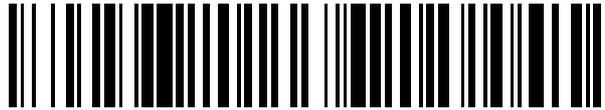


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 752**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2005 E 05102954 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 1586663**

54 Título: **Ensayo de Neisseria gonorrhoeae**

30 Prioridad:

**16.04.2004 US 825908**

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

**18.03.2015**

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)  
One Becton Drive  
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**HARRIS, JAMES M.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 531 752 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

Ensayo de *Neisseria gonorrhoeae*

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para la detección y/o cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae*.

**Antecedentes de la invención**

10 La gonorrea es la enfermedad contagiosa más prevalente de la que se tienen datos en Estados Unidos, con unos 2,5 millones de casos o más comunicados anualmente. Véase Tierney y col., *Current Medical Diagnosis and Treatment*, 37ª ed., 1998, Appleton & Lange. La gonorrea está provocada por *Neisseria gonorrhoeae*, una bacteria de tipo diplococos gram-negativa, que se encuentra típicamente dentro de células polimorfonucleares y su forma

15 la gonorrea puede extenderse dentro del útero y las trompas de Falopio, lo que tiene como consecuencia una enfermedad inflamatoria pélvica ("PID") y, de hecho, aproximadamente del 20 % al 40 % de PID y el 14 % de infertilidad tubárica pueden atribuirse a infecciones por gonococos. Véase Chan y col., 2000, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124:1649-1652.

20 El diagnóstico de laboratorio tradicional de gonorrea se realiza durante un cultivo durante la noche de exudados clínicos (por ejemplo, orina o exudado cervical) obtenidos del sujeto, seguido por identificación bioquímica y/o al microscopio de *Neisseria gonorrhoeae*.

25 Recientemente, se han usado extensamente ensayos de amplificación de ácidos nucleicos para la detección y/o el diagnóstico. Los ensayos de amplificación de ADN de *Neisseria gonorrhoeae* disponibles actualmente en el comercio incluyen PCR (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) y amplificación por desplazamiento de cadena (SDA; Becton Dickinson, Sparks, MD). Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* proporcionan herramientas útiles para la detección y el análisis de ácidos nucleicos, especialmente cuando los ácidos nucleicos

30 de tejido), aislamiento de genes y medicina forense (por ejemplo, ensayos forenses de detección de ácidos nucleicos específicos en investigación de delitos).

35 Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se clasifican tradicionalmente según los requerimientos de temperatura en el procedimiento de amplificación. Las amplificaciones isotérmicas se realizan a una temperatura constante, a diferencia de amplificaciones que requieren una alternancia entre ciclos de temperaturas altas y bajas. Los ejemplos de técnicas de amplificación isotérmicas son: Amplificación por desplazamiento de cadena (SDA; Walker y col., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396; Walker y col., 1992, *Nuc. Acids. Res.* 20:1691-1696; y el documento EP 0 497 272), replicación de secuencia autosostenida (3SR; Guatelli y col., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), el sistema de Q $\beta$  replicasa (Lizardi y col., 1988, *BioTechnology* 6:1197-1202), y las técnicas divulgadas en los documentos WO 90/10064 y WO 91/03573. Ejemplos de técnicas que requieren ciclos de

40 temperatura son: reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki y col., 1985, *Science* 230:1350-1354), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu y col., 1989, *Genomics* 4:560-569; Barringer y col., 1990, *Gene* 89:117-122; Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), amplificación basada en la transcripción (Kwoh y col., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177) y amplificación mediante restricción (patente de Estados Unidos N° 5.102.784).

45 Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos disponibles actualmente para *Neisseria gonorrhoea*, no obstante, carecen de mecanismos de control internos para determinar cualesquiera condiciones de reacción inhibitoras o errores humanos que tengan lugar en los ensayos y tiendan, por lo tanto, a proporcionar resultados negativos falsos. Por lo tanto, existe la necesidad de un ensayo que reduzca la posibilidad de obtener resultados negativos falsos.

50 La *Neisseria gonorrhoeae* comparte un alto grado de homología con otras especies de *Neisseria* estrechamente relacionadas. Por lo tanto, existe claramente la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos y oligonucleótidos que sean capaces de confirmar los resultados de ensayos existentes y/o aumentar la especificidad y/o la sensibilidad de un ensayo para detectar *Neisseria gonorrhoeae*.

55 La presente invención proporciona un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos dúplex que pueden usarse como alternativa al ensayo monoplex de *Neisseria gonorrhoeae* actuales (es decir, sin control de amplificación interno en la misma mezcla de reacción con una secuencia diana). La presente divulgación también proporciona oligonucleótidos que pueden usarse en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos tanto dúplex como monoplex diseñados para amplificar y/o detectar ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae*.

La mención o la discusión de una referencia en el presente documento no se construirán como la aceptación de que la misma es de la técnica anterior con respecto a la presente invención.

**Sumario de la invención**

5 La presente invención proporciona un procedimiento para detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia o la ausencia de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento: (a) en una muestra, amplificar la secuencia diana usando un primer cebador de amplificación que tiene una secuencia que consiste esencialmente en una secuencia de unión a diana de al menos una de SEC ID N° 1 o 2, en presencia de un cebador adaptador de SEC ID N° 5; y (b) detectar la secuencia diana amplificada. En el procedimiento anterior puede usarse un segundo cebador de amplificación que consiste esencialmente en la secuencia de unión a diana de cualquier cebador de amplificación que se divulgue en el presente documento.

