químicas por lo menos bifuncionales, y en determinadas realizaciones, comprenden uniones cortables que pueden ser cortadas mediante, por ejemplo, calor, un enzima, un agente químico, radiación electromagnética, etc., liberando materiales o compuestos de, por ejemplo, un soporte sólido. Una elección cuidadosa de conector permite llevar a cabo el corte bajo condiciones apropiadas compatibles con la estabilidad del compuesto y el método de ensayo. Generalmente un conector no presenta actividad biológica específica aparte de, por ejemplo, la unión de especies químicas entre sí o la conservación de cierta distancia mínima u otra relación espacial entre dichas especies. Sin embargo, los constituyentes de un conector pueden seleccionarse para influir sobre cierta propiedad de las especies químicas unidas, tal como la conformación tridimensional, la carga neta, la hidrofobicidad, etc. Entre los conectores ejemplares se incluyen, por ejemplo, oligopéptidos, oligonucleótidos, oligopoliamidas, oligoetilengliceroles, oligoacrilamidas, cadenas alquilo o similares. Se proporciona una descripción adicional de moléculas conectoras en, por ejemplo, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Science, 1996; Lyttle et al., *Nucleic Acids Res.* 24(14):2793, 1996; Shchepino et al., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 20:369, 2001; Doronina et al., *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids* 20:1007, 2001; Trawick et al., *Bioconjugate Chem.* 12:900, 2001; Olejnik et al., *Methods in Enzymology* 291:135, 1998; y Pljevaljic et al., *J. Med. Chem.* 125(12):3486, 2003.

Un grupo "modificador de la masa" modifica la masa, típicamente medida en términos de peso molecular en daltons, de una molécula que comprende el grupo. Por ejemplo, los grupos modificadores de la masa que incrementan el poder de discriminación de tamaño o secuencia entre por lo menos dos ácidos nucleicos con diferencias de una sola base, pueden utilizarse para facilitar la secuenciación utilizando, por ejemplo, determinaciones del peso molecular.

Una "mezcla" se refiere a una combinación de dos o más componentes diferentes. Una "mezcla de reacción" se refiere a una mezcla que comprende moléculas que pueden participar y/o facilitar una reacción dada. Una "mezcla de reacción de amplificación" se refiere a una solución que contiene reactivos necesarios para llevar a cabo una

reacción de amplificación, y típicamente contiene cebadores, una ADN polimerasa termoestable, dNTP y un catión metálico divalente en un tampón adecuado. Una mezcla de reacción se considera completa en el caso de que contenga todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción, e incompleta en el caso de que contenga únicamente un subconjunto de los reactivos necesarios. El experto en la materia entenderá que los componentes de reacción se almacenan rutinariamente como soluciones separadas, conteniendo cada una un subconjunto de los componentes totales, por razones de comodidad, estabilidad de almacenamiento o para permitir el ajuste dependiente de la aplicación de las concentraciones de los componentes, y que los componentes de reacción se combinan previamente a la reacción para crear una mezcla de reacción completa. Además, el experto en la materia entenderá que los componentes de reacción se empaquetan separadamente para su comercialización y que los kits comerciales útiles pueden contener cualquier subconjunto de componentes de reacción, que incluye los cebadores modificados de la invención.

Un "cebador de ácidos nucleicos modificados" se refiere a un cebador de ácidos nucleicos que comprende una fracción o secuencia de nucleótidos que proporciona una propiedad deseada al cebador de ácidos nucleicos. En determinadas realizaciones, por ejemplo, los cebadores de ácidos nucleicos modificados comprenden "modificaciones alteradoras de la especificidad de amplificación de los ácidos nucleicos" que, por ejemplo, reducen la amplificación no específica de los ácidos nucleicos (por ejemplo minimizan la formación de dímeros de cebadores o similares), incrementan el rendimiento de un amplicón diana deseado, y/o similar. Se describen ejemplos de modificaciones alteradoras de la especificidad de amplificación de ácidos nucleicos en, por ejemplo, la patente US nº 6.01.611, titulada "Modified nucleic acid amplification primers", concedida el 14 de diciembre de 1999 a Will. Entre otras modificaciones ejemplares de cebadores de ácidos nucleicos se incluyen "una modificación de conector de sitio de restricción", en la que se une una secuencia de nucleótidos que comprende un sitio de restricción seleccionado a, por ejemplo, el extremo 5' de un cebador de ácidos nucleicos. Los conectores de sitio de restricción típicamente se unen a cebadores de ácidos nucleicos para facilitar la posterior clonación de amplicones o similar.

Una "fracción" o "grupo" se refiere a una de las partes en las que algo, tal como una molécula, se divide (por ejemplo un grupo funcional, un grupo sustituyente, o similar). Por ejemplo, una sonda oligonucleótida opcionalmente comprende una fracción inhibidora, una fracción de marcaje, o similar.

La expresión "Neisseria gonorrhoeae", "N. gonorrhoeae" o "NG" se refiere a la especie bacteriana gonorrhoeae del género Neisseria. Ver, por ejemplo, Schoolnik (Ed.) Pathogenic Neisseriae: Proceedings of the Fourth International Symposium, Asilomar, California, 21-25 de octubre de 1984, Amer. Society for Microbiology, 1986. Se proporciona una descripción general adicional de N. gonorrhoeae y C. trachomatis en, por ejemplo, Struthers y Westran, Clinical Bacteriology, ASM Press y Manson Publishing, 2003; Persing et al., Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, ASM Press, 2003; Murray, Manual of Clinical Microbiology, 8a Ed., ASM Press 2003. Ver también la base de datos de Neisseria gonorrhoeae proporcionada en el sitio de Internet, en stdgen.lanl.gov, desde el 12 de marzo de 2004.

La expresión "ácido nucleico de Neisseria gonorrhoeae" o "ácido nucleico de N. gonorrhoeae" se refiere a un ácido nucleico (y/o un amplicón del mismo) que se deriva o se aísla a partir de Neisseria gonorrhoeae.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a nucleótidos (por ejemplo ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, dideoxinucleótidos, etc.) y polímeros que comprenden dichos nucleótidos unidos covalentemente entre sí, de manera lineal o ramificada. Entre los ácidos nucleicos ejemplares se incluyen ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), híbridos de ADN-ARN, oligonucleótidos, polinucleótidos, genes, ADNc, aptámeros, ácidos nucleicos antisentido, ARN interfirientes (ARNi), balizas moleculares, sondas de ácidos nucleicos, ácidos péptido-nucleicos (APN), ácidos nucleicos bloqueados (LNATM), conjugados de APN-ADN, conjugados de APN-ARN, conjugados de LNATM-ADN, conjugados de LNATM-ARN, etc.

Un ácido nucleico típicamente es de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, tal como se indica de manera general en la presente memoria, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternativos, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, fosforamida (Beaucage et al., Tetrahedron 49(10):1925, 1993) y referencias en la misma; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800, 1970; Sprinzl et al., Eur. J. Biochem. 81:579, 1977; Letsinger et al., Nucl. Acids Res. 14: 3487, 1986; Sawai et al., Chem. Lett. 805, 1984; Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470, 1988; and Pauwels et al., Chemica Scripta 26: 1419, 1986; fosforotioato (Mag et al., Nucleic Acids Res. 19:1437, 1991; y la patente US nº 5.644.048); fosforoditioato (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111:2321, 1989), enlaces O-metilfosforoamidita (ver Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press, 1992), y esqueletos y enlaces de ácidos péptido-nucleicos (ver Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895, 1992; Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008, 1992; Nielsen, Nature 365:566, 1993; y Carlsson et al., Nature 380: 207). Entre otros ácidos nucleicos análogos se incluyen aquellos con esqueletos cargados positivamente (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097, 1995); esqueletos no iónicos (patentes US nº 5.386.023, nº 5.637.684, nº 5.602.240, nº 5.216.141 y nº 4.469.863; Angew. Chem. Intl. Ed. English 30: 423, 1991; Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470, 1988; Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 13:1597, 1994; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", editores: Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic &

Medicinal Chem. Lett. 4: 395, 1994; Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34:17, 1994; Tetrahedron Lett. 37:743, 1996) y esqueletos no de ribosa, incluyendo los indicados en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se encuentran incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (ver Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. páginas 169-176, 1995). También se describen varios análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawls C. y E. News, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden llevarse a cabo para facilitar la adición de fracciones adicionales, tales como marcajes, o para alterar la estabilidad y vida media de dichas moléculas en medios fisiológicos.

Además de dichas bases heterocíclicas naturales que se encuentran presentes típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de ácidos nucleicos también incluyen los que presentan bases heterocíclicas no naturales o modificadas, muchas de las cuales se describen, o se hace referencia a ellas, en la presente memoria. En particular, se describen adicionalmente muchas bases no naturales en, por ejemplo, Seela et al., Helv. Chim. Acta 74:1790, 1991; Grein et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:971-976, 1994, y Seela et al., Helv. Chim. Acta 82:1640, 1999. A título ilustrativo adicional, opcionalmente se incluyen determinadas bases utilizadas en los nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_f). Por ejemplo, entre algunos de ellos se incluyen las 7-deazapurinas (por ejemplo la 7-deazaguanina, la 7-deazaadenina, etc.), las pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.990.303, titulada "Synthesis of 7-deaza-2'-deoxyguanosine nucleotides", concedida el 23 de noviembre de 1996 a Seela. Entre otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina, derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo y similares.

También se describen ejemplos de bases y nucleótidos modificados en, por ejemplo, la patente US nº 5.484.908, titulada "Oligonucleotides containing 5-propynyl pyrimidines", concedida el 16 de enero de 1996 a Froehler et al.; en la patente US nº 5.645.985, titulada "Enhanced triple-helix and double-helix formation with oligomers containing modified pyrimidines", concedida el 8 de julio de 1997 a Froehler et al.; en la patente US nº 5.830.653, titulada "Methods of using oligomers containing modified pyrimidines", concedida el 3 de noviembre de 1998 a Froehler et al.; en la patente US nº 6.639.059, titulada "Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides", concedida el 28 de octubre de 2003 a Kochkine et al.; en la patente US nº 6.303.315, titulada "One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples", concedida el 16 de octubre de 2001 a Skouv, y en la solicitud publicada de patente US nº 2003/0092905, titulada "Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides", de Kochkine, publicada el 15 de mayo de 2003.

La expresión "reactivo de detección de ácidos nucleicos" se refiere a un reactivo que se une detectablemente (por ejemplo enlaces de hidrógeno en la hibridación de ácidos nucleicos, en el reconocimiento de anticuerpo-antígeno, o similar, u otros tipos de interacciones de unión) a un ácido nucleico que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante. Por ejemplo, los ácidos nucleicos (por ejemplo sondas de ácidos nucleicos, cebadores de ácidos nucleicos, etc.) que comprenden secuencias seleccionadas de entre SEC ID nº 3 y nº 27 ó complementos de las mismas se unen específicamente a los ácidos nucleicos que presentan dichas secuencias. Entre otros reactivos ejemplares de detección de ácidos nucleicos se incluyen anticuerpos específicos de secuencia que se unen específicamente a ácidos nucleicos que comprenden SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante.

Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo un éster fosfato de un nucleósido. Por ejemplo, un nucleótido puede incluir 1, 2, 3 ó más grupos fosfato unidos covalentemente a una posición 5' de una fracción de azúcar del nucleósido.

Un "biocatalizador que incorpora nucleótidos" se refiere a un catalizador que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Los biocatalizadores que incorporan nucleótidos típicamente son enzimas. Un "enzima" es un catalizador basado en una proteína y/o ácidos nucleicos, que actúa reduciendo la energía de activación de una reacción química en la que participan otros compuestos o "sustratos". Un "enzima que incorpora nucleótidos" se refiere a un enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico, por ejemplo durante la amplificación de los ácidos nucleicos o similar. Entre los enzimas ejemplares que incorporan nucleótidos se incluyen, por ejemplo, polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas, polinucleótido fosforilasas, y similares.

Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye por lo menos dos unidades monoméricas de ácidos nucleicos (por ejemplo nucleótidos), típicamente más de tres unidades monoméricas, y más típicamente más de diez

unidades monoméricas. El tamaño exacto de un oligonucleótido generalmente depende de diversos factores, incluyendo la función o uso último del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier método adecuado, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación del ADN, la transcripción inversa, la clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas o la síntesis química directa mediante un método tal como el método del fosfotriéster de Narang et al. (Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979); el método del fosfodiéster de Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; el método de la dietilfosforamida de Beaucage et al., Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981); el método del triéster de Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981; los métodos de síntesis automatizada, o el método en soporte sólido de la patente US nº 4.458.066, entre otros métodos conocidos de la técnica.

La expresión "sonda oligonucleótida", "sonda de ácidos nucleicos" o "sonda" se refiere a un oligonucleótido marcado o no marcado capaz de hibridarse selectivamente con un ácido nucleico diana bajo condiciones adecuadas. Típicamente, una sonda es suficientemente complementaria a una secuencia diana específica (por ejemplo un ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante), una secuencia de ácidos nucleicos de *C. trachomatis*, etc.) contenida en una muestra de ácidos nucleicos para formar un dúplex estable de hibridación con la secuencia diana bajo condiciones de hibridación seleccionadas, tales como, aunque sin limitación, condiciones restrictivas de hibridación. Un ensayo de hibridación llevado a cabo utilizando la sonda bajo condiciones de hibridación suficientemente restrictivas permite la detección selectiva de una secuencia diana específica. La expresión "región hibridante" se refiere a la región de un ácido nucleico que es exacta o sustancialmente complementaria a, y que por lo tanto se hibrida con, la secuencia diana. Para la utilización en un ensayo de hibridación para la discriminación de diferencias de nucleótidos individuales en una secuencia, la región hibridante típicamente presenta una longitud de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos. Aunque la región hibridante generalmente se refiere al oligonucleótido entero, la sonda puede incluir secuencias de nucleótidos adicionales que funcionan, por ejemplo, como sitios de unión de conector, proporcionando un sitio para la unión de la secuencia de la sonda a un soporte sólido o similar. En determinadas realizaciones, una sonda oligonucleótida de la invención comprende uno o más marcajes (por ejemplo un pigmento informador, una fracción inhibidora, etc.), tal como una sonda FRET, una baliza molecular o similar, que también puede utilizarse para detectar la hibridación entre los ácidos nucleicos de sonda y diana en una muestra. En algunas realizaciones, la región hibridante de la sonda oligonucleótida es completamente complementaria a la secuencia diana. Sin embargo, en general, la complementariedad completa no resulta necesaria; los dúplex estables pueden contener bases incorrectamente apareadas o bases desapareadas. La modificación de las condiciones restrictivas puede resultar necesaria para permitir la formación de un dúplex estable de hibridación con uno o más apareamientos incorrectos de pares de bases o bases desapareadas. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, proporciona una guía para realizar una modificación adecuada. La estabilidad del dúplex de diana/sonda depende de varias variables, incluyendo la longitud del oligonucleótido, la composición y secuencia de bases del oligonucleótido, la temperatura y las condiciones iónicas. El experto en la materia reconocerá que, en general, el complemento exacto de una sonda dada de manera similar resulta útil como sonda. Las sondas ejemplares de la invención, las cuales se unen a un ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una secuencia de entre SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante, comprenden secuencias seleccionadas de entre SEC ID nº 3 y nº 27 y complementos de las mismas según la reivindicación 1. El experto en la materia apreciará además que, en determinadas realizaciones, las sondas de ácidos nucleicos también pueden utilizarse como cebadores de ácidos nucleicos.

Un "cebador de ácidos nucleicos" o "cebador" es un ácido nucleico que puede hibridarse con un ácido nucleico molde (por ejemplo un ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante, un ácido nucleico de *C. trachomatis*, etc.) y permite la extensión o alargamiento de cadena utilizando, por ejemplo, un biocatalizador incorporador de nucleótidos, tal como una polimerasa bajo condiciones de reacción apropiadas. Un cebador de ácidos nucleicos típicamente es un oligonucleótido natural o sintético (por ejemplo un oligodesoxirribonucleótido de cadena sencilla, etc.). Aunque opcionalmente se utilizan otras longitudes de cebador de ácidos nucleicos, típicamente comprenden regiones hibridantes de longitud comprendida entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos. Los cebadores de ácidos nucleicos cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con los ácidos nucleicos de molde de *N. gonorrhoeae* o de *C. trachomatis*. Un cebador de ácidos nucleicos que es por lo menos parcialmente complementario a una subsecuencia de un ácido nucleico de molde de *N. gonorrhoeae* o de *C. trachomatis* típicamente resulta suficiente para hibridarse con el molde para que se produzca la extensión. Un cebador de ácidos nucleicos puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcaje detectable, por ejemplo mediante técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas, químicas u otras técnicas. A título ilustrativo, entre los marcajes útiles se incluyen isótopos radioactivos, pigmentos fluorescentes, reactivos electroquímicos, enzimas (utilizados comúnmente en los ensayos de ELISA), biotina o haptenos y proteínas para las que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales. Muchos de dichos marcajes y otros marcajes se describen en mayor

detalle en la presente memoria y/o de otro modo son conocidos de la técnica. Los cebadores de ácidos nucleicos ejemplares de la invención, los cuales se unen a un ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de entre SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante, comprenden secuencias seleccionadas de entre SEC ID nº 3 y nº 27 y complementos de las mismas según la reivindicación 1. El experto en la materia apreciará que, en determinadas realizaciones, los cebadores de ácidos nucleicos también pueden utilizarse como sondas de ácidos nucleicos.

Una "fracción inhibidora" o "inhibidor" se refiere a una fracción que reduce y/o es capaz de reducir la emisión detectable de radiación, por ejemplo la radiación fluorescente o luminiscente, de una fuente que de otra manera habría emitido dicha radiación. Un inhibidor típicamente reduce la radiación detectable emitida por la fuente como mínimo al 50%, típicamente como mínimo al 80%, y más típicamente como mínimo al 90%. Se proporcionan inhibidores ejemplares en, por ejemplo, la patente US nº 6.465.175, titulada "Oligonucleotide probes bearing quenchable fluorescent labels, and methods of use thereof", concedida el 15 de octubre de 2002 a Horn et al.

El término "muestra" se refiere a cualquier sustancia que contiene, o que se supone que contiene, ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*, incluyendo, aunque sin limitación, tejidos o líquidos aislados de uno o más sujetos o individuos, constituyentes de cultivos celulares in vitro, así como muestras clínicas. Entre las muestras ejemplares se incluyen sangre, plasma, suero, orina, líquido sinovial, líquido seminal, plasma seminal, líquido prostático, líquido vaginal, líquido cervical, líquido uterino, raspados cervicales, líquido amniótico, raspados anales, moco, esputo, tejido y similares.

La expresión "muestra derivada de un sujeto" se refiere a una muestra obtenida del sujeto, haya sido o no sometida la muestra a una o más etapas de procesamiento (por ejemplo lisis celular, eliminación de residuos, estabilización, etc.) previamente al análisis. A título ilustrativo, las muestras pueden derivarse de sujetos mediante raspado, venipunción, frotis, biopsia o cualquier otra técnica conocida.

La expresión "se une selectivamente" o "de unión selectiva" en el contexto de los reactivos de detección de ácidos nucleicos se refiere a un reactivo de detección de ácidos nucleicos que se une a un ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de entre SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante, en mayor medida que el reactivo de detección de ácidos nucleicos, bajo las mismas condiciones de hibridación, a ácidos nucleicos procedentes de por lo menos tres organismos seleccionados de cada una de las Tablas X y XI.

La expresión "detecta selectivamente" se refiere a la capacidad de detectar un ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, o la variante, en mayor medida que los ácidos nucleicos procedentes de otros organismos.

La expresión "que se hibrida selectivamente" o "hibridación selectiva" se produce cuando una secuencia de ácidos nucleicos se hibrida con una secuencia diana de ácidos nucleicos especificada en un grado detectablemente superior a su hibridación con secuencia de ácidos nucleicos no diana. Las secuencias selectivamente hibridantes presentan una identidad de secuencia (es decir, una complementariedad) de por lo menos 56%, 60%, 70%, 80% ó 90%, o superior, por ejemplo típicamente entre 95% y 100%, entre sí.

Una "secuencia" de un ácido nucleico se refiere al orden e identidad de los nucleótidos en el ácido nucleico. Una secuencia típicamente se lee en la dirección 5' a 3'.

Un "anticuerpo específico de secuencia" se refiere a un anticuerpo que se une detectablemente a ácidos nucleicos con secuencias que consisten de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante.

La expresión "reacción de secuenciación" se refiere a una reacción que incluye, por ejemplo, la utilización de nucleótidos terminadores y que está diseñada para elucidar la secuencia de nucleótidos en un ácido nucleico dado.

Un "conjunto" se refiere a un grupo de por lo menos dos elementos. Por ejemplo, un conjunto puede incluir 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 1.000 u otro número de tipos de molécula o secuencia. Por ejemplo, entre determinados aspectos de la invención se incluyen mezclas de reacción que presentan conjuntos de amplicones. Un "subconjunto" se refiere a cualquier parte de un conjunto.

Un "soporte sólido" se refiere a un material sólido que puede derivatizarse o unirse de otro modo a una fracción química, tal como una sonda oligonucleótida o similar. Entre los soporte sólidos ejemplares se incluyen placas,

perlas, microperlas, tubos, fibras, cerdas, peines, chips de hibridación (incluyendo sustratos micromatrices, tales como los utilizados en las matrices de sondas GeneChip® (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) y similares), membranas, cristales simples, capas cerámicas, monocapas autoensamblantes, y similares.

Una sonda oligonucleótida es "específica" para una secuencia diana en el caso de que el número de apareamientos incorrectos presente entre el oligonucleótido y la secuencia diana sea inferior al número de apareamientos incorrectos presente entre el oligonucleótido y secuencias no diana que podrían encontrarse presentes en una muestra. Pueden seleccionarse las condiciones de hibridación bajo las que se forman dúplex estables únicamente en el caso de que el número de apareamientos erróneos presente no sea superior al número de apareamientos erróneos presente entre el oligonucleótido y la secuencia diana. Bajo dichas condiciones, el oligonucleótido específico de diana puede formar un dúplex estable únicamente con una secuencia diana. De esta manera, la utilización de cebadores específicos de diana bajo condiciones de amplificación convenientemente restrictivas permite la amplificación específica de dichas secuencias, las cuales contienen los sitios diana de unión a cebador. De manera similar, la utilización de sondas específicas de diana bajo condiciones de hibridación convenientemente restrictivas permite la detección de una secuencia diana específica.

Un "sujeto" se refiere a un organismo. Típicamente, el organismo es un organismo mamífero, particularmente un organismo humano. En determinadas realizaciones, por ejemplo, un sujeto es un paciente que se sospecha que presenta una infección por NG y/o por CT.

Una "subsecuencia" o "segmento" se refiere a cualquier porción de una secuencia de ácidos nucleicos completa.

Una "variante sustancialmente idéntica" en el contexto de ácidos nucleicos o polipéptidos se refiere a dos o más secuencias que presentan una identidad de por lo menos 85%, típicamente de por lo menos 90%, más típicamente de por lo menos 95% respecto al compararlas y alinearlas para la máxima correspondencia, medida utilizando, por ejemplo, un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. La identidad sustancial generalmente existe en una región de las secuencias que presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos o aminoácidos, más típicamente en una región que presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos o aminoácidos, y todavía más típicamente las secuencias son sustancialmente idénticas en una región de una longitud de por lo menos aproximadamente 25 nucleótidos o aminoácidos. En algunas realizaciones, por ejemplo, las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de la longitud completa de los ácidos nucleicos o polipéptidos que se comparan.

El término "sustitución" en el contexto de una secuencia de ácidos nucleicos se refiere a una alteración en la que por lo menos un nucleótido de la secuencia de ácidos nucleicos se sustituye por un nucleótido diferente.

Las expresiones "secuencia diana", "región diana" y "ácido nucleico diana" se refieren a una región de un ácido nucleico, que debe amplificarse, detectarse o de otro modo analizarse.

Un "nucleótido terminador" se refiere a un nucleótido, que tras la incorporación en un ácido nucleico evita la extensión adicional del ácido nucleico, por ejemplo por como mínimo un biocatalizador que incorpora nucleótidos.

Un "enzima termoestable" se refiere a un enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y conserva suficiente actividad catalítica al someterlo a temperaturas elevadas durante periodos seleccionados de tiempo. Por ejemplo, una polimerasa termoestable conserva suficiente actividad para llevar a cabo reacciones de extensión de cebador posteriores al someterla a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para llevar a cabo la desnaturalización de los ácidos nucleicos de doble cadena. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de los ácidos nucleicos son bien conocidas de la técnica y se ejemplifican en las patentes US nº 4.683.202 y nº 4.683.195. Tal como se utiliza en la presente memoria, una polimerasa termoestable típicamente resulta adecuada para la utilización en una reacción de ciclado térmico, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de la manera adecuada para formar productos de extensión de cebador que son complementarios a una cadena molde de ácidos nucleicos (por ejemplo subsecuencias seleccionadas de un genoma de *N. gonorrhoeae* o de *C. trachomatis*).

II. DESCRIPCIÓN GENERAL

La invención se refiere a la detección selectiva de *Neisseria gonorrhoeae*. En particular, basándose en nuevas estrategias de detección que utilizan por lo menos una de las dos regiones diana del genoma de *N. gonorrhoeae*, pueden diagnosticarse las infecciones por *N. gonorrhoeae* utilizando los métodos y reactivos indicados en la presente memoria. Cada una de dichas regiones diana presenta múltiples copias en el genoma de *N. gonorrhoeae*. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, esto típicamente facilita la detección de *N. gonorrhoeae* en las muestras utilizando los enfoques descritos en la presente memoria en comparación con técnicas con diana en regiones de una sola copia del genoma. Además, los reactivos de detección de ácidos nucleicos descritos en la presente memoria generalmente se unen detectablemente, bajo condiciones de ensayo seleccionadas, a secuencias de nucleótidos que se encuentran presentes en *N. gonorrhoeae*, pero que no se encuentran presentes en otras especies,

minimizando de esta manera la aparición de, por ejemplo, falsos positivos. Esta especificidad se ilustra en, por ejemplo, las figuras 5 a 7, 9 y 10, y en la descripción relacionada proporcionada en los ejemplos, posteriormente. También se describen en la presente memoria muchas otras características de la invención.

A título ilustrativo adicional, entre determinados métodos se incluyen poner en contacto o incubar reactivos de detección de ácidos nucleicos con ácidos nucleicos presentes en muestras o procedentes de muestras, derivadas de sujetos (por ejemplo pacientes humanos que se sospecha que presentan una infección por *N. gonorrhoeae*, etc.). En determinadas realizaciones, las regiones diana de los ácidos nucleicos en la muestra se amplifican previa o simultáneamente a ponerse en contacto con los reactivos de detección de ácidos nucleicos. Los reactivos de detección de ácidos nucleicos se unen detectablemente a un ácido nucleico con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante. Tal como se describe en mayor detalle, posteriormente, SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2 son secuencias de consenso que corresponden a dos regiones del genoma de *N. gonorrhoeae* que son dianas en los métodos de la invención. Entre estos métodos se incluyen el seguimiento (por ejemplo en un solo punto del tiempo, en múltiples puntos discretos del tiempo, continuamente durante un periodo de tiempo seleccionado, etc.) de la unión entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones y los reactivos de detección de ácidos nucleicos con el fin de determinar si *Neisseria gonorrhoeae* se encuentra presente en las muestras, por ejemplo para diagnosticar pacientes a partir de los cuales se han derivado las muestras, para realizar un seguimiento de los cursos de tratamiento de los pacientes diagnosticados con infecciones por *Neisseria gonorrhoeae* y/o similares.

En algunas realizaciones, dichos métodos incluyen además poner en contacto los ácidos nucleicos y/o los amplicones de las regiones diana con reactivos adicionales de detección de ácidos nucleicos que se unen detectablemente a ácidos nucleicos de *Chlamydia trachomatis*. En dichas realizaciones, los métodos incluyen además el seguimiento de la unión entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones y los reactivos adicionales de detección de ácidos nucleicos, con el fin de detectar si *Chlamydia trachomatis* también se encuentra presente en la muestra. Opcionalmente, dichos métodos también se repiten una o más veces utilizando muestras adicionales (por ejemplo del mismo sujeto) para realizar un seguimiento, por ejemplo, de cursos de tratamiento para sujetos diagnosticados con infecciones por *Neisseria gonorrhoeae* y/o *Chlamydia trachomatis*, la recurrencia de infecciones y/o similares.

Entre otros métodos se incluyen poner en contacto o incubar ácidos nucleicos procedentes de muestras, con por lo menos una primera pareja de cebadores de ácidos nucleicos que incluye por lo menos un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 ó complementos de las mismas, en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Tal como se describe en mayor detalle posteriormente, SEC ID nº 3 a nº 27 son oligonucleótidos que incluye subsecuencias de SEC ID nº 1 ó de SEC ID nº 2. Además, dichos métodos incluyen además la detección de amplicones durante o después de la realización de las reacciones de amplificación para detectar si *Neisseria gonorrhoeae* se encuentra presente en las muestras. Opcionalmente, dichos métodos incluyen además la puesta en contacto de los ácidos nucleicos de las muestras con por lo menos una segunda pareja de cebadores de ácidos nucleicos que son por lo menos parcialmente complementarios respecto a un ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis* y la detección de amplicones adicionales durante o después de llevar a cabo las reacciones de amplificación para determinar si *Chlamydia trachomatis* se encuentra presente en las muestras. Dichos métodos también se repiten opcionalmente en puntos seleccionados del tiempo.

Además de las composiciones y mezclas de reacción, la invención se refiere además a kits para detectar dichos agentes patógenos.

III. REACTIVOS DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Entre los reactivos de detección de ácidos nucleicos se incluyen diversas realizaciones, incluyendo sondas de ácidos nucleicos, cebadores de ácidos nucleicos y anticuerpos específicos de secuencia. Algunos de dichos reactivos de detección de ácidos nucleicos presentan como diana la repetición 130 (también denominada en la presente memoria "NGDR9"), que es una repetición directa de 806 pares de bases en el genoma de *N. gonorrhoeae* que se cree codifica para una proteína. El genoma de *N. gonorrhoeae* incluye dos copias de NGDR9, una situada en las posiciones nucleótidas 458182-458988 y la otra situada en las posiciones nucleótidas 1586504-1587310. Una secuencia de consenso de NGDR9 corresponde a SEC ID nº 1, que se muestra en la Tabla I. Aunque únicamente se muestra una cadena del locus NGDR9 en la Tabla I, el experto en la materia apreciará que SEC ID nº 1 identifica una región de ácido nucleico genómico de doble cadena, y que las secuencias de ambas cadenas se especifican totalmente mediante la información de secuencia proporcionada.

TABLA I

SEC ID nº 1				
CAGCCGCATC	ATGATGCCGC	ACGTCAGGGC	TTCGTCTTCC	40
GATACCTTTG	CGCCAGACAA	CATCCGGGCG	ATGTTTTCTT	80
TTTGCGCTTT	TGACCGGGCG	GACAGCCGGT	TCCGGTCAAC	120
GTTTCTGACC	GTCCCGGCGC	GTTTGACGGC	GCGTTCCTGC	160
CGCGTTGATT	CCTTCGCCGC	GCGTTTGCGC	GCAAGCATCT	200
GTTTTGCCGT	CGGTTTTGTT	GCTACTGTTT	GCATTTTGTT	240
TTCTCGATTT	TTTGATGCCG	TTCTCTCAAT	GCCCAATCAT	280
AAAGCTGTAT	CTCTCACGAG	GTCGCCGAAT	TTAAATTGAT	320
AGTTCATGTC	TTGTTCCATT	AATATCAAAC	GCAATCTTCA	360
AACACCTCAA	TTACATTTTT	TAAATCGCTA	ATACCATAAT	400
TTATTACATC	CTTTAGAAAT	TCCAAAGAGG	TATCCGCTTC	440
GTCTGCTTTA	TCCCTAATTT	CGTCTATATA	ACCCTCTAAC	480
GATTCAGGCT	CITTTAATGC	TTCTTTGCAT	AAGTTATCTA	520
TTACCCTTAA	TGCGTTTTTT	ACATCTTCCA	AATAGCTCAT	540
TTTTTGCTCC	TTAACTCAAA	ATGGGATGCT	GTCGTCAACA	580
TCTTCTACGG	TTTATCTAAT	CTGCAAATTC	TTCCGCCCTT	620
CAATCTTCGC	GCCTGCTACT	TGCCGACCGC	TTTCAATCGC	680
TTTTCTGATG	GCGGTTTTGT	CCGGTTCGGT	TTTGACGGCC	720
TCACGCATAA	ATTCGGCGGG	GATTTGTGCT	TCGTCTAAGA	760
TCACGACGGC	TTCGGATTTG	CGGAACGAGG	CTTTAAAAGT	800
GCCGTC				806

A título ilustrativo, los reactivos de detección de ácidos nucleicos que comprenden SEC ID nº 3 a nº 12, nº 17 a nº 20, nº 24 a nº 26 ó complementos de las mismas, presentan como diana NGDR9 ó complementos del mismo. SEC ID nº 3 a nº 12, nº 17 a nº 20 y nº 24 a nº 26 se muestran en la Tabla II.

TABLA II

SEC ID nº 3	5'-CGTTCTCTCAATGCCCAATCA-3'
SEC ID nº 4	5'-AGGAGACGAAGCGGATACCTC-3'
SEC ID nº 5	5'-CTCTCAATGCCCAATCATAAAGC-3'
SEC ID nº 6	5'-GTATCCGCTTCGTCTGCTTTATC-3'
SEC ID nº 7	5'-GTTTGGCGGCAAGCATCT-3'
SEC ID nº 8	5'-AAATGGGATGCTGTCGTCAA-3'
SEC ID nº 9	5'-GGCAAGCTTGTTTGGCGGCAAGCATCT-3'
SEC ID nº 10	5'-GGCGGATCCTTGACGACAGCATCCCATTT-3'
SEC ID nº 11	5'-AAACGCAATCTTCAAACACCTCA-3'
SEC ID nº 12	5'-TTTGACGGCCTCACGCATAA-3'
SEC ID nº 17	5'-CGAGGTCGCCGAATTTAAATTGATAGTT-3'
SEC ID nº 18	5'-AACTATCAATTTAAATTCGGCGACCTCG-3'
SEC ID nº 19	5'-CGAGGTCGCCGAATTTAAATTGATAGTTCA-3'
SEC ID nº 20	5'-TGAACATCAATTTAAATTCGGCGACCTCG-3'
SEC ID nº 24	5'-GATAAAGCAGACGAAGCGGATAC-3'
SEC ID nº 25	5'-TTGACGACAGCATCCCATTT-3'
SEC ID nº 26	5'-TTATGCGTGAGGCCGTCAAA-3'

Otros reactivos de detección de ácidos nucleicos presentan como diana la repetición 116 (también denominada en la presente memoria "NGDR33"), que es una repetición directa de 1142 pares de bases en el genoma de *N. gonorrhoeae* que se cree codifica para un polipéptido. El genoma de *N. gonorrhoeae* incluye dos copias de NGDR33, una situada en las posiciones nucleótidas 491768-492910 y la otra situada en las posiciones nucleótidas 1606987-1608129. Una secuencia de consenso de NGDR33 corresponde a SEC ID nº 2, que se muestra en la Tabla III. Aunque se muestra únicamente una cadena del locus NGDR33 en la Tabla III, el experto en la materia apreciará que SEC ID nº 2 identifica una región de ácido nucleico genómico de doble cadena, y que las secuencias de ambas cadenas se especifican totalmente mediante la información de secuencia especificada.

TABLA III

SEC ID nº 2				
ACGCCGTGGT	GCGGCCTGTT	TGTCGGATAC	TGCCTGGGCA	40
AAAGCGGACG	CGCGGTCATC	AGGGACTGGT	ATCGCGCCAA	80
AGCCTGGTCA	ATGTCGGGTT	TGACGAAACT	CGAAGCCCCC	120
GCATACGGCT	GCATCGCGGT	CAAACCGCGC	CGGGGCGGCG	160
GACACGTGTT	CTTCGTTGTC	GGCAAAGACG	CGGAAGGCAG	200
AATCTTGGGC	TTGGGCGGCA	ATCAGGGCAA	TATGGTATCC	240
ATCATCCCGT	TTGACCCTGC	GGACATTGAC	GGCTACTTCT	280
GGCCGTCCAA	GCTGATTGGC	GGCAAAGCCG	TGCCTTCGTC	320
CCCCGCCGAA	GGGCGTTACC	GGTTGTCGGA	CGTTGCCGCC	360
ACGGCGAAAC	AGGGCGCGGG	CGAGGCGTAA	ATGATTGGGG	400
CTTTGCTGAA	AAATTGGAAG	CCGCTGCTTA	TTTTGTCCGC	440
AATCGCGTTC	TTCGCCGTTT	CTTGGCAGCT	GGACAGGGCG	480
GCGCAATACC	GTCGCGGATA	CGGTGCGGCG	GTGTCGGAGG	520
TTTCGGAACG	CCTCAAAGCC	GCCGCGGTCTG	AACACGCCGA	560
ACACGCCCGC	AAATCGTCCG	CCGCGTATCA	GGCGCAAAAG	600
GCGGCGCGCG	AGGAAAAAGA	AAGGGTGC GC	TATGTGCAAA	640
CGCTTAAAT	CATTGAAAAA	CCTGTGTACC	GCAATGCCTG	680
TTTTGATGCT	GACGGCGTGC	GCGAACTCAA	CGCCGCCGTT	720
GACGACGGCG	GTTAAGCCGC	CCGCCGATTT	GGTGCGGCC	760
TGCCCGAAAC	TGCCGACCT	TGAAGGGAAC	ACGGGCGCGG	800
ACGTGCTGCC	GTGGGCCCTG	AAGGCGGCCG	GTATGTATAA	840
CGACTGCAGG	GCGCGGCACG	GCGCGCTGGT	ACGGGCGTTG	880
GGCGCGGATT	GAGTTGTCAA	CCGGAAGTTT	GCAACCGAAC	920
CGTCGGTTCC	GGGTTGGCGG	CCGCATCGGG	GGAAGTGTCG	960
GCATCCCCC	CGATTTTTTA	CATATCGGGC	GGACGCGGCA	1000
AATTTTTGCC	GTTTTGTTTG	CGCGAAGGGG	GCGTTATACA	1040
AAATTATCAG	GCGACCAAT	AATGGGCGGA	AATGAAAATG	1080
CCGTACCGAT	CCGGACAACA	ACCGATGCCG	CACCCTGCGG	1120
GCAGGCTTCG	CACTCTGAAA	GG		1142

Por ejemplo, en la Tabla IV se muestran reactivos de detección de ácidos nucleicos correspondientes a SEC ID nº 13 a nº 16, nº 21 a nº 23, nº 27 ó complementos de las mismas, presentan como diana NGDR33 ó complementos del mismo. SEC ID nº 13 a nº 16, nº 21 a nº 23 y nº 27 se muestran en la Tabla IV.

TABLA IV

SEC ID nº 13	5'-TCAATGTCGGGTTTGACGAA-3'
SEC ID nº 14	5'-AACGTCCGACAACCGGTAAC-3'
SEC ID nº 15	5'-AATGTCGGGTTTGACGAACTC-3'
SEC ID nº 16	5'-GTTACCGGTTGTCGGACGTT -3'
SEC ID nº 21	5'-GCGGCAATCAGGGCAATATGGTAT-3'
SEC ID nº 22	5'-ATACCATATTGCCCTGATTGCCGC-3'
SEC ID nº 23	5'-GGCGGCAATCAGGGCAATATGGTAT-3'
SEC ID nº 27	5'-AACGTCCGACAACCGGTAAC-3'

En determinadas realizaciones en las que la diana es NGDR9, las sondas y/o cebadores opcionalmente se unen detectablemente a un segmento de ácidos nucleicos que comprende una o más posiciones nucleótidas de SEC ID nº 1 seleccionadas de entre el grupo que consiste de: 259, 260, 262, 264, 265, 266, 268, 269, 273, 275, 276, 277, 279, 297, 298, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 308, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 325, 326, 428, 429, 431, 432, 433, 434, 435, 440, 441 y 447. Dichas posiciones nucleótidas, que se encuentran en **negrita y subrayadas** en la Tabla V, indican determinadas no correspondencias ejemplares con la secuencia de la sección 155 del cromosoma I de *Brucella suis* 1330 (número de acceso de GenBank® AE014469) que han sido identificadas en una alineación de las secuencias de NGDR9 y de la sección 155 del cromosoma I de *B. suis* 1330. Otras no correspondencias con esta secuencia del genoma de *Brucella suis* se ilustran en la figura 4. Esta secuencia del genoma de *B. suis* presenta un nivel de identidad más alto respecto a NGDR9 que las secuencias de otras especies bacterianas. Una alineación de la secuencia de NGDR9 con la secuencia de *B. suis* se describe en mayor detalle en un ejemplo proporcionado posteriormente.

TABLA V

SEC ID nº 1				
CAGCCGCATC	ATGATGCCGC	ACGTCAGGGC	TTCGTCTTCC	40
GATACCTTTG	CGCCAGACAA	CATCCGGGCG	ATGTTTTCTT	80
TTTGCGCTTT	TGACCGGGCG	GACAGCCGGT	TCCGGTCAAC	120
GTTTCTGACC	GTCCCGGCGC	GTTTGACGGC	GCGTTCCTGC	160
CGCGTTGATT	CCTTCGCCGC	GCGTTTGCGG	GCAAGCATCT	200
GTTTTGCCGT	CGGTTTTGTT	GCTACTGTTT	GCATTTTGTT	240
TTCTCGATTT	TTTGATGCCG	TTCTCTCAAT	GCCCAATCAT	280
AAAGCTGTAT	CTCTCACGAG	GTCGCCGAAT	TTAAATTGAT	320
AGTTCATGTC	TTGTTCCATT	AATATCAAAC	GCAATCTTCA	360
AACACCTCAA	TTACATTTTT	TAAATCGCTA	ATACCATAAT	400
TTATTACATC	CTTTAGAAAT	TCCAAAGAGG	TATCCGCTTC	440
GTCTGCTTTA	TCCCTAATTT	CGTCTATATA	ACCCTCTAAC	480
GATTCAGGCT	CTTTTAATGC	TTCTTTGCAT	AAGTTATCTA	520
TTACCCTTAA	TGCGTTTTTT	ACATCTTCCA	AATAGCTCAT	540
TTTTTGCTCC	TTAACTCAA	ATGGGATGCT	GTCGTCAACA	580
TCTTCTACGG	TTTATCTAAT	CTGCAAATTC	TTCCGCCCTT	620
CAATCTTCGC	GCCTGCTACT	TGCCGACCGC	TTTCAATCGC	680
TTTTCTGATG	GCGGTTTTGT	CCGGTTCGGT	TTTGACGGCC	720
TCACGCATAA	ATTCGGCGGG	GATTTGTGCT	TCGTCTAAGA	760
TCACGACGGC	TTCGGATTG	CGGAACGAGG	CTTTAAAGT	800
GCCGTC				806

En algunas realizaciones en las que la diana es NGDR33, las sondas y/o cebadores opcionalmente se unen detectablemente a un segmento de ácidos nucleicos que comprende una o más posiciones nucleótidas de SEC ID nº 2 seleccionadas de entre el grupo que consiste de: 89, 90, 91, 92, 95, 98, 101, 105, 106, 107, 216, 217, 220, 222, 223, 225, 233, 235, 236, 238, 335, 336, 337, 338, 339, 342, 345, 346 y 351. Estas posiciones nucleótidas, que se encuentran en negrita y subrayadas en la Tabla VI, se refieren a algunas no correspondencias con la secuencia de la sección 77 de *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa MC58 (número de acceso de GenBank® AE002435) identificadas en una alineación de las secuencias de NGDR33 y la sección 77 de *N. meningitidis* serogrupo B cepa MC58. Otras no correspondencias con esta secuencia del genoma de *N. meningitidis* se ilustran en la figura 8. Esta secuencia del genoma de *N. meningitidis* presenta un nivel más alto de identidad con NGDR33 que las secuencias de otras especies bacterianas. Una alineación de la secuencia de NGDR33 con dicha secuencia de *N. meningitidis* se describe en mayor detalle en un ejemplo proporcionado posteriormente.

TABLA VI

SEC ID nº 2				
ACGCCGTGGT	GCGGCCTGTT	TGTCGGATAC	TGCCTGGGCA	40
AAAGCGGACG	CGCGGTCAATC	AGGGACTGGT	ATCGCGCCAA	80
AGCCTGGTCA	ATGTCGGGTT	TGACGAAACT	CGAAGCCCCC	120
GCATACGGGT	GCATCGCGGT	CAAACCGCGC	CGGGGCGGCG	160
GACACGTGTT	CTTCGTTGTC	GGCAAAGACG	CGGAAGCGAG	200
AATCTTGGGC	TTGGGCGGCA	ATCAGGGCAA	TATGGTATCC	240
ATCATCCCGT	TTGACCCTGC	GGACATTGAC	GGCTACTTCT	280
GGCCGTCCAA	GCTGATTGGC	GGCAAAGCCG	TGCCTTCGTC	320
CCCCGCCGAA	GGGCGTTACC	GGTTGTCGGA	CGTTGCCGCC	360
ACGGCGAAAC	AGGGCGCGGG	CGAGGCGTAA	ATGATTGGGG	400
CTTTGCTGAA	AAATTGGAAG	CCGCTGCTTA	TTTTGTCCGC	440
AATCGCGTTC	TTGCGCGTTT	CTTGGCAGCT	GGACAGGGCG	480
GCGCAATACC	GTCGCGGATA	CGGTGCGGCG	GTGTCGGAGG	520
TTTCGGAACG	CCTCAAAGCC	GCCGCGGTCTG	AACACGCCGA	560
ACACGCCCGC	AAATCGTCCG	CCGCGTATCA	GGCGCAAAAG	600
GCGGCGCGCG	AGGAAAAAGA	AAGGGTGCGC	TATGTGCAAA	640
CGCTTAAAT	CATTGAAAAA	CCTGTGTACC	GCAATGCCTG	680
TTTTGATGCT	GACGGCGTGC	GCGAACTCAA	CGCCGCCGTT	720
GACGACGGCG	GTTAAGCCGC	CCGCCGATTT	GGTGCGGCC	760
TGCCCGAAAC	TGCCGCACCT	TGAAGGGAAC	ACGGGCGCGG	800
ACGTGCTGCC	GTGGGCCCTG	AAGGCGGCCG	GTATGTATAA	840
CGACTGCAGG	GCGCGGCACG	GCGCGCTGGT	ACGGGCGTTG	880
GGCGCGGATT	GAGTTGTCAA	CCGGAAGTTT	GCAACCGAAC	920
CGTCGGTTCC	GGGTTGGCGG	CCGCATCGGG	GGAAGTGTCG	960
GCATTCCCCC	CGATTITTTA	CATATCGGGC	GGACGCGGCA	1000
AATTTTTGCC	GTTTTGTTTG	CGCGAAGGGG	GCGTTATACA	1040
AAATTATCAG	GCGCACCAAT	AATGGGCGGA	AATGAAAATG	1080
CCGTACCGAT	CCGACAACA	ACCGATGCCG	CACCCTGCGG	1120
GCAGGCTTCG	CACTCTGAAA	GG		1142

Tal como se ha indicado anteriormente, los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprenden oligonucleótidos (por ejemplo sondas de ácidos nucleicos, cebadores de ácidos nucleicos, etc.). Aunque se utilizan opcionalmente otras longitudes, los oligonucleótidos generalmente comprenden secuencias que típicamente presentan una longitud de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos, más típicamente de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 75 nucleótidos, todavía más típicamente de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 50 nucleótidos, y todavía más típicamente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos (por ejemplo de aproximadamente 20, de aproximadamente 25 ó de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud). Los métodos de preparación de oligonucleótidos, tales como la síntesis de ácidos nucleicos, se describen en mayor detalle posteriormente.

El experto en la materia podrá utilizar diversos enfoques para diseñar oligonucleótidos (por ejemplo variantes sustancialmente idénticas de ácidos nucleicos que presentan secuencias seleccionadas de entre SEC ID nº 3 y nº 27 ó complementos de las mismas) que se unen selectivamente a NGDR9 ó NGDR33, pudiendo utilizar dichos oligonucleótidos para detectar *N. gonorrhoeae*. A título ilustrativo, el paquete de software DNASTar disponible de DNASTAR, Inc. (Madison, WI) puede utilizarse para las alineaciones de secuencias. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos de NGDR9 y B. suis o de NGDR33 y *N. meningitidis* pueden cargarse en el programa EditSeq de DNASTar como archivos individuales. Pueden abrirse archivos de parejas de secuencias (por ejemplo NGDR9 y B. suis) en el programa de alineación de secuencias MegAlign de DNASTar y aplicarse el método de alineación de ClustalW. Los parámetros utilizados para las alineaciones de ClustalW opcionalmente son los ajustes por defecto en el software. MegAlign típicamente no proporciona un resumen del porcentaje de identidad entre dos secuencias. Esto generalmente se calcula manualmente. A partir de las alineaciones, las regiones que presentan, por ejemplo, una identidad inferior a 85% entre sí, típicamente son identificadas y pueden seleccionarse las secuencias oligonucleótidas en estas regiones. También se utilizan opcionalmente muchos otros algoritmos de alineación de secuencias y paquetes de software. Los algoritmos de alineación de secuencias también se describen en, por ejemplo, Mount, Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, y en Durbin et al., Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge University Press, 1998.