10 La presente invención también proporciona un procedimiento para detectar una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* que comprende: (a) hibridar uno o más cebadores de amplificación que tienen una secuencia que consiste esencialmente en la secuencia de unión a diana de SEC ID N° 1 o 2 en presencia de un control de amplificación interno que consiste esencialmente en SEC ID N° 9 o 19 y un cebador adaptador que consiste en SEC ID N° 5, y amplificar dicho control de amplificación interno y (b) detectar al menos uno de dicho cebador de amplificación y dicho control de amplificación interno.

**Descripción detallada de la invención**

20 Cualesquiera definiciones proporcionadas son por motivos de claridad y no deberán considerarse como limitantes. A menos de que se indique, los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por parte de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

25 La presente invención se refiere a procedimientos y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos para la detección y/o cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae*. La presente divulgación proporciona uno o más oligonucleóticos que son complementarios o que se alinean a secuencias de ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae* para la amplificación y/o detección de dichas secuencias. La presente invención proporciona adicionalmente un control de amplificación interno (IAC) que puede usarse en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos de la invención para determinar si las condiciones de ensayo son permisibles para la amplificación y/o la detección de una secuencia diana. Los oligonucleóticos pueden usarse en todos los tipos de reacciones de amplificación tales como, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa, amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación mediada por QB replicasa.

30 Los procedimientos de la invención son particularmente ventajosos con respecto a los procedimientos tradicionales usados para la detección de gonorrea, ya que reducen los resultados negativos falsos mediante, por ejemplo, la inclusión de controles de amplificación internos.

35 La sensibilidad de un ensayo se refiere a la tolerancia a negativos falsos. Un resultado de ensayo es negativo falso si el ensayo es negativo pero la muestra contiene realmente la secuencia diana. Cuanto más pequeña sea la secuencia diana que puede detectar un ensayo, mayor será la sensibilidad que tenga el ensayo.

40 La especificidad de un ensayo se refiere a la tolerancia a positivos falsos. Un resultado de ensayo es positivo falso si el ensayo es positivo pero la muestra no contiene realmente la secuencia diana. De este modo, cuanto más específico sea un ensayo, tendrá niveles más bajos de positivos falsos.

Según la presente invención, el resultado de un ensayo para detectar *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra que usa un IAC puede interpretarse tal como se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1: Interpretación de un ensayo de SDA dúplex**

IAC	Resultado			
	+	-	+	-
Secuencia diana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	+	+	-
Presencia o ausencia de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ausencia	presencia	presencia	reacción inhibitoria, el ensayo debe realizarse de nuevo o modificarse

45 Según la presente invención, puede usarse un IAC en vez de, y/o además de, un control de amplificación (AC) convencional. Un experto en la técnica entiende que la reacción AC convencional se realiza en una mezcla de reacción separada de la muestra que se va a analizar. Una reacción AC convencional comprende reactivos de amplificación y ADN diana. Si la amplificación y/o la detección del ADN diana en la reacción AC se suprime, una

indicación de que la secuencia diana está ausente de una muestra de ensayo puede atribuirse a señales inhibitoras en la reacción. Aunque esta forma de reacción de control sea eficaz, no es la más deseable. Debido a que la reacción AC se realiza por separado, no puede reflejar con exactitud las condiciones de las reacciones que contienen la muestra de ensayo. Los procedimientos de la invención son particularmente útiles porque tienen un IAC y la reacción de control se realiza en condiciones espaciales y temporales idénticas a la amplificación y/o la detección de la secuencia diana, minimizando de este modo errores humanos.

La presente divulgación también proporciona cebadores de amplificación que se alinean a una secuencia diana (es decir, la secuencia de *Neisseria gonorrhoeae*) y/o a una secuencia de IAC. En algunas realizaciones de la invención puede usarse como cebador de amplificación un cebador de choque u oligonucleótido adaptador o su secuencia de unión a diana respectiva descrita en la tabla 2 o la tabla 3. En algunas realizaciones de la divulgación, se elige un cebador de amplificación a partir de cebadores de amplificación descrito en la tabla 2 o la tabla 3 tal como se divulga en el presente documento. En otras realizaciones de la divulgación, se elige un cebador de amplificación a partir de secuencias de unión a diana de cebadores de amplificación descritos en la tabla 2 o la tabla 3 tal como se divulga en el presente documento. En otra realización de la invención, los cebadores de amplificación comprende GCINT3-APL2 (SEC ID N° 1) y GCINT3-APR1 (SEC ID N° 2).

La presente divulgación proporciona además oligonucleótidos adaptadores y las sondas de detección que pueden usarse en un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae*. En algunas realizaciones de la divulgación, el oligonucleótido adaptador es un oligonucleótido monocatenario que comprende la SEC ID N° 5, 6, 18, 20 o 21. En otras realizaciones de la divulgación, la sonda de detección es un oligonucleótido monocatenario que comprende la SEC ID N° 7, 8, 22 o 23, y un par donador/desactivador fluorescente unido al oligonucleótido.

#### Procedimientos de amplificación

Los oligonucleótidos divulgados en el presente documento pueden usarse en cualquier procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos conocido en la técnica.

Los procedimientos de amplificación incluye, pero sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"; véanse las patentes de Estados Unidos N° 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159 y 4.965.188), amplificación por desplazamiento de cadena ("SDA"; véase Walker y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:392 (1992); Walker y col., Nucl. Acids Res. 20:1691 (1992); y la patente de Estados Unidos N° 5.270.184), amplificación por desplazamiento de cadena termófilo ("tSDA"; véase el documento EP 0 684 315), replicación de secuencia autosostenida ("3SR"; véase Guatelli y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:1874-78 (1990)), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos ("NASBA"; véase la patente de Estados Unidos N° 5.130.238), sistema de Q $\beta$  replicasa (véase Lizardi y col., BioTechnology 6:1197 (1988)); reacción en cadena de la ligasa ("LCR"; véase la patente de Estados Unidos N° 5.427.930); amplificación por círculo rodante (véase Lizardi y col., Nat Genet 19:225-232 (1998)) y amplificación basada en transcripción (véase Kwoh y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:1173-77, 1989). Los cebadores de amplificación de la presente invención pueden usarse para llevar a cabo PCR, SDA o tSDA.