A título ilustrativo adicional, puede llevarse a cabo una alineación óptima de secuencias para la comparación, por ejemplo mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (Madison, WI), o incluso mediante inspección visual.

Otro algoritmo ejemplar que resulta adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en, por ejemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990. El software para llevar a cabo versiones de los análisis de BLAST se encuentra disponible públicamente en el sitio de Internet del National Center for Biotechnology Information, en ncbi.nlm.nih.gov/ desde el 12 de marzo de 2004. Este algoritmo implica identificar en primer lugar las parejas de secuencias de puntuación elevada (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de pregunta, que alcanzan o satisfacen una puntuación umbral de valor positivo T al alinearse con una palabra de la misma longitud de una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., supra). Estos aciertos de palabra vecina actúan como núcleos para iniciar búsquedas de HSP más largas que dichos núcleos. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se incrementa la puntuación acumulada de alineación. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de premio para una pareja de residuos correspondientes; en todos los casos >0) y N (puntuación de penalización para residuos no correspondientes; en todos los casos <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuaciones para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación acumulada de alineación cae en una cantidad X respecto al valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada cae hasta cero o menos debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa, o se alcanza el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros de algoritmo de BLAST, W, T y X, determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 10, un valor de corte de 100, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3 y la matriz de puntuaciones BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, que se incorpora como referencia).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo de BLAST es la probabilidad de suma mínima (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que se produciría al azar una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia (y, por lo tanto, homóloga) en el caso de que la probabilidad de

suma mínima en una comparación del ácido nucleico de ensayo y el ácido nucleico de referencia sea inferior a aproximadamente 0,1, típicamente inferior a aproximadamente 0,01, y/o incluso inferior a aproximadamente 0,001.

Un ejemplo adicional de un algoritmo de alineación de secuencias útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones por parejas progresivas. También puede dibujar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360, 1987. El método utilizado es similar al método descrito por Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989, que se incorpora como referencia. El programa puede alinear, por ejemplo, hasta 300 secuencias de una longitud máxima de 5.000 letras. El procedimiento de múltiples alineaciones se inicia con la alineación por parejas de las dos secuencias más similares, produciendo una agrupación de dos secuencias alineadas. A continuación, esta agrupación puede alinearse con la siguiente secuencia o agrupación de secuencias alineadas más relacionada. Pueden alinearse dos agrupaciones de secuencias mediante una simple extensión de la alineación por parejas de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue mediante una serie de alineaciones progresivas por parejas. El programa también puede utilizarse para dibujar un dendrograma o representación en árbol de las relaciones de agrupamiento. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos de las regiones de comparación de secuencias.

Las sondas y cebadores de la invención opcionalmente incluyen uno o más marcajes, que se indican en mayor detalle posteriormente. Además, entre las sondas y cebadores opcionalmente se incluyen otras modificaciones diversas, tales como nucleótidos modificados que alteran las temperaturas de fusión en la hibridación, conectores de sitio de restricción para facilitar la clonación de los amplicones, grupos modificadores que incrementan la especificidad de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y/o similares. Por ejemplo, determinados nucleótidos modificados que incrementan las temperaturas de fusión de la hibridación de ácidos nucleicos son incluidos opcionalmente para permitir la utilización de sondas y cebadores de menor tamaño. Entre los ejemplos de dichos oligonucleótidos modificados se incluyen aquellos que presentan uno o más monómeros LNATM. Se describen en mayor detalle análogos de nucleótidos tales como los indicados, en, por ejemplo, la patente US nº 6.639.059, titulada "Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides", concedida el 28 de octubre de 2003 a Kochkine et al., en la patente US nº 6.303.315, titulada "One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples", concedida el 16 de octubre de 2001 a Skouv, y en la solicitud publicada de patente US nº 2003/0092905, titulada "Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides", de Kochkine et al., publicada el 15 de mayo de 2003. Los oligonucleótidos que comprenden monómeros LNATM se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, Exiqon A/S (Vedbæk, Dinamarca). Se hace referencia en la presente memoria a modificaciones adicionales de sonda y de cebador, incluyendo en las definiciones proporcionadas anteriormente.

Los reactivos de detección de ácidos nucleicos utilizados tal como se indica en la presente memoria pueden ser anticuerpos específicos de secuencia con diana en SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante. SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2 se han descrito en mayor detalle anteriormente y se proporcionan en las Tablas I y II, respectivamente. Los anticuerpos adecuados para la utilización en dichas realizaciones de la invención pueden prepararse mediante metodología convencional y/o mediante ingeniería genética. Los fragmentos de anticuerpo pueden construirse genéticamente, por ejemplo a partir de las regiones variables de las cadenas ligeras y/o pesadas (V_H y V_L), incluyendo las regiones hipervariables, o de tanto las regiones V_H como las V_L . Por ejemplo, el término "anticuerpos" tal como se utiliza en la presente memoria incluye los anticuerpos policlonales y monoclonales y los fragmentos biológicamente activos de los mismos, incluyendo, entre otras posibilidades, los anticuerpos "univalentes" (Glennie et al., Nature 295:712, 1982); proteínas Fab, incluyendo los fragmentos Fab' y F(ab')₂, agregados covalente o no covalentemente; cadenas ligeras o pesadas solas, típicamente regiones variables de cadenas pesadas y ligeras (regiones V_H y V_L) y más típicamente incluyendo las regiones hipervariables (también conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones V_H y V_L); proteínas Fc; anticuerpos "híbridos" capaces de unirse a más de un antígeno; quimeras de región constante-región variable; inmunoglobulinas "compuestas" con cadenas pesadas y ligeras de diferentes orígenes; anticuerpos "alterados" de especificidad mejorada y otras características tal como se preparan mediante técnicas recombinantes estándares, mediante técnicas mutagénicas u otras técnicas evolutivas dirigidas que se conocen de la técnica.

Los anticuerpos específicos de secuencia utilizados tal como se indica en la presente memoria pueden encontrarse marcados o no marcados. Entre los marcajes adecuados se incluyen, por ejemplo, radionucleidos, enzimas, coenzimas, pigmentos fluorescentes, pigmentos quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, radicales libres y similares. Dichos reactivos marcados pueden utilizarse en una diversidad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 3.766.162, nº 3.791.932, nº 3.817.837 y nº 4.233.402. Se describen en mayor detalle marcajes adicionales en la presente memoria.

En algunas realizaciones, son dianas de detección ARN transcritos y/o proteínas traducidas codificados por NGDR9 y NGDR33. Son conocidas de la técnica muchas técnicas para detectar ARN y/o proteínas. Por ejemplo, pueden adaptarse sondas y cebadores de ácidos nucleicos de la invención para la utilización en ensayos de transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la detección de productos de transcripción de NGDR9 ó NGDR33. Además, pueden utilizarse para detectar proteínas codificadas por NGDR9 ó NGDR33 diversos ensayos electroforéticos (por ejemplo SDS-PAGE o similares), inmunoensayos, ensayos de espectrometría de masas (por ejemplo análisis basados en la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), ensayos basados en la desorción/ionización láser incrementada en superficie (SELDI), etc.) y/o otros enfoques. Muchos de dichos métodos y otros métodos de detección de ARN y proteínas adecuados se describen en las referencias citadas en la presente memoria.

En la práctica de la presente invención, se utilizan opcionalmente muchas técnicas convencionales de la biología molecular y de ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I, II y III, 1997 (editor: F.M. Ausubel); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger), DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II, 1985 (editor: D.N. Glover); Oligonucleotide Synthesis, 1984 (editor: M.L. Gait); Nucleic Acid Hybridization, 1985 (Hames y Higgins); Transcription and Translation, 1984 (editores: Hames y Higgins); Animal Cell Culture, 1986 (editor: Freshney); Immobilized Cells and Enzymes, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (editores: J.H. Miller y M.P. Calos, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods in Enzymology, volúmenes 154 y 155 (editores Wu y Grossman, y Wu, respectivamente).

IV. VARIACIONES DE SECUENCIA

A título ilustrativo, la figura 1 muestra una alineación de la secuencia repetición directa 9 de *Neisseria gonorrhoeae* (NGDR9) con las secuencias de por lo menos porciones de amplicones de ADN genómico de diversas cepas de *N. gonorrhoeae*. Más concretamente, se amplificó y secuenció ADN genómico de 5 cepas de *N. gonorrhoeae* (es decir, las cepas de NG 117, 1120, 6346, 6359 y 6364) con cebadores de ácidos nucleicos correspondientes a DK101 (SEC ID nº 7) y DK102R (SEC ID nº 25). La localización de los oligonucleótidos DK101 y el complemento de DK102R (es decir, DK102 (SEC ID nº 8)) y los oligonucleótidos NG519 (SEC ID nº 5) y NG514 (SEC ID nº 6) se encuentran subrayados en la secuencia de NGDR9 mostrada en la figura 1. Además, también se indican la secuencia mayoritaria o de consenso de la secuencia de DR9 y las cinco cepas de *N. gonorrhoeae*.

A título ilustrativo adicional, determinadas variaciones ejemplares de secuencia de ácidos nucleicos relacionadas con NGDR9 se encuentran asociadas a los números de identificador génico NG0465, NG0466, NG0467, IGR0389, IGR0390, NG1616, NG1617, NG1618, IGR1318 e IGR1319, y determinadas variaciones ejemplares de secuencias de ácidos nucleicos relacionadas con NGDR33 se encuentran asociadas a los números de identificador génico NG0518, NG0519, NG0520, IGR0430, IGR0431, NG1649, NG1650, IGR1345 e IGR1346, la totalidad de los cuales se proporcionan en Internet, en stdgen.lanl.gov desde el 12 de marzo de 2004.

VARIACIONES SILENCIOSAS

El experto en la materia apreciará que debido a la degeneración del código genético, puede producirse una multitud de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos NGDR9 y NGDR33, algunos de los cuales puede presentar una homología de secuencia mínima respecto a las secuencias de ácidos nucleicos dadas a conocer explícitamente en la presente memoria. Los polipéptidos NGDR9 ejemplares se encuentran asociados a los números de identificación génica NG0465, NG0466, NG0467, NG1616, NG1617 y NG1618, y los polipéptidos NGDR33 ejemplares se encuentran asociados a los números de identificación génica NG0518, NG0519, NG0520, NG1649 y NG1650, la totalidad de los cuales se proporciona en Internet, en stdgen.lanl.gov desde el 12 de marzo de 2004.

TABLA VII

			Tabla de codones			
Aminoácidos			Codón			
Alanina	Ala	A	GCA GCC	GCG	GCU	
Cisteína	Cys	C	UGC UGU			
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU			
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG			
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU			
Glicina	Gly	G	GGA GGC	GGG	GGU	
Histidina	His	H	CAC CAU			
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC	AUU		
Lisina	Lys	K	AAA AAG			
Leucina	Leu	L	UUA UUG	CUA	CUC	CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG			
Asparagina	Asn	N	AAC AAU			
Prolina	Pro	P	CCA CCC	CCG	CCU	
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG			
Arginina	Arg	R	AGA AGG	CGA	CGC	CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU	UCA	UCC	UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC	ACG	ACU	
Valina	Val	V	GUA GUC	GUG	GUU	
Triptófano	Trp	W	UGG			
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU			

Por ejemplo, la inspección de la tabla de codones (Tabla VII) muestra que los codones AGA, AGG, CGA, CGC, CGG y CGU codifican todos ellos el aminoácido arginina. De esta manera, en cada posición de los ácidos nucleicos en la que se encuentre especificado una arginina por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes indicado anteriormente sin alterar el polipéptido codificado. Se entiende que U en una secuencia de ARN corresponde a T en una secuencia de ADN.

Dichas "variaciones silenciosas" son una especie de "variaciones modificadas conservadoramente", comentadas posteriormente. El experto en la materia apreciará que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que habitualmente es el único codón para la metionina) puede modificarse mediante técnicas estándares para codificar un polipéptido funcionalmente idéntico. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido se encuentra implícita en cualquier secuencia indicada. Dichas combinaciones se llevan a cabo según el código genético estándar de tripletes (por ejemplo tal como se indica en la Tabla 1) aplicado a las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos NGDR9 y NGDR33. La totalidad de dichas variaciones de cada ácido nucleico en la presente memoria se proporciona e indica específicamente mediante consideración de la secuencia en combinación con el código genético.

VARIACIONES CONSERVADORAS

La expresión "variaciones modificadas conservadoramente" o, simplemente, "variaciones conservadoras" de una secuencia particular de ácidos nucleicos se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que son idénticas o esencialmente idénticas o, en el caso de ácidos nucleicos que no codifican una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. El experto en la materia apreciará que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteren, añadan o delecten un solo aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos (típicamente menos de 5%, más típicamente menos de 4%, 2% ó 1%) de una secuencia codificada son "variaciones modificadas conservadoramente" en las que las alteraciones resultan en la deleción de un aminoácido, en la adición de un aminoácido o en la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar.

Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas de la técnica. La Tabla VIII proporciona seis grupos, los cuales contienen aminoácidos que son "sustituciones conservadoras" mutuas.

TABLA VIII

Grupos de sustitución conservadora			
1	Alanina (A)	Serina (S)	Treonina (T)
2	Ácido aspártico (D)	Ácido glutámico (E)	
3	Asparagina (N)	Glutamina (Q)	
4	Arginina (R)	Lisina (K)	
5	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M) Valina (V)
6	Fenilalanina (F)	Tirosina (Y)	Triptófano (W)

De esta manera, entre las "variaciones sustituidas conservadoramente" de un polipéptido NGDR9 ó NGDR33 a las que se hace referencia en la presente memoria se incluyen las sustituciones de un porcentaje pequeño, típicamente inferior a 5%, más típicamente inferior a 2% ó 1%, de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, por un aminoácido seleccionado conservadoramente del mismo grupo de sustitución conservadora.

La adición de secuencias que no alteran la actividad codificada de una molécula de ácidos nucleicos, tal como la adición de una secuencia no funcional, es una variación conservadora del ácido nucleico básico.

El experto en la materia apreciará que muchas variaciones conservadoras de los ácidos nucleicos indicados en la presente memoria rinden un ácido nucleico funcionalmente idéntico. Por ejemplo, tal como se ha comentado anteriormente, debido a la degeneración del código genético, las "sustituciones silenciosas" (es decir, las sustituciones en una secuencia de ácidos nucleicos que no resultan en una alteración de un polipéptido codificado) son una característica implícita de toda secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un aminoácido. De manera similar, las "sustituciones conservadoras de aminoácidos", un aminoácido o unos cuantos aminoácidos de una secuencia de aminoácidos son sustituidos por aminoácidos diferentes que presentan propiedades altamente similares, también se identifican fácilmente como altamente similares a un constructo dado a conocer.

V. SÍNTESIS DE SONDA Y CEBADOR

Las sondas y cebadores oligonucleótidos de la invención se preparan opcionalmente utilizando esencialmente cualquier técnica conocida. En determinadas realizaciones, por ejemplo, las sondas y cebadores oligonucleótidos indicados en la presente memoria se sintetizan químicamente utilizando esencialmente cualquier método de síntesis de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, el método de triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862, 1981, u otra técnica de síntesis conocida de la técnica, por ejemplo utilizando un sintetizador automático, tal como se indica en Needham-VanDevanter et al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168, 1984. Se encuentran disponible comercialmente una amplia diversidad de equipos para la síntesis automática de oligonucleótidos. También se utilizan opcionalmente enfoques de síntesis multinucleótido (por ejemplo la síntesis trinucleótido, etc.). Además, entre los cebadores de ácidos nucleicos indicados en la presente memoria opcionalmente se incluyen diversas modificaciones. En determinadas realizaciones, por ejemplo, entre los cebadores se incluyen conectores de sitio de restricción, por ejemplo para facilitar la posterior clonación de amplicones o similares. A título ilustrativo adicional, también se modifican opcionalmente cebadores para mejorar la especificidad de las reacciones de amplificación, tal como se indica en, por ejemplo, la patente US nº 6.001.611, titulada "Modified nucleic acid amplification primers", concedida el 14 de diciembre de 1999 a Will. Los cebadores y sondas también pueden sintetizarse con otras modificaciones diversas, tal como se indica en la presente memoria, o de otro modo tal como es conocido de la técnica.

Se utiliza opcionalmente esencialmente cualquier marcaje para marcar los reactivos de detección de ácidos nucleicos de la invención. En algunas realizaciones, por ejemplo, el marcaje comprende un pigmento fluorescente (por ejemplo un pigmento rodamina (por ejemplo R6G, R110, TAMRA, ROX, etc.), un pigmento fluoresceína (por ejemplo JOE, VIC, TET, HEX, FAM, etc.), un pigmento halofluoresceína, un pigmento cianina (por ejemplo CY3, CY3.5, CY5, CY5.5, etc.), un pigmento BODIPY® (por ejemplo FL, 530/550, TR, TMR, etc.), un pigmento ALEXA FLUOR® (por ejemplo 488, 532, 546, 568, 594, 555, 653, 647, 660, 680, etc.), un pigmento diclororodamina, un pigmento de transferencia de energía (por ejemplo los pigmentos BIGDYE™ v1, los pigmentos BIGDYE™ 2, los pigmentos BIGDYE™ v3, etc.), pigmentos Lucifer (por ejemplo amarillo Lucifer, etc.), CASCADE BLUE®, verde Oregon, y similares. Se proporcionan ejemplos adicionales de pigmentos fluorescentes en, por ejemplo, Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, novena edición (2003) y actualizaciones del mismo. Los pigmentos fluorescentes generalmente se encuentran fácilmente disponibles de diversos proveedores comerciales, incluyendo, por ejemplo, Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ), Applied Biosystems (Foster City, CA), etc. Entre otros marcajes se incluyen, por ejemplo, biotina, marcajes débilmente fluorescentes (Yin et al., Appl Environ Microbiol. 69(7):3938, 2003; Babendure et al., Anal. Biochem. 317(1): 1, 2003; y Jankowiak et al., Chem Res Toxicol. 16(3):304, 2003), marcajes no fluorescentes, marcajes colorimétricos, marcajes quimioluminiscentes (Wilson et al., Analyst 128(5):480, 2003; y Roda et al., Luminiscence 18(2):72, 2003), marcajes Raman, marcajes electroquímicos, marcajes bioluminiscentes (Kitayama et al., Photochem Photobiol. 77(3):333, 2003; Arakawa et al., Anal. Biochem. 314(2):206, 2003, y Maeda, J. Pharm. Biomed. Anal. 30(6):1725, 2003), y un reactivo de marcaje α -metil-PEG tal como se indica en, por ejemplo, la solicitud de patente US nº 2004/0171040. El marcaje de ácidos nucleicos también se describe en mayor detalle posteriormente.

Además, puede obtenerse esencialmente cualquier ácido nucleico (y virtualmente cualquier ácido nucleico marcado, estándar o no estándar) mediante pedido estándar o específico, de cualquiera de entre una diversidad de proveedores comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company, The Great American Gene Company, ExpressGen Inc., Operon Technologies Inc. y muchos otros.

VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las muestras generalmente se derivan o se aíslan de sujetos, típicamente de sujetos mamíferos, más típicamente de sujetos humanos, que se sospecha que presentan infecciones por *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*. Entre las

muestras ejemplares o especímenes se incluyen sangre, plasma, suero, orina, líquido sinovial, líquido seminal, plasma seminal, líquido prostático, líquido vaginal, líquido cervical, líquido uterino, raspados cervicales, líquido amniótico, raspados anales, moco, esputo, tejido y similares. Opcionalmente se utiliza esencialmente cualquier técnica para obtener dichas muestras, incluyendo, por ejemplo, el raspado, la venipunción, frotis, biopsia u otras técnicas conocidas. A título ilustrativo adicional, se obtienen muestras faríngeas de sujetos en determinadas realizaciones, por ejemplo como parte de cribados para faringitis gonocócica o similar.

Los métodos de almacenamiento de especímenes, de cultivo de células, de aislamiento y preparación de ácidos nucleicos a partir de dichas fuentes son generalmente conocidos de la técnica y muchos de ellos se describen en mayor detalle en las referencias y/o ejemplos proporcionados en la presente memoria.

A título ilustrativo adicional, antes del análisis de los ácidos nucleicos diana indicados en la presente memoria, los ácidos nucleicos pueden purificarse o aislarse a partir de muestras que típicamente incluyen mezclas complejas de diferentes componentes. Las células en las muestras recogidas típicamente se lisan para liberar el contenido celular. Por ejemplo, *N. gonorrhoeae* y otras células en la muestra particular pueden lisarse poniéndolas en contacto con diversos enzimas, compuestos químicos y/o lisarse mediante otros enfoques conocidos de la técnica, que degradan, por ejemplo, las paredes celulares bacterianas. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se analizan directamente en el lisado celular. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se purifican o extraen adicionalmente a partir de lisados celulares previamente a la detección. Puede utilizarse esencialmente cualesquiera métodos de extracción de ácidos nucleicos para purificar los ácidos nucleicos en las muestras utilizadas en los métodos de la presente invención. Entre las técnicas ejemplares que pueden utilizarse para purificar ácidos nucleicos se incluyen, por ejemplo, la cromatografía de afinidad, la hibridación con sondas inmovilizadas sobre soporte sólidos, la extracción líquido-líquido (por ejemplo la extracción en fenol-cloroformo, etc.), la precipitación (por ejemplo utilizando etanol, etc.), la extracción con papel de filtro, la extracción con reactivos formadores de micelas (por ejemplo cetiltrimetil-amonio-bromuro, etc.), la unión a pigmentos intercalantes inmovilizados (por ejemplo bromuro de etidio, acridina, etc.), la adsorción a gel de sílice o tierras diatomáceas, la adsorción a partículas de vidrio magnético o partículas de organosilano bajo condiciones caotrópicas, y/o similares. El procesamiento de muestras se describe también en, por ejemplo, las patentes US nº 5.155.018, nº 6.383.393 y nº 5.234.809.

A título de ejemplo adicional, los ácidos nucleicos no modificados pueden unirse a un material con una superficie de sílice. Muchos de dichos procedimientos que se adaptan opcionalmente para la utilización en la puesta en práctica de los métodos de la presente invención se encuentran descritos en la técnica. A título ilustrativo, Vogelstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:615-619, 1979, describe la purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa en presencia de yoduro sódico utilizando vidrio flint molido. Marko et al., *Anal. Biochem.* 121:383-387, 1982, describe la purificación de ácidos nucleicos a partir de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato sódico. En la patente DE nº A 3734442, los ácidos nucleicos se aíslan sobre filtros de fibra de vidrio. Los ácidos nucleicos unidos a dichos filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón Tris/EDTA que contiene metanol. Se describe un procedimiento similar en Jakobi et al., *Anal. Biochem.* 175:196-201, 1988. En particular, Jakobi et al. describen la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones salinas caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de los contaminantes, tales como agarosa, proteínas y residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o aspirarse líquidos a través de filtros de fibra de vidrio. Además, la utilización de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos tras la precipitación mediante adición de sal y etanol se describe en, por ejemplo, Alderton et al., *Anal. Biochem.* 201:166-169, 1992 y en el documento WO nº 91/012079. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan conjuntamente con las partículas magnéticas. Se separa el aglutinado del solvente original mediante la aplicación de un campo magnético y realizando una o más etapas de lavado. Tras por lo menos una etapa de lavado, los ácidos nucleicos típicamente se disuelven en un tampón Tris.

En determinadas realizaciones de la invención también pueden utilizarse partículas magnéticas en una matriz porosa de vidrio que se ha recubierto con una capa que incluye, por ejemplo, estreptavidina. Estas partículas pueden utilizarse, por ejemplo, para aislar ácidos nucleicos y proteínas conjugados con biotina. También se utilizan opcionalmente partículas ferrimagnéticas, ferromagnéticas y superparamagnéticas. También se describe en, por ejemplo, el documento WO nº 01/37291, partículas de vidrio magnético y métodos relacionados que pueden adaptarse para la utilización en la puesta en práctica de los métodos.