La SDA se realiza generalmente mediante la ruta siguiente. En primer lugar, se unen cebadores de amplificación a una secuencia diana o a un producto de extensión monocatenario desplazado que se ha polimerizado previamente. En segundo lugar, una polimerasa deficiente en 5'-3'-exonucleasa incorpora un  $\alpha$ -tiodeoxinucleósido trifosfato (" $\alpha$ -tio dNTP") en un producto de extensión. Si el  $\alpha$ -tio dNTP es  $\alpha$ -tio dCTP, por ejemplo, se incorpora en el producto de extensión en cualquier sitio que exista un residuo G complementario en la plantilla. La incorporación de un  $\alpha$ -tio dNTP en el producto de extensión en un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción crea un sitio hemimodificado, es decir, un sitio modificado solo en la cadena del producto de extensión. Una endonucleasa de restricción, después, mella el sitio de restricción bicatenario hemimodificado. Después, la endonucleasa de restricción causa la disociación desde el sitio de la mella. Finalmente, una polimerasa que es deficiente en actividad de 5'-3'-exonucleasa se extiende desde el extremo 3' de la mella y desplaza la cadena de ADN que se encuentra cadena abajo. El mellado, la extensión de cadena y el desplazamiento de cadena tienen lugar simultáneamente y en continuo debido a que la extensión desde la mella regenera otro sitio de restricción que puede mellarse. Cuando se usan un par de cebadores de amplificación que se hibridan cada uno a una de las dos cadenas de un dúplex bicatenario que comprende una secuencia diana, la amplificación es exponencial debido a que las cadenas tanto en sentido correcto como antisentido sirven como plantillas en cada ronda de amplificación. Cuando se usa un único cebador de amplificación, la amplificación es lineal debido a que solo una cadena sirve como plantilla para la extensión del cebador. Los ejemplos de endonucleasas de restricción que mellan sus sitios de reconocimiento bicatenarios cuando se incorpora un  $\alpha$ -tio dNTP y que son adecuados para la SDA incluyen *BsoB1*, *BsrI*, *BstNI*, *BsmAI*, *BstOI*, *BsII*, *AvaI*, *HincII* y *NciI*. La SDA se describe adicionalmente en las patentes de Estados Unidos N° 5.270.184, N° 5.455.166 y N° 5.648.211. Un ensayo de SDA puede ser una SDA tradicional (o convencional) (tal como se describe por Walker y col., PNAS (1992) 89:392-396, patentes de Estados Unidos N° 5.962.273, 5.712.124 y 5.744.311), una SDA termófila (tal como se describe por Walker y col., Nuc. Acids Res. (1992) 20:1691-1696, patentes de Estados Unidos N° 5.648.211 y 5.744.311) y una SDA termófila fluorescente a tiempo real homogénea (tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.379.888).

La contaminación cruzada con producción de amplificación que se produce a partir de reacciones de amplificación

previas en reactivos, dispositivos de pipeteo y superficies de laboratorio puede reducirse incorporando diversos residuos en productos de extensión. Por ejemplo, la timina puede sustituirse por 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato ("dU"), como se enseña en el documento EP 0 624 643. La extensión de dU que se incorpora a productos de amplificación se cataliza mediante uracilo-ADN-glicosilasa ("UDG"), que proporciona productos de amplificación que contienen dU incapaces de amplificación adicional. La UDG por sí misma puede desactivarse cuando continúa la amplificación de forma apropiada.

En el caso de la tSDA, los cebadores y sus secuencias diana se seleccionan preferentemente de modo que el contenido de su GC sea inferior al 70 % de la composición de nucleótidos totales para minimizar la estructura secundaria y las interacciones cebador-cebador que puedan limitar la eficacia de la amplificación de la diana. Un cebador de amplificación adecuado para tSDA comprende, en orden desde el extremo 3' de la sonda al extremo 5', una secuencia de unión a diana, un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una "cola". La secuencia de unión a diana se hibrida específicamente a una secuencia complementaria de un ácido nucleico diana. El sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción se reconoce por una endonucleasa de restricción que mella una cadena de un dúplex de ADN cuando el sitio de reconocimiento está hemimodificado, tal como se describe por Walker y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:392 (1992) and Walker y col., Nucl. Acids. Res. 20:1691 (1992). La cola de 5' funciona como un sitio de cebado de polimerasa cuando el resto del cebador de amplificación se mella y se desplaza durante la tSDA. La función de cebado de la cola sostiene la reacción de tSDA y permite la síntesis de múltiples amplicones a partir de una única molécula diana. La longitud y la secuencia de la región de cola puede variar, siempre que la cola permanezca hibridada a la diana después del mellado y que la cola no contenga secuencias que se hibridarán bien a la secuencia de unión a diana o a otros cebadores.

Algunos procedimientos de amplificación, tales como tSDA, usan un "cebador de choque" o "cebador externo" para desplazar productos de extensión de cebador. Un "cebador de choque" o "cebador externo" es un cebador usado para desplazar un cebador de amplificación y su producto de extensión en una reacción de amplificación. Un cebador de choque se alinea a una secuencia diana cadena arriba de un cebador de amplificación de modo que la extensión del cebador de choque desplace el cebador de amplificación y su producto de extensión cadena abajo. Los productos de extensión del cebador pueden desplazarse de modo alternativo mediante calor. Los cebadores de choque usados en reacciones de SDA y de tSDA no necesitan hibridarse específicamente a ácidos nucleicos de enterovirus. Más bien, los cebadores de choque se pueden hibridar a cualquier secuencia diana que se encuentre cadena arriba a partir de los cebadores de amplificación y que esté lo suficientemente cercana al sitio de unión del cebador de amplificación para desplazar el producto de extensión del cebador de amplificación después de la extensión del cebador de choque. Los desajustes entre la secuencia del cebador de choque y su secuencia diana no afectan generalmente a la eficacia de la amplificación, siempre que el cebador de choque se hibride todavía a su secuencia diana. Además, la especificidad del sistema de SDA para la amplificación de la secuencia diana con preferencia con respecto a otros ácidos nucleicos depende de la especificidad del cebador o los cebadores de choque para su hibridación al ácido nucleico diana. La especificidad del sistema de SDA para la secuencia diana se deriva de la fidelidad de hibridación de los cebadores y sondas SDA u oligonucleótidos usados para la detección de productos amplificados.

Cuando una reacción de amplificación usada según la invención es una reacción de tSDA, las polimerasas que pueden usarse incluyen exo-Vent (New England Biolabs), exo-Deep Vent (New England Biolabs), Bst (BioRad), exo-Pfu (Stratagene), Bca (Panvera) y Sequencing Grade Taq (Promega). Pueden identificarse rutinariamente otras usando el ensayo de extensión anterior. Las polimerasas Tth (Boehringer), Tfi (Epicentre), REPLINASE (DuPont) y REPLITHERM (Epicentre) son capaces de desplazar una cadena desde una mella, pero también tienen actividad de 5'-3'-exonucleasa. Estas polimerasas son útiles en los procedimientos de la invención después de eliminar la actividad de exonucleasa, por ejemplo mediante ingeniería genética. Como la termoestabilidad de endonucleasas de restricción termófilas está limitada, en general, a menos de 65 °C, las polimerasas termófilas con actividad óptica aproximadamente a esta temperatura o a una inferior (por ejemplo, Bst y Bca) son más compatibles con endonucleasas de restricción termófilas en la reacción.

Los componentes de la presente invención pueden optimizarse a una forma en la que cada componente podría secarse y rehidratarse cuando se necesitara usando cualquier técnica conocida en la técnica. (véase Little y col., Clinical Chemistry 45(6):777-784 (1999)).

#### Diseño del cebador

Un "cebador de amplificación" es un oligonucleótido para la amplificación de una secuencia diana por extensión del oligonucleótido después de hibridación a una secuencia diana o mediante unión de múltiples oligonucleótidos que son adyacentes cuando se hibridan a la secuencia diana. Al menos una porción del cebador de amplificación se hibrida a la secuencia diana. Esta porción se denomina la secuencia de unión a diana y determina la especificidad por la diana del cebador. Debe entenderse que las secuencias de unión a diana ejemplificadas en la presente invención también pueden usarse en una diversidad de otras formas de detección de *Neisseria gonorrhoea*. Por ejemplo, las secuencias de unión a diana divulgadas en el presente documento pueden usarse alternativamente como sondas de hibridación para la detección directa de *Neisseria gonorrhoeae*, bien sin amplificación previa o en un ensayo postamplificación. Dichos procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica y, típicamente, usan una marca detectable asociada a, o unida a, la secuencia de unión a diana para facilitar la detección de

hibridación.

El diseño de cebadores de amplificación puede optimizarse para cada procedimiento de amplificación. Como no se requieren secuencias y estructuras especiales para llevar a cabo la reacción de amplificación, los cebadores de amplificación para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden consistir solo en secuencias de unión a plantilla. No obstante, otras reacciones de amplificación requieren secuencias de nucleótidos especializados, además de la secuencia de unión a diana, para que la reacción se realice. Por ejemplo, un cebador de amplificación para su uso en un ensayo de SDA comprende adicionalmente un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción 5' a la secuencia de unión a diana (véanse las patentes de Estados Unidos 5.455.166 y 5.270.184). El cebador de amplificación puede comprender también un grupo 3'-OH, que se puede extender mediante ADN polimerasa cuando la secuencia de unión a plantilla del cebador de amplificación está alineada con la secuencia diana. Los cebadores de amplificación para la replicación de secuencia autosostenida (3SR) y el ensayo basado en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), por el contrario, comprenden un promotor de ARN polimerasa cerca del extremo 5'. (Los ensayos de 3SR se describen en Guatelli y col., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878). El promotor se añade a la secuencia de unión a diana y sirve para realizar la reacción de amplificación dirigiendo la transcripción de múltiples copias de ARN de la plantilla. Dichas secuencias adicionales a la secuencia de unión a diana que son necesarias para una reacción de amplificación particular son bien conocidas en la técnica, un promotor reconocido por ARN polimerasa para ensayos de replicación autosostenida.

En el diseño de los cebadores de amplificación y los cebadores de choque de la presente invención, deben tenerse en cuenta los problemas generales conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando una secuencia diana que comprende un número elevado de repeticiones GC y AT se usa para diseñar un cebador, debe tenerse en cuenta minimizar potenciales interacciones de dímeros para evitar la autohibridación de cebadores. Los cebadores que pueden formar cuatro enlaces consecutivos o más consigo mismo, u ocho enlaces intercatenarios o más con otros cebadores deberían, en general, evitarse. Los cebadores que pueden formar dímeros 3' deberían evitarse especialmente, debido a que la hibridación en los extremos 3' del cebador, incluso transitoriamente, provocará la extensión del cebador debido a la acción de la polimerasa y destruirá el cebador. Determinados programas informáticos (por ejemplo, Oligo™, National Biosciences, Inc., Plymouth, Minn) pueden usarse en el diseño de los cebadores para evitar los problemas. Las combinaciones de cebadores también se criban para unas condiciones óptimas.