Una de las tecnologías más potentes y básicas para derivar y detectar ácidos nucleicos es la amplificación de ácidos nucleicos. En la presente invención, la amplificación de los ácidos nucleicos de interés típicamente precede o es concurrente a la detección de dicho ADN. Además, las sondas oligonucleótidas descritas en la presente memoria también se amplifican opcionalmente, por ejemplo tras la síntesis química o similar. En algunas realizaciones, se amplifican señales detectables, por ejemplo utilizando ácidos nucleicos ramificados u otros formatos de amplificación de señales conocidos de la técnica.

Entre los métodos de amplificación que opcionalmente se utilizan o adaptan para la utilización con los oligonucleótidos y métodos descritos en la presente memoria se incluyen, por ejemplo, diversos métodos de amplificación mediados por polimerasa o ligasa, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación

basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), la amplificación por círculo rodante (RCA) y/o similares. Los detalles relativos a la utilización de dichos métodos y otros métodos de amplificación pueden encontrarse en diversas partículas y/o en cualquiera de entre una diversidad de textos estándares, incluyendo, por ejemplo, Berger, Sambrook, Ausubel, y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., editores), Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990) (Innis), Schweitzer et al., "Combining nucleic acid amplification and detection", Curr Opin Biotechnol. 12(1):21-27, 2001. Muchos textos biológicos disponibles también disponen de comentarios extensos respecto a la PCR y métodos de amplificación relacionados. La amplificación de ácidos nucleicos también se describe en, por ejemplo, Mullis et al., patente US nº 4.683.202, 1987, y en Sooknanan y Malek, Biotechnology 13:563, 1995. Se describen métodos mejorados de amplificación de ácidos nucleicos de gran tamaño mediante PCR en Cheng et al., Nature 369:684, 1994. En determinadas realizaciones, se utiliza la PCR dúplex para amplificar los ácidos nucleicos diana. La amplificación por PCR dúplex se describe en mayor detalle en, por ejemplo, Gabriel et al., "Identification of human remains by immobilized sequence-specific oligonucleotide probe analysis of mtDNA hypervariable regions I and II", Croat. Med. J. 44(3)293, 2003, y en La et al., "Development of a duplex PCR assay for detection of Brachyspira hyodysenteriae and Brachyspira pilosicoli in pig feces", J. Clin. Microbiol. 41(7):3372, 2003. Opcionalmente, se utilizan cebadores marcados (por ejemplo cebadores biotinilados, cebadores Scorpion, etc.) para amplificar ácidos nucleicos en una muestra, por ejemplo para facilitar la detección de amplicones y similares. Los cebadores Scorpion también se describen en, por ejemplo, Whitcombe et al., "Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence", Nat Biotechnol. 17(8):804-807, 1999. El marcaje se describe en mayor detalle en la presente memoria.

Los amplicones son opcionalmente recuperados y purificados de otros componentes de reacción mediante cualquiera de entre varios métodos bien conocidos de la técnica, incluyendo la electroforesis, la cromatografía, la precipitación, la diálisis, la filtración y/o la centrifugación. Se describen aspectos de la purificación de los ácidos nucleicos en, por ejemplo, Douglas et al., DNA Chromatography, Wiley, John & Sons, Inc., 2002, y en Schott, Affinity Chromatography Template Chromatography of Nucleic Acids and Proteins, Chromatographic Science Series nº 27, Marcel Dekker, 1984. En determinadas realizaciones, los amplicones no son purificados previamente a la detección. La detección de los amplicones se describe en mayor detalle posteriormente.

VII. MATRICES DE SONDAS

En determinadas realizaciones de la invención, las sondas oligonucleótidas descritas en la presente memoria se unen covalente o no covalentemente a soportes sólidos que seguidamente se ponen en contacto con muestras que comprenden ácidos nucleicos amplificados y marcados procedentes de un sujeto. En otras realizaciones, las sondas de la invención se proporcionan libres en solución. Esencialmente cualquier material de sustrato se adapta opcionalmente para la utilización en dichos aspectos de la invención. En determinadas realizaciones, por ejemplo, se fabrican sustratos a partir de silicio, vidrio o materiales poliméricos (por ejemplo portaobjetos de microscopía de vidrio o poliméricos, obleas de silicio, etc.). Los sustratos de vidrio o poliméricos adecuados, incluyendo los portaobjetos de microscopía, se encuentran disponibles de diversos proveedores comerciales, tales como Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) o similar. En algunas realizaciones, los soportes sólidos utilizados en la invención son membranas. Los materiales de membrana adecuados se seleccionan opcionalmente de entre, por ejemplo, membranas de poliaramida, membranas de policarbonato, membranas de matriz plástica porosa (por ejemplo plástico poroso POREX®, etc.), membranas de matriz metálica porosa, membranas de polietileno, membranas de poli(difluoruro de vinilideno), membranas de poliamida, membranas de nilón, membranas cerámicas, membranas de poliéster, membranas de politetrafluoroetileno (TEFLON®), membranas de malla tejida, membranas de microfiltración, membranas de nanofiltración, membranas de ultrafiltración, membranas de diálisis, membranas de composite, membranas hidrofílicas, membranas hidrofóbicas, membranas basadas en polímeros, membranas basadas en no polímeros, membranas de carbono activado en polvo, membranas de polipropileno, membranas de fibra de vidrio, membranas de vidrio, membranas de nitrocelulosa, membranas de celulosa, membranas de nitrato de celulosa, membranas de acetato de celulosa, membranas de polisulfona, membranas de polietersulfona, membranas de poliolefina o similares. Muchos de dichos materiales membranosos se encuentran ampliamente disponibles de diversos proveedores comerciales, tales como, P.J. Cobert Associates, Inc. (St. Louis, MO), Millipore Corporation (Bedford, MA), o similares. Entre otros soportes sólidos ejemplares que se utilizan opcionalmente se incluyen, por ejemplo, cerámicas, metales, resinas, geles, placas, perlas, microperlas (por ejemplo microperlas magnéticas, etc., tubos (por ejemplo microtubos, etc.), cerdas, fibras, peines, monocristales y monocapas autoensamblantes.

Las sondas oligonucleótidas de la invención se unen directa o indirectamente (por ejemplo mediante conectores, tales como albúmina de suero bovino (ASB) o similar) a los soportes, por ejemplo mediante cualquier método químico o físico disponible. Se encuentra disponible una amplia diversidad de reacciones de unión para enlazar moléculas a una amplia diversidad de soportes sólidos. Más concretamente, los ácidos nucleicos pueden unirse al soporte sólido mediante unión covalente, tal como mediante conjugación con un agente de acoplamiento o mediante unión no covalente, tal como interacción electrostática, enlace de hidrógeno o acoplamiento de anticuerpo-antígeno, o mediante combinaciones de los mismos. Entre los agentes de acoplamiento típicos se incluyen biotina/avidina, biotina/estreptavidina, proteína A de Staphylococcus aureus/fragmento Fc de anticuerpo IgG y quimeras de estreptavidina/proteína A ((Sano et al., Bio/Technology 9:1378, 1991), que se incorpora como referencia), o derivados o combinaciones de dichos agentes. Los ácidos nucleicos pueden unirse al soporte sólido mediante un enlace fotocortable, un enlace electrostático, un enlace disulfuro, un enlace peptídico, un enlace diéster o una

combinación de dichos enlaces. Los ácidos nucleicos además se unen opcionalmente a soportes sólidos mediante un enlace selectivamente liberable, tal como 4,4'-dimetoxitritilo o un derivado del mismo. Entre los derivados que se ha encontrado que resultan útiles se incluyen el ácido 3 ó 4-[bis-(4-metoxifenil)]-metilbenzoico, el ácido N-succinimidil-3 ó 4-[bis-(4-metoxifenil)]-metilbenzoico, el ácido N-succinimidil-3 ó 4-[bis-(4-metoxifenil)]-hidroximetilbenzoico, el ácido N-succinimidil-3 ó 4-[bis-(4-metoxifenil)]-clorometilbenzoico y sales de dichos ácidos.

Tal como se ha indicado anteriormente, las sondas oligonucleótidos se unen opcionalmente a soportes sólidos mediante conectores entre los ácidos nucleicos y el soporte sólido. Entre los conectores útiles se incluyen un agente de acoplamiento, tal como se ha indicado anteriormente para la unión de parejas de acoplamiento alternativas o adicionales, o para convertir la unión al soporte sólido en cortable.

Las uniones cortables pueden crearse mediante la unión de fracciones químicas cortables entre las sondas y el soporte sólido, incluyendo, por ejemplo, un oligopéptido, oligonucleótido, oligopoliamida, oligoacrilamida, oligoetileno, glicerol, cadenas alquilo de entre aproximadamente 6 y 20 átomos de carbono, y combinaciones de los mismos. Estas fracciones pueden cortarse con, por ejemplo, agentes químicos añadidos, radiación electromagnética o enzimas. Entre las uniones ejemplares cortables con enzimas se incluyen enlaces peptídicos que pueden ser cortados por proteasas y enlaces fosfodiéster que pueden ser cortados por nucleasas.

Algunos agentes químicos, tales como el β -mercaptoetanol, el ditioneitol (DTT) y otros agentes reductores cortan los enlaces disulfuro. Entre otros agentes que pueden resultar útiles se incluyen agentes oxidantes, agentes hidratantes y otros compuestos selectivamente activos. La radiación electromagnética, tal como la luz ultravioleta, infrarroja y visible, corta los enlaces fotocortables. Las uniones también pueden ser reversibles, por ejemplo utilizando calor o tratamiento enzimático, o uniones químicas o magnéticas reversibles. La liberación y nueva unión pueden llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, campos magnéticos o eléctricos.

La hibridación basada en matrices resulta particularmente adecuada para detectar los ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*, ya que puede utilizarse para detectar la presencia de muchos amplicones simultáneamente. Se han descrito varios sistemas de matrices y pueden adaptarse para la utilización con la presente invención, incluyendo las disponibles de proveedores comerciales, tales como Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA, USA) y similares. También se describen aspectos de la construcción y utilización de matrices en, por ejemplo, Sapolsky et al., "High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays", *Genome Analysis: Biomolecular Engineering* 14:187-192, 1999; Lockhart, "Mutant yeast on drugs", *Nature Medicine* 4:1235-1236, 1998; Fodor, "Genes, Chips and the Human Genome", *FASEB Journal* 11:A879, 1997; Fodor, "Massively Parallel Genomics", *Science* 277: 393-395, 1997; y Chee et al., "Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays", *Science* 274:610-614, 1996.

Otras sondas y cebadores para detectar los ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*, que se utilizan opcionalmente además de las sondas y cebador indicados anteriormente para poner en práctica los métodos y otros aspectos de la invención, se describen en, por ejemplo, la patente US nº 5.550.040 de Purohit et al., y en la patente US nº 6.090.557 de Weiss.

VIII. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La hibridación de sondas oligonucleótidas a sus ácidos nucleicos diana de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* puede llevarse a cabo mediante la selección de las condiciones de hibridación apropiadas. La estabilidad del híbrido de sonda:ácido nucleico diana típicamente se selecciona para que resulte compatible con el ensayo y las condiciones de lavado, de manera que se formen híbridos detectables estables únicamente entre las sondas y los ácidos nucleicos diana de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*. La manipulación de uno o más de los diferentes parámetros de ensayo determina la sensibilidad y especificidad exactas de un ensayo de hibridación particular.

Más concretamente, la hibridación entre bases complementarias de ADN, ARN, APN o combinaciones de ADN, ARN y APN, se produce bajo una amplia diversidad de condiciones que varían en temperatura, concentración salina, fuerza electrostática, composición del tampón y similares. Los ejemplos de dichas condiciones y métodos para aplicarlas se describen en, por ejemplo, Tijssen, supra, 1996, y en Hames y Higgins, supra. La hibridación generalmente tiene lugar entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 70°C, durante periodos de entre aproximadamente un minuto y aproximadamente una hora, dependiendo de la naturaleza de la secuencia que debe hibridarse y de su longitud. Sin embargo, se reconoce que las hibridaciones pueden producirse en segundos o en horas, dependiendo de las condiciones de la reacción. A título ilustrativo, las condiciones típicas de hibridación para una mezcla de dos 20-meros es llevar la mezcla a 68°C, seguido del enfriamiento hasta la temperatura ambiente (22°C) durante cinco minutos o a temperaturas muy bajas, tales como 2°C en 2 microlitros. La hibridación entre ácidos nucleicos puede facilitarse utilizando tampones tales como Tris-EDTA (TE), Tris-HCl y HEPES, soluciones salinas (por ejemplo NaCl, KCl, CaCl₂) u otras soluciones acuosas, reactivos y compuestos químicos. Entre los ejemplos de dichos reactivos se incluyen proteínas de unión de cadena sencilla, tales como proteína Rec A, proteína del gen 32 de T4, proteína de unión de cadena sencilla de *E. coli* y proteínas de unión del surco mayor o menor de ácidos nucleicos. Entre otros ejemplos de dichos reactivos y compuestos químicos se incluyen iones divalentes, iones polivalentes y sustancias intercalantes, tales como bromuro de etidio, actinomicina D, psoralén y angelicina.

Un procedimiento de hibridación ejemplar que se utiliza en la presente invención sigue condiciones similares a las especificadas en el protocolo de ensayo COBAS AMPLICOR® Chlamydia trachomatis (CT)/Neisseria gonorrhoeae (NG) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN).

5 IX. DETECCIÓN Y VARIACIONES DE LA SONDA

Tal como se ha indicado anteriormente, los ácidos nucleicos diana amplificados de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* en las muestras utilizadas en los métodos de la invención se marcan opcionalmente para permitir la detección de dúplex de hibridación de sonda oligonucleótida-diana. En general, un marcaje puede ser cualquier fracción que pueda unirse, por ejemplo a un cebador utilizado para la amplificación y que proporcione una señal detectable (por ejemplo una señal cuantificable). Los marcajes pueden unirse a un cebador directa o indirectamente mediante una diversidad de técnicas conocidas de la técnica. Dependiendo del tipo de marcaje utilizado, el marcaje puede unirse a un nucleótido terminal (extremo 5' ó 3' del cebador) o a un nucleótido no terminal, y puede unirse indirectamente mediante conectores o brazos espaciadores de diversos tamaños y composiciones. Mediante la utilización de reactivos fosforamídita disponibles comercialmente pueden producirse oligómeros que contienen grupos funcionales (por ejemplo tioles o aminas primarias) en el extremo 5' ó 3' mediante una fosforamídita apropiadamente protegida y pueden marcarse dichos oligonucleótidos utilizando protocolos descritos en, por ejemplo PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., editores Academic Press, Inc., 1990). En una realización, el marcaje consiste de una molécula de biotina unida covalentemente al cebador en el extremo 5'. La expresión "cebador biotinilado" se refiere a un cebador con una o más moléculas de biotina unido directamente al cebador o indirectamente mediante moléculas conectoras intermedias.

A título ilustrativo adicional, la detección de los dúplex de hibridación de sonda oligonucleótida-diana opcionalmente se lleva a cabo mediante un ensayo de quimioluminiscencia utilizando un reactivo basado en luminol tal como se describe en, por ejemplo, Whitehead et al., Nature 30(5):158, 1983, que se encuentra disponible comercialmente. Tras la hibridación de la sonda con el ADN diana marcado, la molécula de biotina unida al ADN diana se conjuga, por ejemplo, con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP). Alternativamente, el ADN diana puede marcarse con peroxidasa de rábano picante directamente, eliminando de esta manera la etapa independiente de conjugación. En cualquier caso, la posterior oxidación del luminol por el enzima peroxidasa de rábano picante resulta en la emisión de fotones, que seguidamente es detectada, por ejemplo en película autorradiográfica estándar. La intensidad de la señal es una función de la cantidad de ADN. Típicamente se somete a ensayo una serie de estándares de ADN que contienen cantidades conocidas de ADN, conjuntamente con una o más muestras desconocidas. Las intensidades de señal de los estándares conocidos de ADN permiten una determinación empírica de la relación funcional entre la intensidad de la señal y la cantidad de ADN, lo que permite la cuantificación de las muestras desconocidas. También se utilizan opcionalmente muchos otros métodos de detección para poner en práctica los métodos de la invención y se hace referencia a ellos en las referencias citadas en la presente memoria y/o son generalmente conocidos de la técnica.

Puede utilizarse cualquier método disponible para detectar los amplicones de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*. Entre los enfoques comunes se incluyen la detección de la amplificación en tiempo real con balizas moleculares o sondas 5'-nucleasa, la detección de pigmentos intercalantes, la detección de marcajes incorporados en sondas de amplificación o en los ácidos nucleicos amplificados mismos, por ejemplo tras la separación electroforética de los productos de amplificación respecto del marcaje no incorporado), los ensayos basados en la hibridación (por ejemplo ensayos basados en matrices) y/o la detección de reactivos secundarios que se unen a los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se detecta NG y/o CT utilizando los oligonucleótidos indicados en la presente memoria en un formato de ensayo AMPLICOR® en determinadas realizaciones de la invención.

A título ilustrativo adicional, se diseña opcionalmente una baliza molecular o una sonda 5'-nucleasa para incluir una sonda oligonucleótida de la invención (es decir, se selecciona de entre SEC ID nº 3 y nº 27 ó complementos de las mismas), pudiendo utilizar dicha baliza molecular o sonda 5'-nucleasa para detectar los amplicones de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*. Las balizas moleculares o sondas 5'-nucleasa se describen en mayor detalle posteriormente. Puede encontrarse más información sobre estos enfoques generales en las referencias citadas en la presente memoria, por ejemplo en Sambrook y Ausubel. Pueden encontrarse estrategias adicionales de marcaje para marcar ácidos nucleicos y estrategias de detección correspondientes en, por ejemplo, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals Ninth Edition by Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), 2003.

Las balizas moleculares (BM) son oligonucleótidos diseñados para la detección y cuantificación en tiempo real de ácidos nucleicos diana (por ejemplo amplicones diana de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*). Los extremos 5' y 3' de las BM comprenden colectivamente una pareja de fracciones que proporcionan las propiedades detectables de las BM. Uno de los extremos se encuentra unido a un fluoróforo y el otro se encuentra unido a una molécula inhibidora capaz de inhibir una emisión fluorescente del fluoróforo. Por ejemplo, una pareja ejemplar de fluoróforo-inhibidor puede utilizar un fluoróforo tal como EDANS o fluoresceína, por ejemplo en el extremo 5' y un inhibidor tal como dabculo, por ejemplo, en el extremo 3'. En el caso de que la BM se encuentra libre en solución, es decir, no hibridada con un segundo ácido nucleico, el tallo de la BM es estabilizado mediante apareamiento de bases complementarias. El apareamiento autocomplementario resulta en una estructura de "bucle de horquilla" de la BM en la que las fracciones de fluoróforo e inhibidora se encuentran próximas entre sí. En esta conformación, la fracción

fluorescente se encuentra inhibida por el fluoróforo. El bucle de la baliza molecular típicamente comprende una de las sondas oligonucleótidas indicadas en la presente memoria (es decir, se selecciona de entre SEC ID nº 3 y nº 27 ó complementos de las mismas) y por consiguiente es complementaria a una secuencia que debe detectarse en el ácido nucleico diana de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*, de manera que la hibridación del bucle con su secuencia complementaria en la diana fuerza la disociación del tallo, distanciando de esta manera el fluoróforo respecto del inhibidor. Lo anterior resulta en la desinhibición del fluoróforo, provocando un incremento de la fluorescencia de la BM.

Los detalles relativos a los métodos estándares de preparación y utilización de las MB se encuentran bien establecidos en la literatura y las BM se encuentran disponibles de varios proveedores comerciales de reactivos. Puede encontrarse más información sobre los métodos de preparación y utilización de BM en, por ejemplo, Leone et al., "Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogenous real-time detection of RNA", *Nucleic Acids Res.* 26:2150-2155, 1995; Hsuih et al., "Novel, ligation-dependent PCR assay for detection of hepatitis C in serum", *J. Clin. Microbiol.* 34:501-507, 1997; Kostrikis et al., "Molecular beacons: spectral genotyping of human alleles", *Science* 279:1228-1229, 1998; Sokol et al., "Real time detection of DNA:RNA hybridization in living cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:11538-11543, 1998; Tyagi et al., "Multicolor molecular beacons for allele discrimination", *Nature Biotechnology* 16:49-53, 1998; Fang et al., "Designing a novel molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies", *J. Am. Chem. Soc.* 121:2921-2922, 1999; y Marras et al., "Multiplex detection of single-nucleotide variation using molecular beacons", *Genet. Anal. Biomol. Eng.* 14: 151-156, 1999. También pueden encontrarse datos sobre aspectos de la construcción y utilización de las MB en la literatura de patentes, tal como la patente US nº 5.925.517 (20 de julio de 1999), de Tyagi et al., titulada "Detectably labeled dual conformation oligonucleotide probes, assays and kits", en la patente US nº 6.150.097, de Tyagi et al. (21 de noviembre de 2000), titulada "Nucleic acid detection probes having non-FRET fluorescence quenching and kits and assays including such probes", y en la patente US nº 6.037.130, de Tyagi et al. (14 de marzo de 2000), titulada "Wavelength-shifting probes and primers and their use in assays and kits".

Los componentes de las BM (por ejemplo oligos, incluyendo los marcados con fluoróforos o inhibidores) pueden sintetizarse utilizando métodos convencionales. Algunos de dichos métodos se han descrito en mayor detalle anteriormente. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos o ácidos péptido-nucleicos (APN) en aparatos de síntesis automática de oligonucleótidos/APN disponibles comercialmente, utilizando métodos estándares. Pueden unirse marcajes a los oligonucleótidos o APN durante la síntesis automática o mediante reacciones post-sintéticas que han sido descritas anteriormente; ver, por ejemplo, Tyagi y Kramer, *supra*, 1996. También pueden encontrarse aspectos relativos a la síntesis de oligonucleótidos funcionalizados en Nelson et al., "Bifunctional Oligonucleotide Probes Synthesized Using A Novel CPG Support Are Able To Detect Single Base Pair Mutations", *Nucleic Acids Res.* 17:7187-7194, 1989. Pueden introducirse marcajes/inhibidores en los oligonucleótidos o APN, por ejemplo mediante la utilización de una columna de vidrio de poro controlado para introducir, por ejemplo, el inhibidor (por ejemplo una fracción 4-dimetilaminoazobencén-4'-sulfonilo (DABSYL)). Por ejemplo, el inhibidor puede añadirse en el extremo 3' de los oligonucleótidos durante la síntesis automática; puede utilizarse un éster de succinimidilo del ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL) en el caso de que el sitio de unión sea un grupo amino primario, y puede utilizarse 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida (DABMI) en el caso de que el sitio de unión sea un grupo sulfhidrilo. De manera similar, puede introducirse fluoresceína en los oligonucleótidos, utilizando una fluoresceína fosforamidita que sustituya un nucleósido por fluoresceína, o mediante la utilización de una fluoresceína-dT-fosforamidita que introduzca una fracción fluoresceína en un anillo timidina mediante un conector. Para unir una fracción de fluoresceína a una localización terminal, puede acoplarse yodoacetamido-fluoresceína con un grupo sulfhidrilo. Puede introducirse tetracloro-fluoresceína (TET) durante la síntesis automática utilizando una 5'-tetracloro-fluoresceín-fosforamidita. Entre otros derivados fluoróforos reactivos y sus sitios respectivos de unión se incluyen el éster de succinimidilo de 5-carboxi-rodamina-6G (RHD) acoplado con un grupo amino, una yodoacetamida de tetrametilrodamina acoplado con un grupo sulfhidrilo, un isotiocianato de tetrametilrodamina acoplado con un grupo amino, o un cloruro de sulfonilo de rojo Texas acoplado con un grupo sulfhidrilo. Durante la síntesis de dichos componentes marcados, pueden purificarse oligonucleótidos o APN conjugados, si se desea, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alta presión u otros métodos.

Una diversidad de proveedores comerciales produce balizas moleculares estándares y específicas, incluyendo Cruachem (cruachem.com), Oswel Research Products Ltd. (UK; oswel.com), Research Genetics (una división de Invitrogen, Huntsville AL (resgen.com)), The Midland Certified Reagent Company (Midland, TX (mcr.com)) y Gorilla Genomics, LLC (Alameda, CA). También se encuentra comercialmente disponible una diversidad de kits que utilizan balizas moleculares, tales como los kits de discriminación alélica con balizas moleculares Sentinel™ de Stratagene (La Jolla, CA) y diversos kits de Eurogentec SA (Bélgica, eurogentec.com) e Isogen Bioscience BV (Países Bajos, isogen.com).