Como se sabe en la técnica, la alineación o hibridación de secuencias de ácidos nucleicos complementarias y parcialmente complementarias también puede obtenerse ajustando las condiciones de reacción para aumentar o disminuir la astringencia (por ejemplo, ajustando la temperatura o el contenido de sal del tampón). Dichas modificaciones de las secuencias divulgadas y cualesquiera ajustes necesarios de condiciones están abarcados por la presente invención. La información con respecto a las condiciones del tampón pueden encontrarse en Experimental Design in Biotechnology por Dr. Perry Haaland (Marcell Dekker, NY, 1989).

En una reacción de amplificación dúplex, un cebador de amplificación se diseña para que sea capaz de hibridarse tanto a una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* como a una secuencia de IAC y amplificar la secuencia a la que se hibrida. Esto se logra usando una secuencia de ácidos nucleicos compartida entre la secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* y la secuencia de IAC para diseñar un cebador de amplificación. Otras secuencias, según se requieran para la realización de una reacción de amplificación seleccionada, pueden añadirse opcionalmente a un cebador de amplificación tal como se divulga en el presente documento.

A modo de ejemplo, pero no de limitación, los cebadores de amplificación para su uso en un ensayo de SDA comprenden generalmente secuencias de unión a plantilla 3', un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción que puede mellarse 5' a una secuencia de unión a plantilla, y una secuencia de cola de aproximadamente 10-25 nucleótidos de longitud 5' al sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. Dicho cebador de amplificación puede contener un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *BsoBI*, que se mella durante la reacción de SDA. Será evidente para un experto en la técnica que pueden sustituirse otros sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción que puede mellarse por el sitio de reconocimiento de *BsoBI*. El cebador de amplificación puede contener también una secuencia de cola (5' al sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción). La secuencia de cola no debería contener el sitio de restricción usado para la SDA y secuencias que se alinearán bien a su propia secuencia de unión a diana o a los otros cebadores (por ejemplo, cebadores de choque).

En algunas realizaciones, se usa un par de cebadores de amplificación, cada uno de los cuales se alinea a una de las dos cadenas de una secuencia diana bicatenaria o secuencia de IAC. En este caso, la amplificación es exponencial debido a que las cadenas tanto en sentido correcto como antisentido sirven como plantillas para el cebador opuesto en rondas de amplificación subsiguientes. Cuando se usa un único cebador de amplificación, la amplificación es lineal debido a que solo una cadena sirve como plantilla para la extensión del cebador.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación abarcan un cebador de amplificación que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEC ID N° 1, 2, 10, 11, 12, 13 o sus secuencias de unión a diana respectivas. En otras realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación abarcan al menos dos cebadores de amplificación, comprendiendo el primer cebador de amplificación una secuencia

de nucleótidos que consiste esencialmente en SEC ID N° 1, 10, 11 o sus secuencias de unión a diana respectivas; y un segundo cebador de amplificación que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEC ID N° 2, 12, 13 o sus secuencias de unión a diana respectivas.

5 En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención abarcan uno o más cebadores de choque. Un cebador de choque es un cebador usado para desplazar un cebador de amplificación y su producto de extensión en una reacción de amplificación. Un cebador de choque se alinea a una secuencia diana cadena arriba de un cebador de amplificación de modo que la extensión del cebador de choque desplaza el cebador de amplificación y su producto de extensión cadena abajo. Un cebador de choque también puede funcionar como cebador de amplificación. En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención abarcan uno o más cebadores de choque. En determinadas realizaciones, el cebador de choque comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia que comprende SEC ID N° 3, 4, 14, 15, 16 o 17. En una realización, un cebador de choque comprende un oligonucleótido que tienen una secuencia parcial o completa de SEC ID N° 3, 4, 14, 15, 16 o 17. En otras realizaciones, los procedimientos de la presente invención abarcan al menos dos cebadores de choque, comprendiendo el primer cebador de choque una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en las SEC ID N° 3, 14, o 15, y un segundo cebador comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEC ID N° 4, 16 o 17.

#### Secuencias diana

"Diana" o "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae* que se va a amplificar y/o detectar. Una diana o secuencia diana incluye la secuencia de ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae* que se va a amplificar y cualquier segunda cadena complementaria. En algunas realizaciones, una secuencia diana puede ser monocatenaria o bicatenaria, en cuyo caso, pueden unirse bien una o bien ambas cadenas a un cebador de amplificación. Una diana o secuencia diana puede comprender también una secuencia de oligonucleótidos que se reconoce mediante un oligonucleótido adaptador (es decir, una secuencia de unión al adaptador).

25 Los cebadores de la presente invención se diseñan para alinearse a una región de ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae* ilustrado en la figura 1. (Véase la patente de Estados Unidos N° 5.962.273).

#### Control de amplificación interno

"Control de amplificación interno", "IAC" o "secuencia de IAC" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que se alinea a un cebador de amplificación y una secuencia que puede detectarse por separado a partir de la secuencia diana. Puede usarse cualquier procedimiento de detección en la técnica.

Según la presente invención, una secuencia de IAC se diseña para que comparta secuencias de ácido nucleico con una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae*, por lo que el mismo o los mismos cebadores de amplificación pueden amplificar tanto una secuencia de IAC como una secuencia diana si está presente en una muestra. Una secuencia de IAC se diseña también para que tenga algunas secuencias de ácidos nucleicos que difieran de una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae*, de modo que la detección de la secuencia IAC y de la secuencia diana puedan diferenciarse. Ya que la secuencia de IAC se amplifica y/o se detecta en la misma mezcla de reacción que una secuencia diana, los ensayos dúplex tienen la ventaja de detectar errores humanos o una condición de reacción inhibitoria, por ejemplo, la presencia de un inhibidor o la ausencia de un reactivo crítico. La presencia de un IAC en la misma reacción que la muestra que se va a analizar elimina la necesidad de reacción de control de amplificación por separado tal como se requiere para los ensayos de SDA monoplex actuales.

Aunque sin pretender quedar ligado a un mecanismo de acción particular, la presencia de un IAC en la misma reacción que la secuencia diana permite al ensayo de amplificación de la presente invención detectar la presencia de inhibidores de la reacción y/o condiciones que pueden indicar un resultado negativo falso. Tal como se usa en el presente documento, un resultado negativo falso se refiere a un resultado que indica que no hay detección de una secuencia diana, pero dicha indicación no es debida a la ausencia de la secuencia diana en la muestra, sino debida a un error humano o una condición de la reacción, por ejemplo la carencia de un elemento de reacción crítico, o la existencia de un inhibidor de la reacción o de un error en la realización del ensayo.

Se usa un procedimiento de detección en el que dicho procedimiento diferencia productos de amplificación de una secuencia diana de productos de amplificación de una secuencia de IAC. En una realización, los productos de amplificación de la secuencia diana y del IAC pueden detectarse mediante diferentes sondas de detección marcadas con colorante. En otra realización, se usa fluoresceína para detectar productos de amplificación de la secuencia diana y se usa fluorescencia de rodamina para detectar los productos de amplificación del IAC.

En algunas realizaciones, se diseña una secuencia de IAC de modo que uno de sus extremos 3' o 5' contenga una secuencia en común con una secuencia de ADN de *Neisseria gonorrhoeae*. En algunas realizaciones adicionales, se diseña un IAC de modo que ambos extremos 3' y 5' contengan secuencias en común con una secuencia de ADN de *Neisseria gonorrhoeae* para la unión a un cebador de amplificación.

La secuencia de IAC también se diseña para que comprenda una secuencia de ácido nucleico que es diferente de la

secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* que se va a amplificar, de modo que la detección de los productos de amplificación del IAC y de la secuencia diana pueden diferenciarse.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación usan un IAC que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la SEC ID N° 9 o 19.

#### 5 Detección de ácidos nucleicos

Los productos de amplificación generados usando uno o más cebadores de la invención pueden detectarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, los productos de amplificación incluyen tanto las secuencias diana amplificadas como las secuencias de IAC amplificadas. Los productos de amplificación pueden detectarse mediante hibridación a una sonda marcada usando técnicas convencionales, por ejemplo, una que se hibrida a ácidos nucleicos amplificados en una secuencia que se encuentra entre los cebadores de amplificación. Alternativamente, pueden detectarse productos de amplificación mediante su tamaño característico, por ejemplo mediante electroforesis seguida por tinción con bromuro de etidio para visualizar los ácidos nucleicos. En una alternativa adicional, se usa un cebador de amplificación marcado. En otra alternativa más, se extiende un cebador de amplificación marcado/sonda interna sobre la secuencia diana, tal como se describe por Walker y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:392 (1992); o Walker y col., Nucl. Acids Res. 20:1691 (1992). En otra realización, la detección se realiza directamente mediante hibridación y extensión de una sonda comunicadora marcada tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.928.869 y en la patente de Estados Unidos N° 5.958.700. Los procedimientos de detección también incluyen un procedimiento quimioluminiscente en el que los productos amplificados se detectan usando una sonda de captura biotinilada y una sonda detectora conjugada a enzima, tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.470.723. Después de la hibridación de estas dos sondas en diferentes sitios entre los dos sitios de unión a cebador de amplificación, el complejo se captura en una placa de microvaloración recubierta con estreptavidina, y la señal de quimioluminiscencia se desarrolla y se lee en un luminómetro.

En una realización de la presente invención, el procedimiento de detección debería detectar los productos de amplificación de la diana y del IAC y diferenciar entre los productos de amplificación detectados. Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica capaz de lograr este fin. Por ejemplo, los procedimientos de detección que se divulgan en Walker y col., Nucl. Acids Res., (1992) 20:1691-1696, las patentes de Estados Unidos N° 5.648.211, 5.962.273, 5.814.490, 5.928.869, 6.316.200 y la patente europea EP 0 678 582 pueden usarse según la presente invención. En otra realización se usan sondas universales y procedimientos de detección de ácidos nucleicos (véase la patente de Estados Unidos N° 6.379.888).

En una realización, el procedimiento de detección universal usa un oligonucleótido adaptador y una sonda de detección para la detección de una secuencia diana (una secuencia diana, una secuencia de IAC o productos de extensión de los mismos). El oligonucleótido adaptador comprende una secuencia de unión a diana 3' y una secuencia 5'. El complemento de la secuencia 5', producido por amplificación, se hibridará y se extenderá fuera de la sonda de detección. Dicha hibridación puede detectarse después como una indicación de una reacción de amplificación exitosa.

Pueden usarse al menos dos oligonucleótidos adaptadores diferentes para detectar simultáneamente diferentes secuencias dianas (por ejemplos, productos de amplificación de una secuencia diana y productos de amplificación de una secuencia de IAC). En este caso, la secuencia adaptadora 5' del oligonucleótido adaptador es diferente para cada plantilla que se va a detectar. Marcando las sondas de detección que indican la presencia de secuencia diana e IAC con diferentes marcas fluorescentes (por ejemplo, diferentes pares de colorante donador/desactivador), la presencia de cada una puede determinarse detectando cambios en la medida de desactivación de fluorescencia en cada una de las sondas de detección.

En algunas realizaciones, se usan oligonucleótidos adaptadores y sondas de detección para la detección de los productos de amplificación de un IAC y una secuencia diana. La porción de la secuencia de IAC que puede reconocerse por un oligonucleótido adaptador se diseña para que sea diferente de la porción de una secuencia diana que puede reconocerse por un oligonucleótido adaptador, es decir el oligonucleótido adaptador que reconoce la secuencia de IAC y el oligonucleótido adaptador que reconoce la secuencia diana tienen, entre otras cosas, diferentes secuencias de unión a plantilla. La especificidad de los oligonucleótidos adaptadores (con respecto a la secuencia IAC y la secuencia diana) da como resultado en último lugar la detección de diferentes productos de amplificación (de un IAC o de una secuencia diana) por medio de diferentes sondas de detección.