En determinadas realizaciones, se utiliza un sistema de ensayo de PCR en tiempo real incluye una o más sondas 5'-nucleasa para detectar ácidos nucleicos amplificados de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*. Estos sistemas operan mediante la utilización de la actividad endógena de nucleasa de determinadas polimerasas liberando mediante corte un inhibidor o marcaje respecto de un oligonucleótido de la invención que comprende el inhibidor y el marcaje, resultando en la desinhibición del marcaje. La polimerasa únicamente corta el inhibidor o el marcaje tras iniciarse la replicación, es decir, cuando el oligonucleótido se encuentra unido al molde y la polimerasa extiende el

cebador. De esta manera, una sonda oligonucleótida marcada apropiadamente y la polimerasa que comprende la actividad de nucleasa apropiada pueden utilizarse para detectar un ácido nucleico de interés de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis*. El análisis de los productos de PCR en tiempo real mediante, por ejemplo, FRET o similar (y transcripción inversa-PCR en tiempo real relacionada) proporciona una técnica bien conocida para el seguimiento en tiempo real de la PCR que se ha utilizado en una diversidad de contextos, que puede adaptarse para la utilización con las sondas y métodos descritos en la presente memoria (ver Laurendeau et al., "TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency" Clin Chem 45(7):982-6, 1999; Laurendeau et al., "Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay" Clin Chem 59(12):2759-65, 1999; y Kreuzer et al., "LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts" Cancer Research 59(13):3171-4, 1999).

X. SISTEMAS

Se da a conocer un sistema para *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* en una muestra. El sistema incluye uno o más reactivos de detección de ácidos nucleicos tal como se describe en la presente memoria (por ejemplo sondas de ácidos nucleicos, anticuerpos específicos de secuencia, etc.). En determinadas realizaciones, los reactivos de detección de ácidos nucleicos se encuentran dispuestos ordenadamente sobre un soporte sólido, mientras que en otras se proporcionan en uno o más recipientes, por ejemplo para los ensayos realizados en solución. El sistema incluye además por lo menos un detector (por ejemplo un espectrómetro, etc.) que detecta la unión entre ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos procedentes de la muestra y el reactivo de detección de ácidos nucleicos. Se describen en mayor detalle otros detectores posteriormente. Además, el sistema incluye además por lo menos un controlador operablemente conectado al detector. El controlador incluye uno o más conjuntos de instrucciones que correlacionan la unión detectada por el detector con la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* en la muestra.

El sistema puede comprender por lo menos un recipiente con el reactivo de detección de ácidos nucleicos. En estas realizaciones, el sistema opcionalmente incluye además por lo menos un modulador térmico operablemente conectado al recipiente para modular la temperatura en el mismo, y/o por lo menos un componente de transferencia de líquidos (por ejemplo un pipeteador automático, etc.) que transfiere líquido hacia y/o desde el recipiente, por ejemplo para poner en práctica una o más técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en el recipiente, etc.

Entre los sistemas ejemplares disponibles comercialmente que se utilizan opcionalmente para detectar ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* utilizando los reactivos de detección de ácidos nucleicos indicados en la presente memoria (por ejemplo sondas oligonucleótidas que comprenden secuencias seleccionadas de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 ó complementos de las mismas, anticuerpos específicos de secuencia, etc.) se incluye, por ejemplo, un analizador COBAS AMPLICOR[®], que se encuentra disponible de Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN), un sistema LUMINEX 100[™], que se encuentra disponible de Luminex Corporation (Austin, TX), un sistema de detección de secuencias ABI PRISM[®], que se encuentra disponible de Applied Biosystems (Foster City, CA) y similares.

Se da a conocer un ordenador o medio legible por ordenador. Incluye un conjunto de datos que comprende una pluralidad de cadenas de caracteres que corresponden a una pluralidad de secuencias que corresponden a subsecuencias de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante. Típicamente, por lo menos una de las cadenas de caracteres corresponde a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 ó complementos de las mismas. Típicamente, el ordenador o medio legible por ordenador incluye además un sintetizador automático acoplado con un periférico de salida del ordenador o medio legible por ordenador. El sintetizador automático recibe instrucciones del ordenador o medio legible por ordenador, las cuales dirigen la síntesis de, por ejemplo, una o más sondas de ácidos nucleicos que corresponden a una o más cadenas de caracteres en el conjunto de datos. Se describen en mayor detalle sistemas y componentes de sistemas ejemplares posteriormente.

Los detectores están estructurados para detectar las señales detectables producidas en, o próximamente a, por ejemplo, otro componente del sistema (por ejemplo en un recipiente de reacción, sobre un soporte sólido, etc.). Los detectores de señales adecuados que se utilizan opcionalmente, o que se adaptan para su utilización, en estos sistemas detectan, por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia, radioactividad, absorbancia, índice de refracción, luminiscencia o similar. Los detectores opcionalmente realizan un seguimiento de una señal o de una pluralidad de señales anteriormente y/o posteriormente a la realización de, por ejemplo, una etapa de ensayo dada. Por ejemplo, el detector opcionalmente realiza un seguimiento de una pluralidad de señales ópticas, que corresponden en posición a los resultados "en tiempo real". Entre los detectores o sensores ejemplares se incluyen tubos fotomultiplicadores, matrices de CCD, sensores ópticos, sensores de temperatura, sensores de presión, sensores de pH, sensores de conductividad, detectores de barrido, o similares. Cada uno de ellos, así como otros tipos de sensores se incorporan opcionalmente con facilidad en los sistemas indicados en la presente memoria. Opcionalmente, los sistemas incluyen múltiples detectores.

Entre los detectores ejemplares más específicos que se utilizan opcionalmente en estos sistemas se incluyen, por ejemplo, un detector de dispersión lumínica por resonancia, un espectroscopio de emisión, un espectroscopio de

fluorescencia, un espectroscopio de fosforescencia, un espectroscopio de luminiscencia, un espectrofotómetro, un fotómetro y similares. También se utilizan diversos componentes sintéticos, o se adaptan para su utilización, en los sistemas, incluyendo, por ejemplo, sintetizadores automáticos de ácidos nucleicos, por ejemplo para sintetizar las sondas oligonucleótidas indicadas en la presente memoria. Los detectores y componentes sintéticos que se incluyen opcionalmente en los sistemas de la invención se describen en mayor detalle en, por ejemplo, Skoog et al., Principles of Instrumental Analysis, 5a edición, Harcourt Brace College Publishers, 1998, y Currell, Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality, John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Entre los sistemas típicamente también se incluyen controladores que se conectan operablemente a uno o más componentes (por ejemplo detectores, componentes sintéticos, moduladores térmicos, componentes de transferencia de líquidos, etc.) del sistema para controlar el funcionamiento de los componentes. Más concretamente, generalmente se incluyen controladores a modo de componentes separados o incorporados del sistema que se utilizan para, por ejemplo, recibir datos de los detectores, para producir y/o regular la temperatura en los recipientes, para producir y/o regular el flujo de líquido hacia o desde recipientes seleccionados, o similares. Los controladores y/o otros componentes del sistema se acoplan opcionalmente a un procesador apropiadamente programado, ordenador, dispositivo digital u otro dispositivo informático (por ejemplo incluyendo un conversor analógico a digital o digital a analógico, según resulte necesario), que funciona ordenando el funcionamiento de estos instrumentos de acuerdo con instrucciones preprogramadas o introducidas por el usuario, recibiendo datos e información de dichos instrumentos, e interpretando, manipulando y ofreciendo esta información al usuario. Los controladores adecuados son generalmente conocidos de la técnica y se encuentran disponibles de diversos proveedores comerciales.

Cualquier controlador u ordenador incluye opcionalmente un monitor que con frecuencia es una pantalla de tubo de rayos catódicos ("CTR"), una pantalla plana (por ejemplo una pantalla de matriz activa de cristal líquido, una pantalla de cristal líquido, etc.) u otros. Los circuitos de ordenador con frecuencia se incluyen en una caja, que incluye numerosos chips de circuito integrado, tales como un microprocesador, memoria, circuitos de interfaz y otros. La caja opcionalmente también incluye una unidad de disco duro, una unidad de disquetera, un disco extraíble de alta capacidad, tal como un CD-ROM reescribible y otros elementos periféricos comunes. Los dispositivos de entrada, tales como un teclado o un ratón opcionalmente permiten la introducción de información por parte del usuario. Estos componentes se ilustran en mayor detalle posteriormente.

El ordenador típicamente incluye software apropiado para recibir instrucciones del usuario, en forma de entrada por parte del usuario en un conjunto de campos de parámetros, por ejemplo en un GUI, o en forma de instrucciones preprogramadas, por ejemplo preprogramadas para una diversidad de diferentes operaciones específicas. A continuación, el software convierte dichas instrucciones en un lenguaje apropiado para ordenar la activación de uno o más controladores para que lleven a cabo la operación deseada. El ordenador seguidamente recibe los datos de, por ejemplo, sensores/detectores incluidos en el sistema e interpreta los datos, los proporciona en un formato comprensible para el usuario o utiliza los datos para iniciar instrucciones adicionales para el controlador, según la programación, por ejemplo el control de los reguladores de flujo de líquido en respuesta a datos de peso de líquido recibidos de balanzas de peso o similares.

El ordenador puede ser, por ejemplo, un PC (Intel x86 o DOSTM compatible con chip Pentium, OS2TM, WINDOWSTM, WINDOWS NTTM, WINDOWS95TM, WINDOWS98TM, WINDOWS 2000TM, WINDOWS XPTM, una máquina basada en Linux, un MACINTOSHTM, un Power PC o una máquina basada en UNIX (por ejemplo una estación de trabajo SUNTM) u otro ordenador común disponible comercialmente conocido por el experto en la materia. Las aplicaciones de sobremesa estándares, tales como el software de procesamiento de textos (por ejemplo Microsoft WordTM o Corel WordPerfectTM) y software de bases de datos (por ejemplo software de hojas de cálculo, tal como Microsoft ExcelTM, Corel Quattro ProTM, o programas de bases de datos, tales como Microsoft AccessTM o ParadoxTM) pueden adaptarse a la presente invención. El software para llevar a cabo, por ejemplo, el control de moduladores de la temperatura y reguladores del flujo de líquidos opcionalmente es construido por el experto en la materia utilizando lenguaje de programación estándar, tal como Visual Basic, Fortran, Basic, Java o similar.

Las figuras 2 y 3 son esquemas que muestran sistemas ejemplares representativos que incluyen dispositivos lógicos en los que pueden encontrarse realizados diversos aspectos de la presente invención. Tal como entenderá el experto en la materia a partir de las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, el método informático puede implementarse opcionalmente en hardware y/o software, por ejemplo lógica en el lado del cliente o lógica en el lado del servidor, por ejemplo en un componente de programa multimedia (por ejemplo un componente multimedia fijo) que contiene instrucciones lógicas y/o datos que, al cargarse en un dispositivo informático apropiadamente configurado, causan que el dispositivo ponga en práctica el método. Asimismo, tal como entenderá el experto en la materia, un medio fijo que contiene instrucciones lógicas puede ser proporcionado al usuario en un medio fijo para su carga física en un ordenador o un medio fijo que contenga instrucciones lógicas puede residir en un servidor remoto al que un usuario accede por un medio de comunicación con el fin de descargar un componente de programa.

En particular, la figura 2 ilustra esquemáticamente el ordenador 200 al que el detector 202 y el componente de transferencia de líquidos 204 se encuentran operablemente conectados. Opcionalmente, el detector 202 y/o el

componente de transferencia de líquidos 204 se encuentran operablemente conectados a un ordenador 200 mediante un servidor (no mostrado en la figura 2). Durante el funcionamiento, el componente de transferencia de líquidos 204 típicamente transfiere líquidos, tales como alícuotas de muestra que comprenden amplicones marcados de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* a la matriz de reactivos de detección de ácidos nucleicos 206, por ejemplo que comprende sondas oligonucleótidas, anticuerpos específicos de secuencia, etc., tal como se indica en la presente memoria, dispuestos ordenadamente sobre dicha matriz. A continuación, el detector 204 típicamente detecta señales detectables (por ejemplo emisiones fluorescentes, etc.) producidas por amplicones marcados que se hibridan con sondas unidas a la matriz de reactivos de detección de ácidos nucleicos 206 tras la ejecución de una o más etapas de lavado para eliminar por lavado los ácidos nucleicos no hibridados de la matriz de reactivos de detección de ácidos nucleicos 206 utilizando el componente de transferencia de líquidos 204. Tal como se muestra además, el modulador térmico 208 también se encuentra operablemente conectado al ordenador 200. Antes de llevar a cabo un ensayo de hibridación, los ácidos nucleicos diana de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* pueden amplificarse utilizando cebadores de ácidos nucleicos marcados (por ejemplo cebadores que comprenden secuencias seleccionadas de entre SEC ID nº 3-27). Los amplicones de estas reacciones de amplificación seguidamente se transfieren típicamente a la matriz de reactivos de detección de ácidos nucleicos 206 utilizando el componente de transferencia de líquidos 204, tal como se ha indicado anteriormente, con el fin de llevar a cabo el ensayo de unión. En algunas realizaciones, se llevan a cabo los ensayos de unión concurrentemente con la amplificación de los ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* en el modulador térmico 208 utilizando, por ejemplo, balizas moleculares, sondas 5'-nucleasa o similares que comprenden secuencias seleccionadas de entre SEC ID nº 3-27. En dichas realizaciones, el detector 204 detecta las señales detectables producidas a medida que se llevan a cabo las reacciones de amplificación utilizando el modulador térmico 208.

La figura 3 muestra esquemáticamente el dispositivo informático o digital 300 que puede considerarse un aparato lógico que puede leer instrucciones del medio 302 y/o puerto de red 304, que opcionalmente puede encontrarse conectado al servidor 306 que presenta medios fijos 308. El dispositivo digital 300 seguidamente puede utilizar dichas instrucciones para dirigir el servidor o cliente lógico, tal como es entendido en la técnica. Un tipo de aparato lógico que puede constituir una realización de la invención es un sistema informático tal como se ilustra en 300, que contiene CPU 310, dispositivo de entrada opcionales 312 y 314, unidades de disco 316 y monitor opcional 318. Los medios fijos 302, o medios fijos 308 en el puerto 304, pueden utilizarse para programar dicho sistema y pueden representar medios ópticos o magnéticos de tipo disco, cinta magnética, memoria dinámica o estática de estado sólido, o similar. El puerto de comunicación 304 también puede utilizarse para recibir inicialmente instrucciones que se utilizan para programar dicho sistema y puede representar cualquier tipo de conexión de comunicación. Opcionalmente, el método se encuentra realizado en totalidad o en parte en los circuitos de un circuito integrado de aplicación específica (ACIS) o en un dispositivo lógico programable (PLD), por ejemplo puede encontrarse realizado en un lenguaje descriptor legible por ordenador, el cual puede utilizarse para crear un ACIS o PLD.

La figura 3 incluye además sintetizador automático 320, el cual se encuentra operablemente conectado al dispositivo digital 300 mediante el servidor 306. Opcionalmente, el sintetizador automático 320 se encuentra directamente conectado al dispositivo digital 300. Durante el funcionamiento, el sintetizador automático 320 típicamente recibe instrucciones para sintetizar uno o más cebadores o sondas que comprenden una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 3 a nº 27 ó complemento de las mismas, las cuales se encuentran incluidas en un conjunto de datos que comprende, por ejemplo, el dispositivo digital 300 y/o un medio legible por ordenador, tal como los medios fijos 302 y/o 308.

XI. KITS

Los oligonucleótidos para la detección de ácidos nucleicos según la reivindicación 1 y utilizados en los métodos de la presente invención se empaquetan opcionalmente en kits. Tal como se describe en la presente memoria, los reactivos de detección de ácidos nucleicos se unen a un ácido nucleico con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica del mismo en la que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a una de SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 ó la variante. Además, los kits también pueden incluir reactivos convenientemente empaquetados y materiales necesarios para la inmovilización, hibridación y/o detección de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y estándares de ADN, así como instrucciones para llevar a cabo el ensayo. Opcionalmente, los reactivos de detección de ácidos nucleicos (por ejemplo sondas oligonucleótidas, anticuerpos específicos de secuencia, etc.) se proporcionan ya unidos o de otro modo inmovilizados sobre soportes sólidos. En otra opción, los reactivos de detección de ácidos nucleicos se proporcionan libres en solución en recipientes, por ejemplo para llevar a cabo los métodos de detección de la invención en la fase solución. En algunas de dichas realizaciones, los reactivos de detección de ácidos nucleicos de los kits comprenden marcapos y/o fracciones inhibidoras, tal como en el caso de que balizas moleculares, sondas 5'-nucleasas o similares comprenden secuencias seleccionadas de entre SEC ID nº 3 y nº 27. En determinadas realizaciones, los kits incluyen además cebadores marcados para amplificar las secuencias diana de *N. gonorrhoeae* y/o de *C. trachomatis* en una muestra.

El kit incluye además uno o más de entre: un conjunto de instrucciones para poner en contacto los reactivos de detección de ácidos nucleicos con los ácidos nucleicos procedentes de una muestra o los amplicones de los mismos, y la detección de la unión entre los reactivos de detección de ácidos nucleicos y los ácidos nucleicos de *N.*

gonorrhoeae y/o de *C. trachomatis*, en caso de producirse, o por lo menos un recipiente para empaquetar los reactivos de detección de ácidos nucleicos y el conjunto de instrucciones. Los soportes sólidos ejemplares incluidos en los kits de la invención se seleccionan opcionalmente de entre, por ejemplo, una placa, una placa de micropocillos, una perla, una micropelota, un tubo (por ejemplo un microtubo, etc.), una fibra, una cerda, un peine, un chip de hibridación, una membrana, un cristal simple, una capa cerámica, una monocapa autoensamblante o similares.

En algunas realizaciones, el kit incluye además por lo menos un cebador de ácidos nucleicos que es por lo menos parcialmente complementario a por lo menos un segmento de un ácido nucleico de *N. gonorrhoeae*, por ejemplo para amplificar un segmento del ácido nucleico de *N. gonorrhoeae*. En determinadas realizaciones, el kit incluye además uno o más cebadores para amplificar uno o más segmentos de un ácido nucleico de *C. trachomatis*. En dichas realizaciones, el kit típicamente incluye además un conjunto de instrucciones para amplificar una o más subsecuencias de dichos ácidos nucleicos con los cebadores de ácidos nucleicos, por lo menos un biocatalizador que incorpora nucleótidos, y uno o más nucleótidos. En determinadas realizaciones, el cebador de ácidos nucleicos comprende por lo menos un marcaje (por ejemplo un pigmento fluorescente, un isótopo radioactivo, etc.). Se describen marcajes adecuados en mayor detalle en la presente memoria. Por ejemplo, el cebador de ácidos nucleicos opcionalmente se conjuga con biotina o con un derivado de biotina. En dichas realizaciones, el kit típicamente incluye además un enzima conjugado con avidina o con un derivado de avidina, o con estreptavidina o un derivado de estreptavidina, por ejemplo para llevar a cabo la detección de la unión entre los reactivos de detección de ácidos nucleicos de la invención y los ácidos nucleicos diana. En dichas realizaciones, el kit generalmente incluye además por lo menos un biocatalizador que incorpora nucleótidos (por ejemplo una polimerasa, una ligasa, o similar). En dichas realizaciones, el kit típicamente comprende además uno o más nucleótidos, por ejemplo para la utilización en la amplificación de los ácidos nucleicos diana. Opcionalmente, por lo menos uno de los nucleótidos comprende un marcaje. En algunas de dichas realizaciones, los kits incluyen además por lo menos una pirofosfatasa (por ejemplo una pirofosfatasa termoestable), por ejemplo para la utilización en la minimización de la pirofosforólisis, uracil-N-glucosilasa (UNG) (por ejemplo una UNG termoestable), por ejemplo para la utilización en aplicaciones en las que resulta deseable la protección frente a la contaminación cruzada.

XII. EJEMPLOS

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria se proporcionan únicamente a título ilustrativo y que no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada.

EJEMPLO 1:

DETECCIÓN DE *N. GONORRHOEAE* MEDIANTE LA REPETICIÓN DIRECTA 9 DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

Selección y síntesis de cebadores oligonucleótidos específicos de la repetición directa 9 de *Neisseria gonorrhoeae* para el análisis de PCR

La repetición directa 9 de *Neisseria gonorrhoeae* (NGDR9) fue previamente identificada como una secuencia de ADN de dos copias en el genoma de *Neisseria gonorrhoeae*. La secuencia de NGDR9 se obtuvo de la base de datos del laboratorio nacional de enfermedades de transmisión sexual de Los Alamos por Internet, en stdgen.lanl.gov/stdgen/bacteria/ngon/. La secuencia completa de 806 pares de bases de NGDR9 no presenta identidad sustancial con ninguna secuencia en el genoma de *Neisseria meningitidis*, pero presenta una identidad de 36,85% con huecos (identidad de 44,4% sin huecos) respecto a la sección 155 del cromosoma I de *Brucella suis* 1330 (número de acceso de GenBank® AE014469). La figura 4 ilustra una alineación de ClustalW de la secuencia de NGDR9 con una parte de dicha secuencia de *Brucella*. Se escaneó la secuencia de NGDR9 para regiones de identidad de secuencia mínima respecto a *B. suis* y cebadores oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo (NG519 (5'-CTCTCAATGCCCAATCATAAAGC-3') y un complemento de NG514 (es decir, 5'-GATAAAGCAGACGAAGCGGATAC-3' (SEC ID nº 24), que comprendían respectivamente una región de 190 pares de bases de NGDR9. Las unidades desoxicitidilato en los extremos 3' de ambos cebadores habían sido modificados para incluir grupos de t-butil-bencilo, tal como se indica en, por ejemplo, la patente US nº 6.001.611, titulada "Modified nucleic acid amplification primers", concedida el 14 de diciembre de 1999 a Will. Las posiciones de NG519 y NG514 en NGDR9 se encuentran subrayadas en la figura 4.

Las posiciones de otras parejas de cebadores oligonucleótidos ejemplares cadena arriba y cadena abajo también se encuentran subrayadas en la figura 4. En particular, se muestra DK101 (5'-GTTTGGCGGCAAGCATCT-3') y DK102 (5'-AAATGGGATGCTGTCGTC-3'). Se diseñó la pareja de cebadores DK101 y un complemento de DK102 (es decir, 5'-TTGACGACAGCATCCCATTT-3' (SEC ID nº 25)) para amplificar una región de 416 pares de bases de NGDR9. Los cebadores correspondientes a DK101 y al complemento de DK102, que incluían además conectores de sitio de restricción de extremo 5', también fueron sintetizados, es decir HINDDK101 (5'-GGCAAGCTTGTGTTGGCGGCAAGCATCT-3'; sitio de restricción HindIII subrayado) y BAMDK102 (5'-GGCGGATCCTTGACGACAGCATCCCATTT-3'; sitio de restricción BamHI subrayado). Se proporciona posteriormente una fotografía de un gel de agarosa que muestra la detección de *N. gonorrhoeae* utilizando dicha pareja de cebadores. DK103 (5'-AAACGCAATCTTCAAACACCTCA-3') y DK104 (5'-TTTGACGGCCTCACGCATAA-3') también se muestran

subrayados en la figura 4. La pareja de cebadores DK103 y un complemento de DK104 (es decir, 5'-TTATGCGTGAGGCCGTCAAA-3' (SEC ID nº 26)) para amplificar una región de 384 pares de bases de NGDR9.

Purificación de ADN genómico de *Neisseria*

La extracción del ADN genómico de diversas cepas de *Neisseria* se llevó a cabo utilizando el sistema de purificación de ADN PureGene® (Gentra Systems, Minneapolis, MN). Se cultivaron células bacterianas durante 48 horas en agar chocolate (Hardy Diagnostics, Santa María, CA) a 37°C en 5% de CO₂. Se rasparon las células de la superficie del agar, se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 13.000-16.000xg durante 5 segundos para peletizar las células. Se separó el sobrenadante mediante aspiración, dejando 10 a 20 ml de líquido residual. Las muestras se agitaron con vórtex vigorosamente para resuspender el pellet en el líquido residual. La extracción del ADN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, se añadieron 300 ml de solución de lisis celular a las células resuspendidas y se mezclaron utilizando la pipeta, para lisar las células. Tras la adición de 1,5 ml de solución de ARNasa A al lisado celular, las muestras se mezclaron mediante inversión de los tubos 25 veces y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Las muestras se enfriaron hasta la temperatura ambiente dejándolas sobre hielo durante 1 minuto. Se añadió un volumen de 100 ml de solución de precipitación de proteínas al lisado celular tratado con ARNasa y las muestras se mezclaron con vórtex vigorosamente a velocidad elevada durante 20 segundos. Los residuos de proteínas se precipitaron mediante centrifugación a 13.000-16.000xg durante 1 minuto. El sobrenadante que contenía las muestras de ADN se transfirió a tubos de microcentrífuga limpios de 1,5 ml, conteniendo cada uno 300 ml de isopropanol al 100%. Las muestras se mezclaron mediante inversión suave de los tubos 50 veces y después se centrifugaron a 13.000-16.000xg durante 1 minuto. Se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó con 300 ml de etanol al 70%. Los tubos se centrifugaron a 13.000-16.000xg durante 1 minuto. Tras eliminar el sobrenadante, los tubos se drenaron mediante inversión y los pellets de ADN se resuspendieron en 50 ml de solución de hidratación. Se cuantificó el ADN genómico utilizando reactivos de cuantificación de ADNdc PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, OR) y el ADN resuspendido se almacenó a -20°C hasta la utilización.