En una realización, pueden usarse múltiples oligonucleótidos adaptadores por cadena de plantilla si se desea, que se hibridan cada uno a la secuencia diana cadena abajo de la otra en la misma cadena, estando hibridados todos los oligonucleótidos adaptadores cadena abajo del cebador de amplificación. De este modo, cada oligonucleótido adaptador se desplaza por extensión del oligonucleótido adaptador cadena arriba y la mayor parte de los oligonucleótidos adaptadores 5' se desplazan por el cebador de amplificación. El uso de múltiples oligonucleótidos adaptadores tiene la ventaja de que se aumenta o se amplifica la señal generada por secuencia diana, con un aumento en la sensibilidad del ensayo.

Muchos colorantes donadores/desactivadores conocidos en la técnica son útiles en la presente invención. Estos incluyen, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC)/isocianato de tetrametilrodamina (TRITC), FITC/Texas Red.TM. (Molecular Probes), FITC/1-pirenobutirato de N-hidroxisuccinimidilo (PYB), FITC/isotiocianato de eosina (EITC), N-Docket 1-pirenobutirato de hidroxisuccinimidilo (PYS)/FITC, FITC/rodamina X y FITC/tetrametilrodamina (TAMRA). La selección de un par donador/desactivador no es crítica. Para mecanismos de desactivación de transferencia de energía es solo necesario que las longitudes de onda de emisión del fluoróforo donador se solapen a las longitudes de onda de excitación del desactivador, es decir, debe haber suficiente solapamiento espectral entre los dos colorantes para permitir una transferencia de energía, una transferencia de carga o una desactivación de fluorescencia eficientes. El ácido P-(dimetil-aminofenilazo)benzoico (DABCILLO) es un colorante desactivador no fluorescente que desactiva eficazmente la fluorescencia de un fluoróforo adyacente, por ejemplo fluoresceína o 5-(2'-aminoetil)-aminonaftaleno (EDANS). Cualquier par de colorantes que produce desactivación de fluorescencia en la sonda de detección de la invención puede usarse en los procedimientos de la invención, independientemente del mecanismo mediante el que tiene lugar la desactivación. Los procedimientos de marcado terminal e interno también son conocidos en la técnica y pueden usarse rutinariamente para unir los colorantes donador y desactivador en sus respectivos sitios a la sonda de detección.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación usan un oligonucleótido adaptador que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEC ID N° 5, 6, 18, 20 o 21.

La presente divulgación proporciona sondas de detección que son oligonucleóticos monocatenarios que comprenden SEC ID N° 7, 8, 22 o 23, y una marca. En determinadas realizaciones, la marca comprende al menos un par donador/desactivador fluorescente unido al oligonucleótido, en el que el resto fluorescente es rodamina, fluoresceína o dabcilo.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona SDA termófila (tSDA) fluorescente a tiempo real homogénea dúplex. La SDA termófila fluorescente a tiempo real homogénea es una tSDA modificada que detecta secuencias diana de ácido nucleico mediante mecanismos de desactivación de fluorescencia (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.379.888). Por ejemplo, en una realización, una sonda de detección puede comprender un par donador/aceptor fluorescente de modo que la desactivación de fluorescencia tenga lugar en ausencia de una secuencia diana. Aunque no se pretende involucrarse con ningún mecanismo de acción particular, en ausencia de hibridación de la sonda de detección a un segundo oligonucleótido (que se produce por amplificación de una secuencia diana), la sonda adopta una conformación que lleva al donador y al desactivador a una proximidad espacial cercana y da como resultado la desactivación de fluorescencia del donador. La sonda puede plegarse en una estructura secundaria ordenada (por ejemplo, un cuarteto G, horquilla o triple hélice), en un enrollado aleatorio o en cualquier otra conformación que lleve el donador y el desactivador a una proximidad lo suficientemente cercana como para producir desactivación de fluorescencia. No obstante, cuando la sonda de detección se hibrida a un segundo oligonucleótido, la estructura secundaria apareada a la base intramolecularmente de la sonda de detección se despliega y se vuelve lineal, lo que aumenta la distancia entre el donador y el desactivador y, por lo tanto, reduce o elimina la desactivación de fluorescencia. Alternativamente, la sonda de detección puede diseñarse como una sonda de detección lineal (es decir, no se pliega dando una estructura secundaria), en la que la distancia entre el donador y el desactivador es lo suficientemente corta como para producir desactivación de fluorescencia. En este caso (y opcionalmente en casos en los que se usa una sonda de detección no lineal descrita en el presente documento), la sonda de detección también contiene un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción (RERS) entre el par donador/desactivador fluorescente. El emparejamiento a la base intramolecular entre la sonda de detección y un segundo oligonucleótido proporciona el RERS bicatenario y, por lo tanto, puede escindirse y mellarse por una endonucleasa de restricción. Aunque sin pretender involucrarse con ningún mecanismo de acción particular, la escisión o el mellado por una endonucleasa de restricción separa el donador y el aceptor en fragmentos de ácidos nucleicos separados, lo que conduce a una desactivación reducida.

Puede realizarse un seguimiento de un cambio asociado en un parámetro fluorescente (por ejemplo, un aumento en la intensidad de fluorescencia del donador, una reducción en la intensidad de fluorescencia del aceptor o una relación de intensidades de fluorescencia del donador y/o el aceptor) según los procedimientos de la invención para detectar y/o realizar un seguimiento de la presencia de la secuencia diana. Realizar un seguimiento de un cambio en la intensidad de fluorescencia del donador es habitualmente preferente, ya que este cambio es típicamente superior al cambio en la intensidad de fluorescencia del aceptor. También puede realizarse un seguimiento de otros parámetros de fluorescencia tales como un cambio en el tiempo de vida de la fluorescencia según la presente invención.