Amplificación de segmentos de NGDR9

Se llevaron a cabo reacciones de PCR separadas utilizando ADN genómico aislado a partir de diversas especies de *Neisseria* como moldes y la pareja de cebadores NG519 y el complemento de NG514 (indicados anteriormente). Se llevaron a cabo PCR en volúmenes de 100 µl que contenían tricina 50 mM (pH 8,3), K(OAc)₂ 80 mM (pH 7,5), Mn(OAc)₂ 2 mM (pH 6,5), dATP 50 mM, dGTP 50 mM, dCTP 50 mM, dUTP 100 mM, 20 U de ADN polimerasa ZO5 (Roche Molecular Systems, Alameda, CA), 5 U de AmpErase® UNG (uracil-N-glucosilasa), 0,5 mM de cada cebador y 1 ng/ml de bromuro de etidio. Se añadió ADN genómico como molde a razón de 10³ equivalentes genómicos por reacción para *Neisseria gonorrhoeae* y 10⁶ equivalentes genómicos por reacción para *Neisseria meningitidis* y otras cepas de *Neisseria*. Las reacciones se llevaron a cabo durante 60 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 58°C durante 20 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos utilizando un sistema de PCR COBAS TaqMan® (Roche Molecular Systems, Alameda, CA).

También se llevaron a cabo reacciones separadas de PCR utilizando ADN genómico aislado de diversas especies de *Neisseria* como moldes y la pareja de cebadores HINDDK101 y BAMDK102 (indicados anteriormente), utilizando un procedimiento similar al descrito anteriormente, utilizado para amplificar el segmento de 190 pares de bases de NGDR9.

Electroforesis analítica en gel de agarosa de productos de PCR

Se prepararon productos de PCR para el análisis de electroforesis en gel mediante la adición de 20 µl de las muestras de ADN a 8 µl de 10x tampón de carga de gel (pigmento azul de bromofenol al 0,025%, EDTA 100 mM y sacarosa al 30%). A continuación, se cargaron las muestras en carriles de un gel sumergido horizontalmente que contenía Nusieve al 3,0% (p/v), gel de agarosa al 0,5% (p/v) y bromuro de etidio 0,5 mg/ml en 1X tampón TB (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 2 mM, pH 8,0). El tampón de migración de electroforesis era 1X tampón TB que contenía 0,5 mg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo a 95-100 V durante 1 hora, después se retiró el gel y se visualizó en un transiluminador de UV de longitud de onda larga. Los geles particulares se examinaron para la presencia o ausencia de productos de amplificación de PCR de los tamaños esperados, de 190 ó 416 pb.

Las figuras 5A y B y 6A y B son fotografías de geles de agarosa que muestran la detección del segmento de 190 pares de bases de NGDR9, mientras que la figura 7 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra la detección del segmento de 416 pares de bases de NGDR9.

EJEMPLO 2:

ENSAYOS QUE ILUSTRAN LA DETECCIÓN SELECTIVA DE *N. GONORRHOEA*

El presente ejemplo proporciona listas de organismos que se analizaron en ensayos que incluían la utilización de los cebadores de ácidos nucleicos NG519 (que presenta una secuencia correspondiente a SEC ID nº 5) y NG514R (que presenta una secuencia correspondiente a SEC ID nº 24) y una sonda 5'-nucleasa (que presenta una secuencia correspondiente a SEC ID nº 18) solos o en combinación con cebadores de *C. trachomatis*. En particular,

la inclusividad (es decir, una medida de la capacidad de detectar el organismo diana, *N. gonorrhoeae* en las muestras) de estos ensayos se ilustra en la Tabla IX.

TABLA IX

Género	Especie	Número	Cebadores	Resultados
<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>	108	CT/NG	Todos positivos

5 La exclusividad (es decir, una medida de la capacidad de excluir falsos positivos en el caso de que se encuentren presentes organismos *Neisseria* de especies diferentes de *gonorrhoea* en las muestras) de estos ensayos se ilustra en la Tabla X.

10

TABLA X

Género	Especie	Número	Cebadores	Resultados
<i>Neisseria</i>	<i>animalis</i>	3	CT/NG	Todos negativos
<i>Neisseria</i>	<i>caviae</i>	2	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>cinerea</i>	6	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>cuniculi</i>	1	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>denitrificans</i>	2	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>elongata</i>	4	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>flava</i>	1	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>flavescens</i>	7	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>kochi</i>	1	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>lactamica</i>	6	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>meningitidis</i>	21	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>	14	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>peflava</i>	6	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>polysaccharea</i>	3	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>sicca</i>	7	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	1	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>subflava biovar flava</i>	1	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>subflava biovar perflava</i>	2	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>subflava biovar subflava/flava</i>	2	"	"
<i>Neisseria</i>	<i>subflava perflava</i>	5	"	"
	Total	95		Todos negativos

La especificidad (es decir, una medida de la capacidad de excluir falsos positivos en el caso de que se encuentren presentes organismos no *Neisseria* en las muestras) de estos ensayos se ilustra en la Tabla XI.

15

TABLA XI

Género	Especie	Número	Cebadores	Resultados
<i>Chlamydia</i>	<i>trachomatis</i>	15	NG	Todos negativos
<i>Chlamydia</i>	<i>pneumoniae</i>	1	"	"
<i>Chlamydia</i>	<i>psittaci</i>	1	"	"
<i>Achromobacter</i>	<i>xerosis</i>	1	"	"
<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	1	"	"
<i>Acinetobacter</i>	<i>calcoaceticus</i>	1	"	"
<i>Acinetobacter</i>	<i>sp. genospecies 3</i>	1	"	"
<i>Actinomyces</i>	<i>israelii</i>	1	"	"
<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>	1	"	"
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	1	"	"
<i>Agrobacterium</i>	<i>radiobacter</i>	1	"	"
<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>	1	"	"
<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i>	1	"	"
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	1	"	"
<i>Bacterioides</i>	<i>fragilis</i>	1	"	"
<i>Bacteroides</i>	<i>caccae</i>	1	"	"
<i>Bifidobacillus</i>	<i>longum</i>	1	"	"

Bifidobacterium	adolescentis	1	"	"
Branhamella	catarrhalis	1	"	"
Brevibacterium	linens	1	"	"
Candida	albicans	1	"	"
Chromobacter	violaceum	1	"	"
Citrobacter	freundii	1	"	"
Clostridium	innocuum	1	"	"
Clostridium	perfringens	1	"	"
Corynebacterium	genitalium	1	"	"
Corynebacterium	xerosis	1	"	"
Cryptococcus	neoformans	1	"	"
Deinococcus	radiopugnans	1	"	"
Derrxia	gummosa	1	"	"
Echerichia	coli	1	"	"
Eikenella	corrodens	1	"	"
Enterobacter	cloacae	1	"	"
Enterococcus	avium	1	"	"
Enterococcus	faecalis	1	"	"
Enterococcus	.faecium	1	"	"
Erysipelothrix	rhusiopathiae	1	"	"
Ewingella	americana	1	"	"
Flavobacterium	meningosepticum	1	"	"
Gamella	haemolysans	1	"	"
Gamella	morbilorum	1	"	"
Gardnerella	vaginalis	1	"	"
Haemophilus	influenzae	1	"	"
Haemophilus	ducreyi	1	"	"
Kingella	kingae	1	"	"
Klebsiella	pneumoniae ss ozaenae	1	"	"
Lactobacillus	oris	1	"	"
Lactobacillus	vaginalis	1	"	"
Lactobacillus	acidophilus	1	"	"
Lactobacillus	brevis	1	"	"
Lactobacillus	crispus	1	"	"
Lactobacillus	lactis lactis	1	"	"
Lactobacillus	parabuchneri	1	"	"
Lactococcus	lactis cremoris	1	"	"
Legionella	bozemanii	1	"	"
Legionella	pneumophila	1	"	"
Leuconostoc	paramesenteroides	1	"	"
Micrococcus	luteus	1	"	"
Moraxella	osloensis	1	"	"
Morganella	morganii	1	"	"
Mycobacterium	smegmatis	1	"	"
Mycoplasma	hominis	1	"	"
Serratia	denitrificans	1	"	"
Pasteurella	maltocida	1	"	"
Pediococcus	acidilactica	1	"	"
Peptostreptococcus	magnus	1	"	"
Peptostreptococcus	productus	1	"	"
Prevotella	bivia	1	"	"
Prevotella	corporis	1	"	"
Prevotella	intermedia	1	"	"
Propionibacterium	acnes	1	"	"
Proteus	mirabilis	1	"	"
Providencia	stuartii	1	"	"
Pseudomonas	aeruginosa	1	"	"
Pseudomonas	putida	1	"	"
Rahnella	aquatilis	1	"	"
Salmonella	minnesota	1	"	"
Salmonella	typhimurium	1	"	"

Serratia	marscence	1	"	"
Staphylococcus	aureus	1	"	"
Staphylococcus	epidermidis	1	"	"
Streptococcus	salivarius	1	"	"
Streptococcus	agalactiae	1	"	"
Streptococcus	anginosus	1	"	"
Streptococcus	bovis	1	"	"
Streptococcus	dysgalatia	1	"	"
Streptococcus	equinis	1	"	"
Streptococcus	pneumoniae	1	"	"
Streptococcus	pyogenes	1	"	"
Vibrio	parahaemolyticus	1	"	"
Yersinia	enterocolitica	1	"	"
Treponema	pallidum	1	"	"
Virus herpes simplex 1		1	"	"
Virus herpes simplex 2		1	"	"
Virus Epstein-Barr		1	"	"
Virus del papiloma humano de tipo 16		1	"	"
Virus del papiloma humano de tipo 18		1	"	"
	Total	111		Todos negativos

EJEMPLO 3:

DETECCIÓN DE N. GONORRHOEAE MEDIANTE LA REPETICIÓN DIRECTA 33 DE NEISSERIA GONORRHOEAE

Selección y síntesis de cebadores oligonucleótidos específicos para la repetición directa 33 de Neisseria gonorrhoeae para el análisis de PCR

La repetición directa 33 de Neisseria gonorrhoeae (NGDR33) se identificó previamente como una secuencia de ADN de dos copias en el genoma de Neisseria gonorrhoeae. La secuencia de NGDR33 se obtuvo de la base de datos del laboratorio nacional de enfermedades de transmisión sexual de Los Alamos mediante Internet en stdgen.lanl.gov/stdgen/bacteria/ngon/. Una búsqueda de homología de BLAST de NGDR33 reveló numerosas correspondencias significativas con Neisseria meningitidis y la secuencia completa de 1.142 pares de bases de NGDR33 presentaba una identidad de 38,09% con huecos (identidad de 50,44% sin huecos) respecto a la sección 77 de N. meningitidis serogrupo B cepa MC58 (número de acceso de GenBank® AE002435). La figura 8 ilustra una alineación de ClustalW de la secuencia de NGDR33 con una parte de dicha secuencia de N. meningitidis. Se escaneó la secuencia de NGDR33 para regiones de identidad mínima de secuencia respecto a N. meningitidis y se sintetizaron los cebadores oligonucleótidos cadena arriba y cadena bajo (NG613 (5'-AATGTCG-GGTTTGACGAACTC-3') y un complemento de NG614 (es decir, 5'-AACGTCCGACAACCGGTAAC-3'), comprendiendo respectivamente una región de 265 pares de bases de NGDR33. Las posiciones de NG613 y NG614 se encuentran subrayadas en la figura 8. Las unidades desoxicitidilato en los extremos 3' de ambos cebadores han sido modificados, tal como se ha indicado anteriormente, para incluir grupos t-butil-bencilo.

Purificación de ADN genómico de Neisseria, amplificación y electroforesis analítica en gel de agarosa

Se purificó el ADN genómico de diversas especies de Neisseria tal como se ha indicado anteriormente, en el Ejemplo I. Se llevaron a cabo reacciones separadas de PCXR utilizando el ADN genómico aislado de diversas especies de Neisseria como moldes y la pareja de cebadores NG613 y el complemento de NG614 (tal como se ha indicado anteriormente), utilizando un procedimiento similar al descrito anteriormente para amplificar el segmento de 190 pares de bases de NGDR9. Además, los productos de PCR de dichas reacciones de amplificación se separaron mediante electroforesis tal como se ha indicado anteriormente, en el Ejemplo I. Se examinaron los geles para la presencia o ausencia de productos de amplificación de PCR en el tamaño esperado de 265 pb. Las figuras 9A y B y 10 son fotografías de geles de agarosa que muestran la detección de dicho segmento de 265 pares de bases de NGDR33.

EJEMPLO 4:

DETECCIÓN DE N. GONORRHOEAE / C. TRACHOMATIS EN MUESTRAS CLÍNICAS

El presente ejemplo profético describe un protocolo para la detección de N. gonorrhoeae y C. trachomatis en muestras clínicas.

Muestras clínicas

Se recogieron especímenes de hisopos endocervicales de mujeres y especímenes de hisopos uretrales de hombres mediante procedimientos estándares conocidos de la técnica. Los hisopos se inocularon en medios adecuados de transporte de cultivos (por ejemplo 2SP, M-4 (Microtest, Inc., Atlanta, CA), clamidial de Bartel (Intracel Corp., Issaquah, WA), etc.), que seguidamente se utilizaron para el análisis de PCR (ver también Van der Pol et al., J. Clin. Microbiol. 38:1105-1112, 2000, que se incorpora como referencia). Estos especímenes se almacenaron generalmente a una temperatura de entre 2°C y 8°C y se transportaron típicamente al laboratorio dentro de las 24 a 72 horas siguientes a la recolección. Los especímenes típicamente se agitaron con vórtex con el hisopo todavía en el tubo, se inocularon los cultivos celulares y se transfirió una alícuota de cada espécimen a un tubo nuevo, que se almacenó generalmente a una temperatura de entre 2°C y 8°C durante un máximo de 7 días posteriores a la recolección y después se procesaron para el análisis de PCR.

Opcionalmente, también se recogieron alícuotas de 50 ml de la primera orina de tanto hombres como mujeres. Se recogieron especímenes de orina de las mujeres antes o después de la recolección de los hisopos. Los especímenes de orina de hombres se recogieron después de obtener los especímenes de hisopos uretrales. Los especímenes de orina típicamente se almacenaron a temperatura ambiente y se transportaron al laboratorio en las 24 horas siguientes o se almacenaron a, por ejemplo, una temperatura de entre 2°C y 8°C en caso de no transportarse en las 24 horas siguientes a la recolección. Al llegar al laboratorio, típicamente se almacenó una alícuota de 500 ml a una temperatura de entre 2°C y 8°C durante un máximo de 7 días desde el momento de la recolección hasta su procesamiento para el análisis de PCR.

Análisis de PCR

Cada espécimen típicamente se procesa y se somete a uno de los ensayos AMPLICOR® y COBAS AMPLICOR® o a ambos, tal como se describe en los impresos en el paquete del fabricante. Para cada espécimen procesado, los ADN diana de *C. trachomatis*, de *N. gonorrhoeae* y de control interno (CI) se amplifican simultáneamente en una única mezcla de reacción que contiene por lo menos dos parejas de cebadores, por lo menos una pareja específica para *C. trachomatis* y por lo menos una pareja específica para *N. gonorrhoeae* (por ejemplo que comprende por lo menos una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 3 y nº 27). Los productos de amplificación resultantes generalmente se capturan separadamente y se detectan colorimétricamente mediante hibridación en placas de microtitulación (formato AMPLICOR®) (Crotchfelt et al., "Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens from men and women by a coamplification PCR assay", J. Clin. Microbiol. 35:1536-1540, 1997) o a micropartículas magnéticas (formato COBAS AMPLICOR®) recubiertas con *N. gonorrhoeae* (por ejemplo que comprende secuencias seleccionadas de entre SEC ID nº 3 y nº 27, y sondas oligonucleótidas específicas de *C. trachomatis* y de CI. El analizador COBAS AMPLICOR® lleva a cabo automáticamente todas las etapas de amplificación, hibridación y detección (DiDomenico et al., "COBAS AMPLICOR™: a fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR", Clin. Chem. 42:1915-1923, 1996; Jungkind et al., "Evaluation of automated COBAS AMPLICOR PCR system for detection of several infectious agents and its impact on laboratory management", J. Clin. Microbiol. 34:2778-2783, 1996). En el formato AMPLICOR®, se lleva a cabo la amplificación, por ejemplo el cicladador térmico GeneAmp® PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) y la hibridación y la detección se llevan a cabo manualmente (Loeffelholz et al., "Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by polymerase chain reaction", J. Clin. Microbiol. 30:2847-2851, 1992).

Análisis de los datos

Los especímenes que producen señales superiores a un valor de corte positivo (densidad óptica [DO] de 2,0 (A_{660}) para *C. trachomatis* y de DO de 3,5 (A_{660}) para *N. gonorrhoeae*) típicamente se interpretan como positivos para el organismo particular, con independencia del resultado del CI. Los especímenes que rinden señales de *N. gonorrhoeae* o de *C. trachomatis* inferiores a un valor de corte negativo (por ejemplo DO de 0,2) típicamente se interpretan como negativos para el organismo particular, con la condición de que la señal del CI sea superior al valor de corte asignado (por ejemplo una DO de 0,2) del ensayo considerado válido. Los especímenes que producen señales de *N. gonorrhoeae* o de *C. trachomatis* inferiores a los valores de corte para *N. gonorrhoeae* o para *C. trachomatis* y el CI se interpretan generalmente como inhibidoras. Los especímenes inhibidores típicamente se someten nuevamente a ensayo mediante procesamiento de una alícuota congelada del espécimen original. Los resultados de ensayo repetidos se clasifican utilizando los criterios anteriormente indicados.

Los especímenes que producen resultados entre los valores de corte negativos y positivos ($\geq 0,2$, $<3,5$ para *N. gonorrhoeae* y $\geq 0,2$, $<2,0$ para *C. trachomatis*) se consideran típicamente ambiguos para el organismo particular, con independencia de la señal del CI. Los resultados ambiguos se resuelven generalmente mediante procesamiento de una alícuota del espécimen original, realizando los ensayos por duplicado y comparando los resultados con el ensayo inicial. Estos especímenes típicamente se interpretan como positivos para el organismo particular en el caso de que por lo menos dos ensayos válidos produzcan una DO de *N. gonorrhoeae* o de *C. trachomatis* $\geq 2,0$ para el organismo particular. Estos especímenes se interpretan generalmente como negativos para el organismo particular.

en el caso de que dos ensayos repetidos produzcan señales de *N. gonorrhoeae* o de *C. trachomatis* <0,2 DO para el organismo particular, con la condición de que las señales del CI sean superiores al valor de corte asignado. En el caso de que dos ensayos repetidos produzcan una DO de *N. gonorrhoeae* o de *C. trachomatis* <0,2 para el organismo particular y la señal del CI sea inferior al valor de corte asignado para cualquiera de los ensayos repetidos por duplicado, el espécimen se interpreta generalmente como inhibidor.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID nº 1 (NGDR9)

5'-CAGCCGCATCATGATGCCGCACGTCAGGGCTTCGTCTTCCGATACCTTTGCGCC
AGACAACATCCGGGCGATGTTTTCTTTTTCGCTTTTGACCGGGCGGACAGCCGGT
TCCGGTCAACGTTTCTGACCGTCCCGGCGCGTTTGACGGCGCGTTCCTGCCGCGTT
GATTCCTTCGCCGCGCGTTTGGCGGCAAGCATCTGTTTTGCCGTCGGTTTTGTTGC
TACTGTTTGCATTTTGTCTCTCGATTTTTTGATGCCGTTCTCTCAATGCCCAATCA
TAAAGCTGTATCTCTCACGAGGTCGCCGAATTTAAATTGATAGTTCATGTCTTGTTTC
CATTAATATCAAACGCAATCTTCAAACACCTCAATTACATTTTTTAAATCGCTAATA
CCATAATTTATTACATCCTTTAGAAATCCAAAGAGGTATCCGCTTCGTCTGCTTTA
TCCCTAATTTTCGTCTATATAACCTCTAACGATTCAGGCTCTTTTAATGCTTCTTTG
CATAAGTTATCTATTACCCTTAATGCGTTTTTTACATCTTCCAAATAGCTCATTTTTT
GCTCCTTAACTCAAATGGGATGCTGTGCTCAACATCTTCTACGGTTTATCTAATCT
GCAAATCTTCCGCCCTTCAATCTTCGCGCCTGCTACTTGCCGACCGCTTTCAATC
GCTTTTCTGATGGCGGTTTTGTCCGGTTCGGTTTTGACGGCCTCACGCATAAATTC
GGCGGGGATTTGTGCTTCGTCTAAGATCACGACGGCTTCGGATTTGCGGAACGAG
GCTTTAAAAGTGCCGTC-3'

SEC ID nº 2 (NGDR33)

5'-ACGCCGTGGTGCGGCCTGTTTGTGCGATACTGCCTGGGCAAAAGCGGACGCGC
GGTCATCAGGGACTGGTATCGCGCCAAAGCCTGGTCAATGTCGGGTTTGACGAAA
CTCGAAGCCCCCGCATACGGCTGCATCGCGGTCAAACCGCGCCGGGGCGGCGGAC
ACGTGTTCTTCGTTGTGCGCAAAGACGCGGAAGGCAGAATCTTGGGCTTGGGCGG
CAATCAGGGCAATATGGTATCCATCATCCCGTTTGACCCTGCGGACATTGACGGCT
ACTTCTGGCCGTCCAAGCTGATTGGCGGCAAAGCCGTGCCTTCGTCCCCCGCCGA
AGGGCGTTACCGGTTGTGCGAAGTTGCCGCCACGGCGAAACAGGGCGCGGGCGAG
GCGTAAATGATTGGGGCTTTGCTGAAAAATTGGAAGCCGCTGCTTATTTTGTCCGC
AATCGCGTTCTTCGCCGTTTCTTGGCAGCTGGACAGGGCGGCGCAATACCGTCGC
GGATACGGTGCGGCGGTGTGCGGAGGTTTCGGAACGCCTCAAAGCCGCCGCGGTTCG
AACACGCCGAACACGCCCGCAAATCGTCCGCCGCGTATCAGGCGCAAAGGCGGC

GCGCGAGGAAAAAGAAAGGGTGCCTATGTGCAAACGCTTAAAATCATTGAAAAAC
 CTGTGTACCGCAATGCCTGTTTTGATGCTGACGGCGTGCGCGAACTCAACGCCGCC
 GTTGACGACGGCGGTTAAGCCGCCCGCCGATTTGGTGCGGCCCTGCCCGAAACTG
 CCGCACCTTGAAGGGAACACGGGCGCGGACGTGCTGCCGTGGGCCCTGAAGGCGG
 CCGGTATGTATAACGACTGCAGGGCGCGGCACGGCGCGCTGGTACGGGCGTTGGG
 CGCGGATTGAGTTGTCAACCGGAAGTTTGCAACCGAACC GTCGGTTCCGGGTTGG
 CGGCCGCATCGGGGGAAGTGTGCGGCATTCCCCCGATTTTTTACATATCGGGCGG
 ACGCGGCAAATTTTTGCCGTTTTGTTTGC CGGAAGGGGGCGTTATACAAAATTATC
 AGGCGCACCAATAATGGGCGGAAATGAAAATGCCGTACCGATCCGGACAACAACC
 GATGCCGCACCCTGCGGGCAGGCTTCGCACTCTGAAAGG-3'

SEC ID nº 3 (NGDR9/ 259U21)
 5'-CGTTCTCTCAATGCCCAATCA-3'

5

SEC ID nº 4 (NGDR9/427L21)
 5'-AGCAGACGAAGCGGATACCTC-3'

SEC ID nº 5 (NGDR9/ NG519)
 5'-CTCTCAATGCCCAATCATAAAGC-3'

10

SEC ID nº 6 (NGDR9/ NG514)
 5'-GTATCCGCTTCGTCTGCTTTATC-3'

15

SEC ID nº 7 (NGDR9/ DK101)
 5'-GTTTGGCGGCAAGCATCT-3'

SEC ID nº 8 (NGDR9/ DK102)
 5'-AAATGGGATGCTGTCGTCAT-3'

20

SEC ID nº9 (NGDR9/ HINDDK101)
 5'-GGCAAGCTTGTGTTGGCGGCAAGCATCT-3'

SEC ID nº 10 (NGDR9/ BAMDK102)
 5'-GGCGGATCCTTGACGACAGCATCCCATT-3'

25

SEC ID nº 11 (NGDR9/ DK103)
 5'-AAACGCAATCTTCAAACACCTCA-3'

SEC ID nº 12 (NGDR9/ DK104)
 5'-TTTGACGGCCTCACGCATAA-3'

30

SEC ID nº 13 (NGDR33/ 88U20)
 5'-TCAATGTCGGGTTTGACGAA-3'

35

SEC ID nº 14 (NGDR33/ 335L20)
 5'-AACGTCCGACAACCGGTAAC-3'

SEC ID nº 15 (NGDR33/ NG613)
 5'-AATGTCGGGTTTGACGAACTC-3'

40

SEC ID nº 16 (NGDR33/ NG614)
 5'-GTTACCGGTTGTCGGACGTT -3'

SEC ID nº 17 (NGDR9)
 5'-CGAGGTCGCCGAATTTAAATTGATAGTT-3'

45

SEC ID nº 18 (NGDR9)
 5'-AACTATCAATTTAAATTCGGCGACCTCG-3'

50

SEC ID nº 19 (NGDR9)
5'-CGAGGTCGCCGAATTTAAATTGATAGTTCA-3'

5 SEC ID nº 20 (NGDR9)
5'-TGAACATCAATTTAAATTCGGCGACCTCG-3'

SEC ID nº 21 (NGDR33/ Sentido)
5'-GCGGCAATCAGGGCAATATGGTAT-3'

10 SEC ID nº 22 (NGDR33/ Antisentido)
5'-ATACCATATTGCCCTGATTGCCGC-3'

SEC ID nº 23 (NGDR33/ 214U25)
5'-GGCGGCAATCAGGGCAATATGGTAT-3'

15 SEC ID nº 24 (NGDR9/ NG514R)
5'-GATAAAGCAGACGAAGCGGATAC-3'

SEC ID nº 25 (NGDR9/ DK102R)
20 5'-TTGACGACAGCATCCCATT-3'

SEC ID nº 26 (NGDR9/ DK104R)
5'-TTATGCGTGAGGCCGTCAA-3'

25 SEC ID nº 27 (NGDR33/ NG614R)
5'-AACGTCCGACAACCGGTAAC-3'

(SEC ID nº 28 (CONSENSO))

5'-GCATCTGTTTTGCCGTCGGTTTTGTTGCTACTGTTTGCATTTTGTTCCTCGATT
TTTTGATGCCGTTCTCTCAATGCCCAATCATAAAGCTGTATCTCTCACGAGGTCGC
CGAATTTAAATTGATAGTTCATGTCTTGTTCATTAATATCAAACGCAATCTTCAA
CACCTCAATTACATTTTTTAAATCGCTAATACCATAATTTATTACATCCTTTAGAAAT
TCCAAAGAGGTATCCGCTTCGTCTGCTTTATCCCTAATTTTCGTCTATATAACCCTCT
AACGATTCAGGCTCTTTAATGCTTCTTTGCATAAGTTATCTATTACCCTTAATGCG
TTTTTTACATCTTCCAAATAGCTCATTTTTTGCTCCTTAACTCAAATGGGATGCTG
30 TCGTCAA-3'

SEC ID nº 29 (Secuencia de la cepa 1117 de NG)

5'-GTTGCTACTGTTTGCATTTTGTTCCTCGATTTTGTGATGCCGTTCTCTCAATGC
CCAATCATAAAGCTGTATCTCTCACGAGGTCGCCGAATTTAAATTGATAGTTCATGT
CTTGTTCATTAATATCAAACGCAATCTTCAAACACCTCAATTACATTTTTTAAATC
GCTAATACCATAATTTATTACATCCTTTAGAAATTCCAAAGAGGTATCCGCTTCGTC
TGCTTTATCCCTAATTTTCGTCTATATAATCCTCTAACGATTCAGGCTCTTTAATGC
TTCTTTGCATAAGTTATCTATTACCCTTAATGCGTTTTTTACATCTTCCAAATAGCT
35 CATTTTTTGCTCCTTAACTCAAATGGGAT-3'

SEC ID nº 30 (Secuencia de la cepa 1120 de NG)

5'-CTGTTTGCATTTTGTCTCTCGATTTTTTGGATGCCGTTCTCTCAATGCCCAATCAT
AAAGCTGTATCTCTCACGAGGTGCGCGAATTTAAATTGATAGTTCATGTCTTGTTCC
ATTAATATCAAACGCAATCTTCAAACACCTCAATTACATTTTTTAAATCGCTAATAC
CATAATTTATTACATCCTTTAGAAATTCCAAAGAGGTATCCGCTTCGTCTGCTTTAT
CCCTAATTTTCGTCTATATAACCCTCTAACGATTCAGGCTCTTTTAATGCTTCTTTGC
ATAAGTTATCTATTACCCTTAATGCGTTTTTTACATCTTCCAAATAGCTCATTTTTTG
CTCCTTAACTCAAAATGGGATGCTGTCGTCAAA-3'

SEC ID nº 31 (Secuencia de la cepa 6346 de NG)

5'-TGTTTTGCCGTCGGTTTTGTTGCTACTGTTTGCATTTTGTCTCTCGATTTTTTGA
TGCCGTTCTCTCAATGCCCAATCATAAAGCTGTATCTCTCACGGGGTTCGCGAATT
TAAATTGATAGTTCATGTCTTGTTCCATTAATATCAAACGCAATCTTCAAACACCTC
AATTACATTTTTTAAATCGCTAATACCATAATTTATTACATCCTTTAGAAATTCCAAA
GAGGTATCCGCTTCGTCTGCTTTATCCCTAATTTTCGTCTATATAACCCTCTAACGAT
TCAGGCTCTTTTAATGCTTCTTTGCATAAGTTATCTATTACCCTTAATGCGTTTTTT
ACATCTTCCAAATAGCTCATTTTTTGCTCCTTAACTCAAAATGGGATGCTGTCGTCA
AA-3'

SEC ID nº 32 (Secuencia de la cepa 6359 de NG)

5'-GCATCTGTTTTGCCGTCGGTTTTGTTGCTACTGTTTGCATTTTGTCTCTCGATT :
TTTTGATGCCGTTCTCTCAATGCCCAATCATAAAGCTGTATCTCTCACGAGGTTCGC
CGAATTTAAATTGATAGTTCATGTCTTGTTCCATTAATATCAAACGCCATCTTCAA
CACCTCAATTACATTTTTTAAATCGCTAATACCATCATTTATTACATCCTTTAGAAAT
TCCAAAGAGGTATCCGCTTCGTCTACTTTATCCCTAATTTTCGTCTATATAATCCTCT
AACGATTCAGGCTCTTTTAATGCTTCTTTGCATAAGTTATCTATTACCCTTAATGCG
TTTTTTACATCTTCCAAATAGCTCATTTTTTGCTCCTTAACTCAAAATGGGATGCTG
TCGTCAAA-3'

SEC ID nº 33 (Secuencia de la cepa 6364 de NG)

5'-GCATCTGTTTTGCCGTCGGTTTTGTTGCTACTGTTTGCATTTTGTCTCTCGATT
TTTTGATGCCGTTCTCTCAATGCCCAATCATAAAGCTGTATCTCTCACGGGGTTCGC
CGAATTTAAATTGATAGTTCATGTCTTGTTCCATTAATATCAAACGCAATCTTCAA
CACCTCAATTACATTTTTTAAATCGCTAATACCATAATTTATTACATCCTTTAGAAAT
TCCAAAGAGGTATCCGCTTCGTCTGCTTTATCCCTAATTTTCGTCTATATAACCCTCT
AACGATTCAGGCTCTTTTAATGCTTCTTTGCATAAGTTATCTATTACCCTTAATGCG
TTTTTTACATCTTCCAAATAGCTCATTTTTTGCTCCTTAACTCAAAATGGGATGCTG
TCGTCAAA-3'

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente con un ácido nucleico que presenta SEC ID nº 1 ó nº 2 que comprende un ácido nucleico que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, preferentemente una identidad de secuencia de por lo menos 95% respecto a una de SEC ID nº 3 a nº 27 ó un complemento de las mismas a lo largo de la longitud completa de SEC ID nº 3 a nº 27 ó el complemento de las mismas, presentando dicho oligonucleótido 100 ó menos nucleótidos.
2. Oligonucleótido según la reivindicación 1, que comprende un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 y complementos de las mismas, presentando dicho oligonucleótido 100 ó menos nucleótidos.
3. Oligonucleótido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido comprende una sonda de ácidos nucleicos o un cebador de ácidos nucleicos.
4. Oligonucleótido según la reivindicación 1 ó 2, en el que el oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido modificado.
5. Oligonucleótido según la reivindicación 1 ó 2, en el que el oligonucleótido comprende por lo menos un marcaje y/o por lo menos una fracción inhibidora.
6. Oligonucleótido según la reivindicación 1 ó 2, en el que el oligonucleótido presenta 40 ó menos nucleótidos.
7. Oligonucleótido según la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido de un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 y complementos de las mismas.
8. Método de detección de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra, comprendiendo el método:
 - (a) poner en contacto ácidos nucleicos de la muestra con por lo menos una primera pareja de cebadores de ácidos nucleicos que comprende por lo menos un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 y una variante sustancialmente idéntica de las mismas, en las que el variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a las SEC ID nº 3 a nº 27 a lo largo de la longitud completa de SEC ID nº 3 a nº 27 o a uno de los complementos de SEC ID nº 3 a nº 27, en por lo menos una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, y
 - (b) detectar los ácidos nucleicos y/o uno o más amplicones de los mismos de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos durante o después de (a), detectando de esta manera *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra.
9. Método según la reivindicación 8, en el que los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos comprenden por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 28 a nº 33.
10. Método según la reivindicación 8, en el que (a) comprende poner en contacto los ácidos nucleicos de la muestra con por lo menos una segunda pareja de cebadores de ácidos nucleicos que son por lo menos parcialmente complementarios a un ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*, y (b) comprende detectar uno o más amplicones adicionales de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos durante o después de (a), detectando de esta manera *Chlamydia trachomatis* en la muestra.
11. Método según la reivindicación 8, en el que por lo menos uno de los cebadores de ácidos nucleicos comprende un cebador de ácidos nucleicos modificado.
12. Método según la reivindicación 8, en el que por lo menos uno de los cebadores de ácidos nucleicos comprende por lo menos un marcaje.
13. Método según la reivindicación 12, en el que (b) comprende detectar una señal detectable producida por el marcaje, o amplificar una señal detectable producida por el marcaje para producir una señal amplificada y detectar la señal amplificada.
14. Método según la reivindicación 8, en el que (b) comprende realizar un seguimiento de la unión entre los amplicones y uno o más reactivos de detección de ácidos nucleicos que se unen detectablemente a un ácido nucleico con una secuencia que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, una variante sustancialmente idéntica de las mismas, en las que la variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a las SEC ID nº 1 ó 2, o un complemento de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, o la variante.
15. Método según la reivindicación 14, en el que por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprende un ácido nucleico que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 y una variante sustancialmente idéntica de las mismas, en las que el variante presenta una identidad de

secuencia de por lo menos 90% respecto a las SEC ID nº 3 a nº 27 a lo largo de la longitud completa de SEC ID nº 3 a nº 27 o a uno de los complementos de SEC ID nº 3 a nº 27.

5 16. Método según la reivindicación 14, en el que por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprende un oligonucleótido.

17. Método según la reivindicación 14, en el que por lo menos uno de los reactivos de detección de ácidos nucleicos comprende por lo menos un marcaje y/o por lo menos una fracción inhibidora.

10 18. Método para determinar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos de la muestra con por lo menos un oligonucleótido que presenta 100 ó menos nucleótidos, comprendiendo el oligonucleótido una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 y una variante sustancialmente idéntica de las mismas, en las que el variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a las SEC ID nº 3 a nº 27 a lo largo de la longitud completa de SEC ID nº 3 a nº 27 ó a uno de los complementos de SEC ID nº 3 a nº 27, y

(b) realizar un seguimiento de la unión entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos, y el oligonucleótido, en el que la unión detectable entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos, y el oligonucleótido, determina la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra.

19. Método según la reivindicación 18, en el que la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra es desconocida o no ha sido demostrada antes de (a).

25 20. Kit para detectar *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra, que comprende:

(a) por lo menos un oligonucleótido que presenta 100 ó menos nucleótidos, comprendiendo el oligonucleótido una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 3 a nº 27 y una variante sustancialmente idéntica de las mismas, en las que el variante presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a las SEC ID nº 3 a nº 27 a lo largo de la longitud completa de SEC ID nº 3 a nº 27 o a uno de los complementos de SEC ID nº 3 a nº 27,

y uno o más de:

(b) instrucciones para determinar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra mediante el seguimiento de la unión entre ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos de la muestra y el oligonucleótido, en las que la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra es desconocida o no ha sido demostrada, o

(c) por lo menos un recipiente para empaquetar por lo menos el oligonucleótido.

21. Kit según la reivindicación 20, que comprende además uno o más reactivos de detección de ácidos nucleicos que se unen detectablemente a un ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*.

22. Kit según la reivindicación 20, que comprende además por lo menos un enzima.

	130	140	150	160	Mayoria
121	G T T T C T G A C C G T C C C G G C C G T T T G A C G G C G C G T T C C T G C				NGDR9
1					1117
1					1120
1					6346
1					6359
1					6364

	170	180	190	200	Mayoria
161	C G C G T T G A T T C C T T C G C C G C G C G T T T G C G G C A A G C A T C T				NGDR9
1					1117
1					1120
1					6346
1					6359
1					6364

Cebador cadena arriba DK101 →

Fig. 1 Cont.

	A A A G C T G T A T C T C T C A C G A G G T C G C C G A A T T T A A A T T G A T	Mayoría
	290 300 310 320	
281	A A A G C T G T A T C T C T C A C G A G G T C G C C G A A T T T A A A T T G A T	NGDR9
64		1117
57		1120
82		6346
87		6359
87		6364
	A G T T C A T G T C T T G T T C C A T T A A T A T C A A A C G C A A T C T T C A	Mayoría
	330 340 350 360	
321	A G T T C A T G T C T T G T T C C A T T A A T A T C A A A C G C A A T C T T C A	NGDR9
104		1117
87		1120
122		6346
127		6359
127		6364
	A A C A C C T C A A T T A C A T T T T T T A A A T C G C T A A T A C C A T A A T	Mayoría
	370 380 390 400	
361	A A C A C C T C A A T T A C A T T T T T T A A A T C G C T A A T A C C A T A A T	NGDR9
144		1117
137		1120
162		6346
167		6359
167		6364

Fig. 1 Cont.

641	C A T C T T C G C G C C T G C T A C T T G C C G A C C G C T T T C A A T C G C	Mayoría
370	650	680
375		
400		
405		
405		
681	T T T T C T G A T G G C G G T T T T G T C C G G T T C G G T T T T G A C G G C C	Mayoría
370	690	720
375		
400		
405		
405		

Fig. 1 Cont.

721	T C A C G C A T A A A T T C G G C G G G A T T T G T G C T T C G T C T A A G A	NGDR9	1117
370			1120
375			6346
400			6359
405			6364
405			
761	T C A C G A C G G C T T C G G A T T T G C G G A A C G A G G C T T T A A A G T	NGDR9	1117
370			1120
375			6346
400			6359
405			6364
405			
801	G C C G T C	NGDR9	1117
370			1120
375			6346
400			6359
405			6364
405			

Fig. 1 Cont.

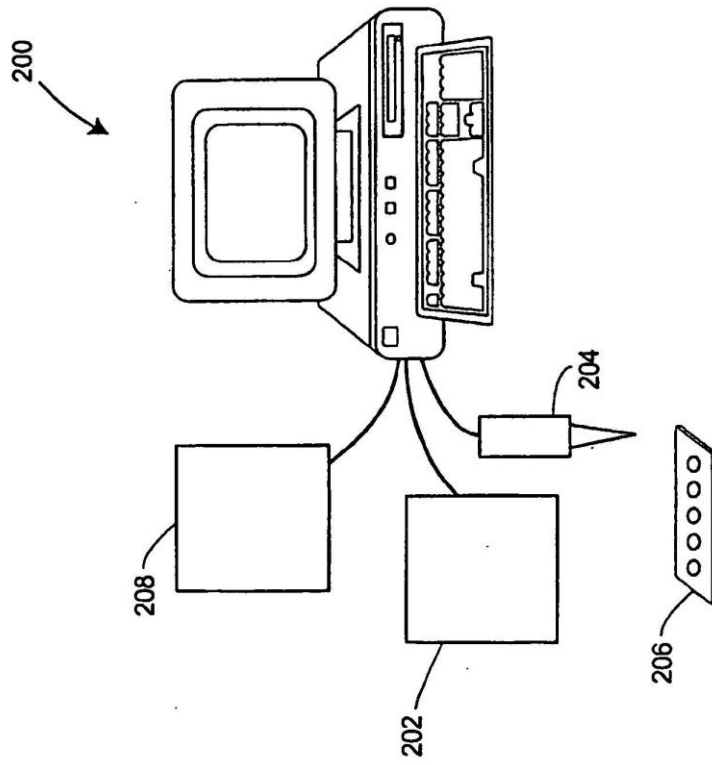


Fig. 2

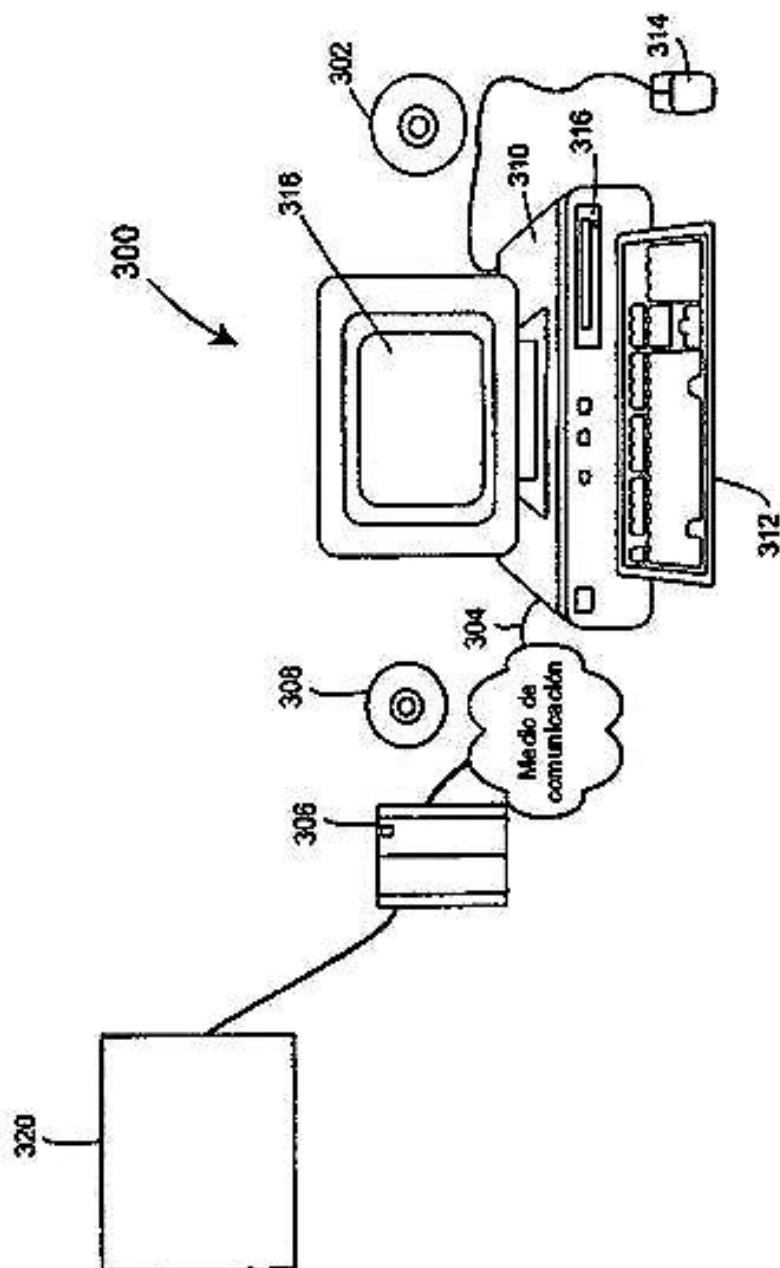


Fig. 3

```

1 1 - - - - - C A T G T G G A T G C G C A G G C G G C C T G C C A T C C A T G C C G C C A G C C G C C A - - - - - Direct 9
3401 C A T G T G G A T G C G C A G G C G G C C T G C C A T C C A T G C C G C C A G C C G C C A AE 014469 Brucella

1 1 - - - - - G A G G C A G G T G A T G A G G A A A A C A G C C A G A A T G A C G G T T C T T C G T A G A G A - - - - - Direct 9
3451 G A G G C A G G T G A T G A G G A A A A C A G C C A G A A T G A C G G T T C T T C G T A G A G A AE 014469 Brucella

1 1 - - - - - A T A C C C T G C A T G T T T T C T C C T A A T G C C T T C C G C C T T C G A G A T A A G C C G C - - - - - Direct 9
3501 A T A C C C T G C A T G T T T T C T C C T A A T G C C T T C C G C C T T C G A G A T A A G C C G C AE 014469 Brucella

1 1 - - - - - A C G C A C T T C C G G G T C G G A C A A A G T T C A C G T C C G A A C C A C T C A T C G T G A - - - - - Direct 9
3551 A C G C A C T T C C G G G T C G G A C A A A G T T C A C G T C C G A A C C A C T C A T C G T G A AE 014469 Brucella

1 1 - - - - - T T G A T C C G T T G A C C A T C A C A T A G C C G C G T C G G C A A G C T T C A G C G C A C C G - - - - - Direct 9
3601 T T G A T C C G T T G A C C A T C A C A T A G C C G C G T C G G C A A G C T T C A G C G C A C C G AE 014469 Brucella

1 1 - - - - - A A T G C G T T C T G T T C G A C G G G A A T A C C G T C A A A C C C T G T G T G C G G T T C A A - - - - - Direct 9
3651 A A T G C G T T C T G T T C G A C G G G A A T A C C G T C A A A C C C T G T G T G C G G T T C A A AE 014469 Brucella

1 1 - - - - - T T C C T T G A T G G C C T C G A A G A T C T G C T T C A C G A T C A G C G G C G C A A G A C C C A - - - - - Direct 9
3701 T T C C T T G A T G G C C T C G A A G A T C T G C T T C A C G A T C A G C G G C G C A A G A C C C A AE 014469 Brucella

* NG Direct Repeat 9 Start ->
1 1 - - - - - G T G A C G G C T C A T C G A G A A G C A G G A G C T T . G . A . . . G C . . . C . G C G . . . G . - - - - - Direct 9
3751 G T G A C G G C T C A T C G A G A A G C A G G A G C T T . G . A . . . G C . . . C . G C G . . . G . AE 014469 Brucella

23 1 - - - - - C A . T . . . C A G C A . C T . C T G . T . . C G G . . . C G A A . . . G T . C . G C . G C G . T . - - - - - Direct 9
3801 . C A . T . . . C A G C A . C T . C T G . T . . C G G . . . C G A A . . . G T . C . G C . G C G . T . AE 014469 Brucella

67 1 - - - - - G G C G A T G T T T T C T T T T T G C G C T T T T G A C C G G C G G A C A G C C G G T T C C G G T - - - - - Direct 9
3851 . T T . . . A C G C . . C . . C A . A C G C G G A . . A . A T . . A . . . T . A . C . . T A C . . - - - - - AE 014469 Brucella

117 1 - - - - - T T C A T C G A . . T A . . G . . . T T A . . G A . . . T C . . . C C C A T . T . G A G . . . T - - - - - Direct 9
3901 . T T C A T C G A . . T A . . G . . . T T A . . G A . . . T C . . . C C C A T . T . G A G . . . T AE 014469 Brucella

Upstream primer OK101 ->
157 1 - - - - - C T G C C . . . G C G T T G A T T C C T T C G C C G C G C G T T T G C G C G C A A G C A - - - - - Direct 9
3951 T C C A G A A . C . T . A T . . . C G . G A A G A . G . . A . . G C . T . C C . . . A . T G C G C AE 014469 Brucella

198 1 - - - - - I C I G T T T T G C C G T C G G T T T T G T T G C T A C T G T T T G C A T T T T G T T T T C T C G A - - - - - Direct 9
4001 A A . A C G . A . . T T C G C A A . C . C G . . . G G . G . C A . . G . G G . A A . G . C . . T . . - - - - - AE 014469 Brucella

```

Fig. 4

Fig. 4 Cont.

←Parada repetición directa-9 de NG*

768	GGCTTCGGATTTCGGGA--ACGAAGCTTTTAAAGTGGCGTC	Direct 9	Bruceella
4598	ATTAA...CC...CCCGG...CACT...CGGGCC...CG...AAGCGGGG	AE 014469	Bruceella
806			
4848	CCTTGGCCGGAAGCAAGCCTCTCGCCCTTTTCTTCGGCAACGGCTTCCTCG	Direct 9	Bruceella
806			
4698	GCAGCTGGCTCGCAATCAGATCCGGCCGATCTTCGACACCGGGCTTGTCTC	Direct 9	Bruceella
806			
4748	GGCCCTTCGATCAGGTCGGCAATCTCTCGTCAATCGACACCCAGATAGG	Direct 9	Bruceella
806			
4798	CAGCAATAACACCGCGGATCGTTCTTGAACCTCTTCGGGCGCGCCATCGGA	Direct 9	Bruceella
808			
4848	ATTTTCGTTCCATATTCCAGCACGATCACATGGTCGGAGATTTCATATAC	Direct 9	Bruceella
806			
4898	CACGACATGTCTATGTCTGATGACAGATCGACGTGCCCTCTCTTGC	Direct 9	Bruceella
806			
4948	GGATATCGAGCAAAAGCGTGTTCAAGCTCTGGCGATTCAAGCGGGTTGAGG	Direct 9	Bruceella
806			
4998	CCAGCGCGCGCTCGTCGAGGCAAGABATTTCGGGGTCTGGACATGGC	Direct 9	Bruceella
806			
5048	GGGGGCAATTTCAGACCGCGCTGGTCCCATAGGAAAGTGGCCCGCC	Direct 9	Bruceella
806			
5098	GATCATCAGCGCGCGATCAGATTGATCTTTTCAGCCAGAGCGCGCC	Direct 9	Bruceella
808			
5148	TTCTCGATGGCTTGCCTTCGGCGCGCTCTTGTAGCCCGGCAATCCGAGAG	Direct 9	Bruceella
808			
5198	ACCGAGGATCGTGTAACTGAAAGGCGCATCAGTGTGTGTGCTGCGCA	Direct 9	Bruceella
806			
5248	CCAQCAQGTTTTCCAGAACGGTAAAGGCCCGAAAGAGCGGATGTCTCG	Direct 9	Bruceella

Fig. 4 Cont.

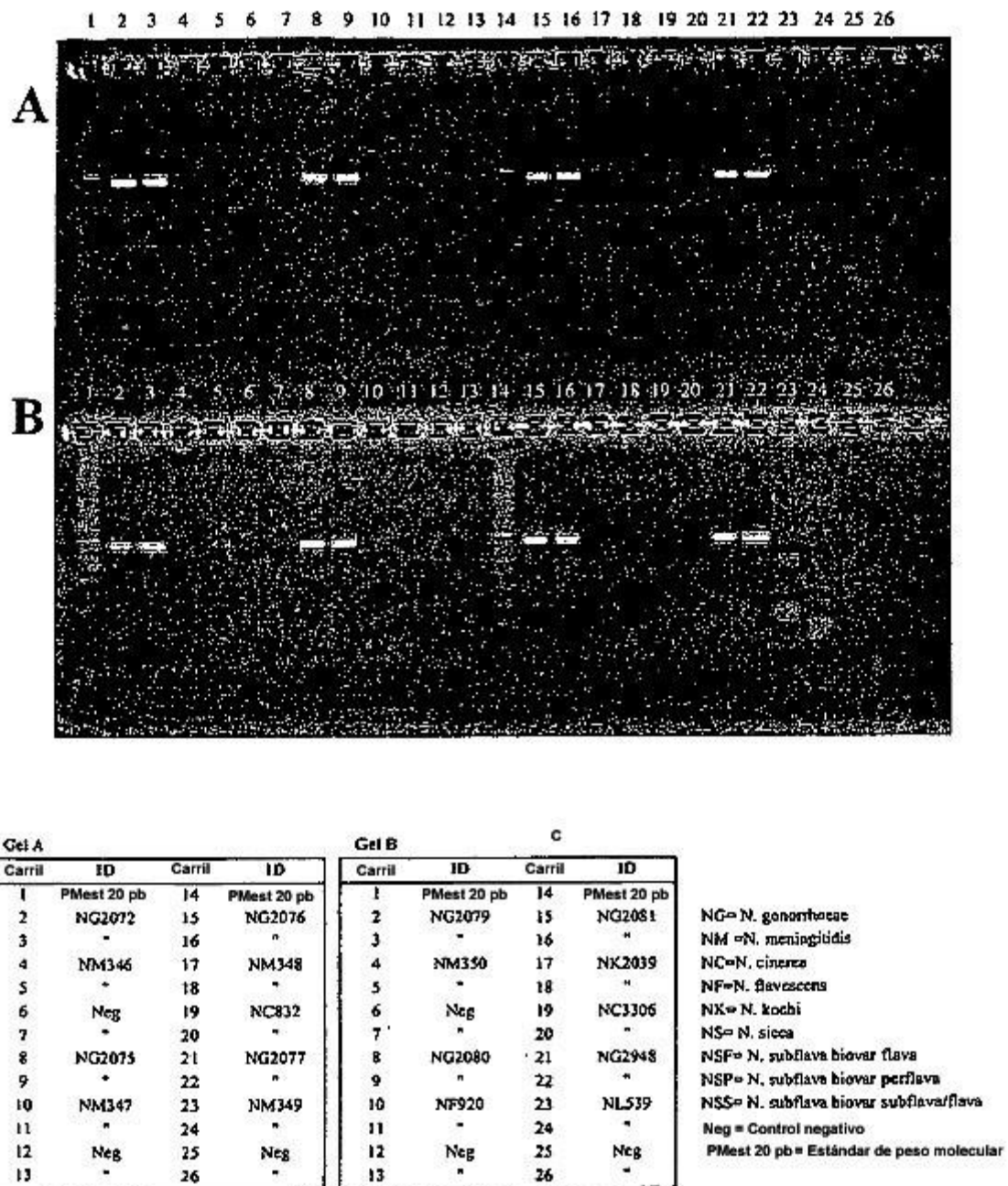


Fig. 5

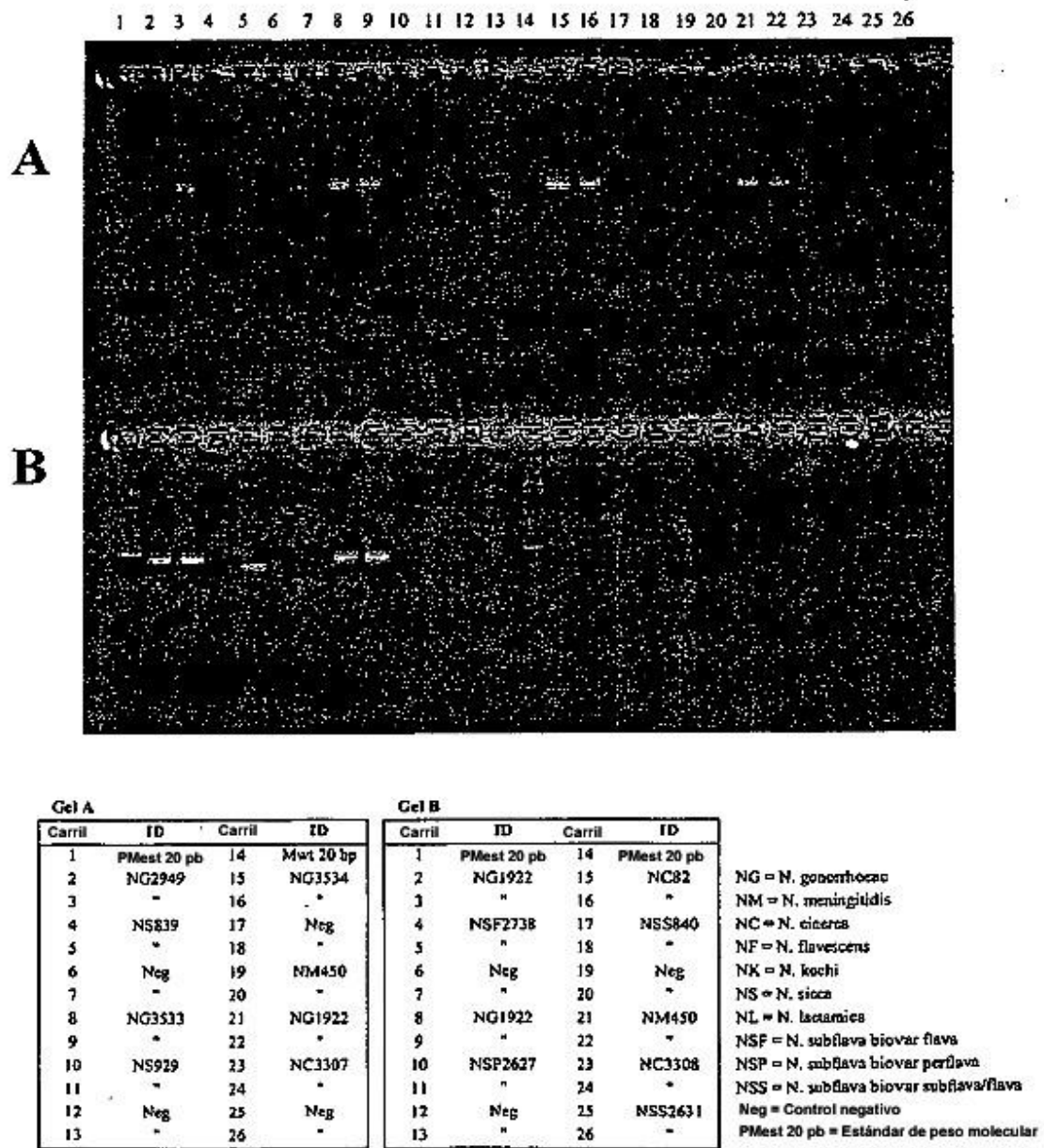
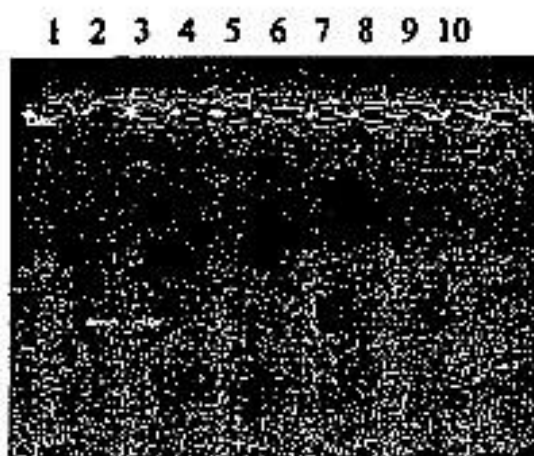


Fig. 6



Lane	ID
1	PMest 20 pb
2	NG2072
3	"
4	NM450
5	"
6	LP 5700
7	"
8	Neg
9	"
10	PMest 20 pb

NG = *N. gonorrhoeae*

NM = *N. meningitidis*

LP = *L. pneumophila*

Neg = Control negativo

PMest = Estándar de peso molecular

Fig. 7

Fig. 8

Direct 33	C G G A T A C T G C C T G G G C A A A A G C	54
AE002435	 G . G C . . G T G . . . A T T G G G T T C . . G G . A . T .	5279
Cebador NG613 →		
Direct 33	G T C A T C A G G G A C T G G T A T C G C G C C A A A G C C T G G T C A A T G	93
AE002435	. . A G A T G . C . . . T C G G G . . T T T T C . G . T T C C A . T G C C . C	5319
Cebador NG614 ←		
Direct 33	. . . T C G G G T T T G A C G A A A C T C G A A G C C C C G C A T A C G G C T	130
AE002435	G C T . G . . C . . A G T G T . . A . . A G . . T . C T T C T .	5359
Direct 33	G C A T : C G C G G T C A A A C G C G C C G G G C G G C G G A C A C G T G T	169
AE002435	C G G . G . . . C G T G T . G A T A A . T T C C G C . . C A T .	5398
Direct 33	T C T T C G T T G T C G G C A A A G A C G C G G A A G G C A G A A T C . T T G G	208
AE002435	G T . . G . C G A . A A A T T G . . . A T C A G C A . . G A . . . A A . C . A	5438
Direct 33	G C T T G G G C G G C . A A T C A G G G C . . A A T A T G G T A T C C A T C A T	245
AE002435	A . C A . T . A A . . C G . C G . . . G G . . . C . C C . A . A G G . T G	5478
Direct 33	C C C G T T T G A C C C T G C G G A C A T T G A C G G C T A C T T C T G G C C G	285
AE002435	 G C C G C T G T . C . C . A A A . C . C . A A	5516
Direct 33	T C C A A - G C T G A T T G G C G G C A A A G C C G T G C C T T C G T C C C C C	324
AE002435	A A . . . T . T . . . A C G A C . . . A . A . C . A T A . T . G T A G . .	5556
Cebador cadena abajo NG614		
Direct 33	G C C G A A G G G C G T T A C C G G T T G T C G G A C G T T G C C . . . G C C	360
AE002435	A A A . C A . A A A A T T . . T . . C A T . . . C . T T T T . G T	5596
Direct 33	A C G G C G A A A C A G G G C G C G G C G A . . G G C G T A A A T	392
AE002435	. G . . T . T G . T G T T T T G . A A T T T T . . . G . . T T . T . C C . . A	5636
Direct 33	G A T T G G G C T T T G C T G A A A A T T G G A A G C G G C . T G C	427
AE002435	A G . . . C C . G C . . . T G A . T A T C . G . C . C . . C . A A G . T A . .	5676

Fig. 8 Cont.

Direct 33	T T A T - - T T T G T C C G C A A - T C G C G T T C T T C G C C G T T - - - T	460
AE002435	A A . A C A C T T A . G . . A G . T . G T . . A . . . G G T T .	5716
Direct 33	C T T G G C A G C T G G A C A G G G C G G C G C A A T A C C G T C G C G G A T A	500
AE002435	T . G A A . T A T . . T G . C A A . . C . T . T . G A . T . . A A A C C . . C	5756
Direct 33	C G G T G C G G C G G T G T C G G - A G G T T T C - - - G G A A C G C C T C A -	535
AE002435	T . T . T G A T T C C A . A A A C . C A A A A . . . T . A . T . . . T	5796
Direct 33	- A A G C C G C C G C G G T C G A A C A C G C C G A A C A C G C C C - - - - -	568
AE002435	G . . A G . A T T A . T T . T A G G . G G . G . . G G . A A A G G C	5836
Direct 33	- - - - - G C A A A T C G T C - - C G C C G C G T A T C A G G - - - C G C	595
AE002435	A C T C A G G C T . . A . . A C A T C G G C A T T C . . .	5876
Direct 33	A A A - - - - - G C G G C G C G C - - - - - G A G A A A A G A	620
AE002435	. . . T C T C T A C C A . A T . . T C C G T G C C . C . A T T . . G . C	5916
Direct 33	A A G G T G C G C T - - - A T G T G C A A A C G C T T A A A T C A T T G A -	656
AE002435	. G . C A C . . C . . T G G G . T . . G . . G . . A A A C	5956
Direct 33	A A A C C T G T G T A C C G C A A T G C C T G T T T T G A T G C T G A C G G C	696
AE002435	G . . G G . G . C T . G G T . . G - C . A . G A C A . C A T . A T C . G . A T G	5995
Direct 33	G T G C G C G A A C T C A A C G C C - - - G C C G T T G A C G A C G G C G G T T	733
AE002435	. . C A A G . . T . . . G C A A . A . . A C T G . A . A A	6035
Direct 33	A A G C C G C C C G C C G A T T T G G T G C G - G C C C T G C C C G A A A C T G	772
AE002435	T C - T T . T T T . A . . G . . . C C C . . . C A . A T . . G . A C . . G . C .	6074
Direct 33	C C G C A C C - - T T G A A G G G A A C A C G G G C G C G G A C G T G C T G C C	810
AE002435	A A . . G A T G G C A G G . G T . . A T T T . . . T . C A G . C G T	6114

Fig. 8 Cont.

Direct 33	G T G G C C C T G A A G G C G G C C G G T A T G T A T A A C G A C T G C A G G	850
AE002435	T G A A A T . G A T G T . C . T . A . A . C G . . A T . G T . . . C . . . T .	6154
Direct 33	G C G C G C A C G G C C G C . . . T G G . . . T A C G G G C G T . . . T G G G C	883
AE002435	A G C G . C . G . C . . . T . . . A T T . . . C T . C . . . C . . . A C . T A C .	6194
Direct 33	G C G G A T T G A G T T G T C A A C G G G A A G T T T G C A A	914
AE002435	A . . T T A C C T A C A A C . C G . . C A G A A G G C A A A G A . G .	6234
Direct 33	C C G A A C C G T C G G T T C C G G G T T G G C G G C C G C A T C	947
AE002435	. G T G . . . A A G A T T T . A . T . A . C G C . A . . A . G A . . A A	6274
Direct 33	G G G G A A G T G T C G G C A T T C C C C G C G A T T T T T A C A T . A T C	986
AE002435	. A A . A . . C C . . G A A A . A A . G . . T T . C C G . . . A C . . C G . G .	6314
Direct 33	G G C G G A C G C G G C A A A T T T T T G C C G T T T T G T T T G	1020
AE002435	A A A . C . . A . T T T T . . . T C G A . A . C A A A C . G . A A G .	6354
Direct 33	C G C G A A G G G G C G T T A T A C A . . . A A A T T A T C A G G C G C A C C A .	1058
AE002435	. . A A C . C . C . C . T A A T C G . T G A C . . . A . C . A .	6394
Direct 33	A T A T G G G C G G A A A T G A A A A T G C C G T A C C G A T C C G	1093
AE002435	G C . G . A . A A G C C . T . A . . . G C C G . . . G . A T T . G G . G C . . T G .	6434
Direct 33	G A C A A C A C C G A T G C C G C A C C C T G C G G G C A G G C T T C	1129
AE002435	. C A . . T . . . A T C G A A A . G . T A	6473
← Repetición directa 33 Parada*		
Direct 33	G C A C T C T G A A A G G	1142
AE002435	 A C A G A A A A T C A G G T T T T C A G A C G A C C T G T	6513

Fig. 8 Cont.

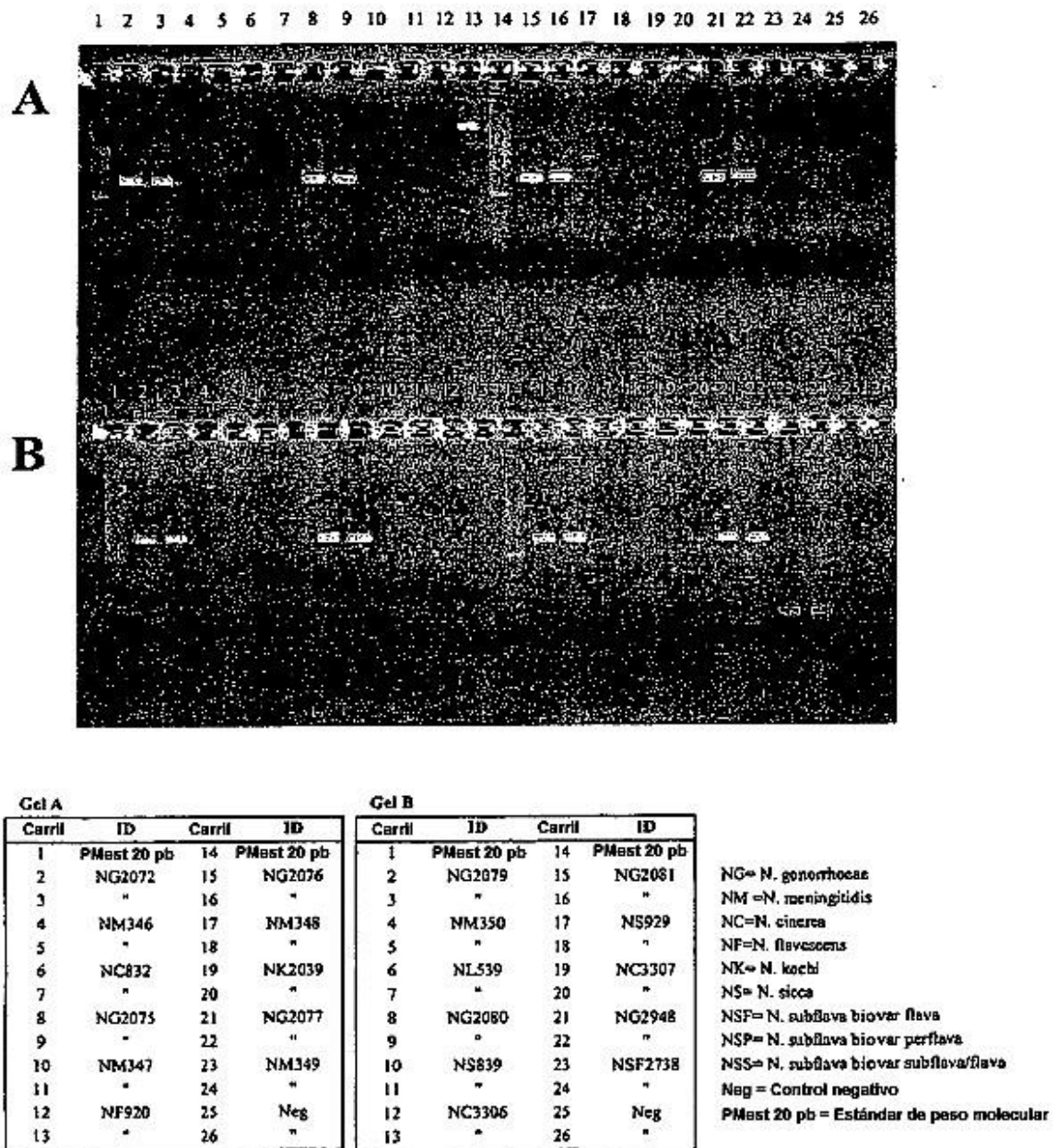
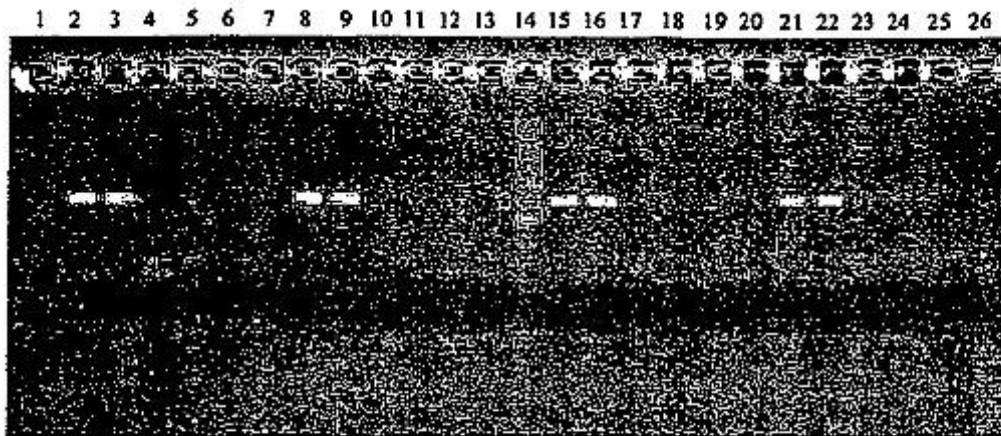


Fig. 9



Gel C

Carril	ID	Carril	ID
1	PMest 20 pb	14	PMest 20 pb
2	NG2949	15	NG3534
3	"	16	"
4	NSP2627	17	NSS2631
5	"	18	"
6	NC3308	19	NM450
7	"	20	"
8	NG3533	21	NG1922
9	"	22	"
10	NSS840	23	NC82
11	"	24	"
12	Neg	25	Neg
13	"	26	"

NG= *N. gonorrhoeae*NM =*N. meningitidis*NC=*N. cinerea*NF=*N. flavescens*NK= *N. kochi*NS= *N. sicca*NSF= *N. subflava* biovar flavaNSP= *N. subflava* biovar perflavaNSS= *N. subflava* biovar subflava/flava

Neg = Control negativo

PMest 20 pb = Estándar de peso molecular

Fig. 10