#### Kits

La presente divulgación también proporciona kits para la amplificación y/o detección de ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae* que comprenden uno o más cebadores de amplificación que consisten esencialmente en SEC ID N° 1, 2, 10, 11, 12, 13 o sus respectivas secuencias de unión a diana y al menos un recipiente que contiene dichos cebadores. El kit puede incluir opcionalmente uno cualquiera o más de: un IAC, oligonucleótidos adaptadores o sondas de detección. El kit puede incluir adicionalmente otros componentes y reactivos para realizar una reacción de hibridación o amplificación, tal como una hibridación de Southern, hibridación por transferencia de puntos, PCR o SDA. Para la detección de hibridación, puede incluirse una solución apropiada para la realización de la hibridación,

- 5 por ejemplo, NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, SDS al 0,1 %. También pueden incluirse en el kit componentes para los procedimientos de detección, por ejemplo, una segunda sonda, una radiomarca, un sustrato enzimático y un anticuerpo. También pueden incluirse reactivos apropiados para su uso con un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos. Los componentes del kit se envasan conjuntamente en un recipiente común, que típicamente incluye instrucciones para realizar las realizaciones específicas seleccionadas de los procedimientos divulgados en el presente documento.

### **Ejemplos**

Los ejemplos no cubiertos por el ámbito de las reivindicaciones son con fines ilustrativos.

#### **Ejemplo 1: Diseño de un conjunto de cebadores SDA**

- 10 Una porción del genoma de *Neisseria gonorrhoeae* se ha secuenciado y caracterizado para que sea la diana mediante ensayos de amplificación (véase la patente de Estados Unidos N° 5.962.273). Para fines de este ensayo, se seleccionó para que sea la diana una porción del genoma de *Neisseria gonorrhoeae* que no había sido la diana previamente para ensayos de amplificación. Esta subregión del genoma de *Neisseria gonorrhoeae* se analizó en las bases de datos actuales GenBank y SeqWeb para determinar la especificidad por *Neisseria gonorrhoeae*.
- 15 Se diseñaron cebadores de amplificación para amplificar las secuencias diana de *Neisseria gonorrhoeae* y un IAC. Las múltiples versiones de los cebadores se diseñaron tal como se muestra en las tablas 2 y 3.

Tabla 2: Oligonucleótidos primarios de ensayos de SDA para la amplificación y/o la detección de *Neisseria gonorrhoeae*

<b>Oligonucleótidos</b>	
<b>Cebadores de amplificación:</b>	
GCINT3-APL2	5'CGTCTCCAGTCCAGACTTC7CGGGAAATCAAAAAGCGAATGCG3' (SEC ID N°: 1)
GCINT3-APR1	5'ACTACGTCGAATGCATGTCTCGGGACTTCTTCATCTTTTGC3' (SEC ID N°: 2)
<b>Cebadores de choque</b>	
GCINT3-BL2	5'CCGCAGCATACGCC3' (SEC ID N°: 3)
GCINT3-BR3	5'TGGGCATATGCTTTG3' (SEC ID N°: 4)
<b>Oligonucleótidos adaptadores:</b>	
GC3A-R1	5'AGTTAGCCACCATACTTGAGTGATGACGGTTTTTCATTGC3' (SEC ID N°: 5)
ICAdpt9	5'ACTGATCCGCCACTAACGACTGCTTTGCTAGTTGCCCTCAGACA T3' (SEC ID N°: 6)
GC3A-R2	5' ACTGATCCGCCACTAACGACTGTGTGATGACGGTTTTTCATTGC 3' (SEC ID N°: 20)
ICAdpt10	5' ACGTTAGCCACCATACTTGAGCTTTGCTAGTTGCCCTCAGACAT 3' (SEC ID N°: 21)
<b>Sondas de detección:</b>	
CTGCUinv3	5' (dabcilo)-TAGTGCCCGAGCAC ( rodamina )-TACGTTAGCCACC ATACTTGA3' (SEC ID N°: 7)
ICUinv4	5' (fluoresceína)-TAGCACCCGAGTGC (dabcilo)-TAACTGATCCGCA CTAACCGACT3' (SEC ID N°: 8)
MPC-DR	5' (dabcilo)-TCCCCGAGT-( rodamina )ACGTTAGCCACCATACT TGA 3' (SEC ID N°: 22)

(continuación)

<b>Sondas de detección:</b>	
MPC2-FD	5' ( fluoresceína)- <b>TCCCCGAG T</b> -( dabcilo ) <b>ACTGATCCGCACTAA CGACT 3'</b> (SEC ID N°: 23)
<b>IAC:</b>	
GC13-IAC4	5' <b>AATCAAAAGCGAATGCCGTATGTCTGTGAGGCAACTAGCAAAGCT GCAAAGATGAAGAAG3'</b> (SEC ID N°: 9)
Las secuencias de detección universales están en negrita y los sitios BsoB1 en itálica. El subrayado representa secuencias de unión a diana.	

Tabla 3: Oligonucleótidos adicionales de ensayos de SDA para la amplificación y/o la detección de *Neisseria gonorrhoeae*

Oligonucleótidos	Secuencias
<b>Cebadores de amplificación:</b>	
GCINT3-APL1	5' <u>CGTCTCCAGTCCAGACTTC</u> CGGGAATCAAAGCGGAATGC3' (SEC ID N°: 10)
GCINT3-APL3	5' <u>CGTCTACCGTCCAGACTTC</u> CGGGAATCAAAGCGGAATGC3' (SEC ID N°: 11)
GCINT3-APR2	5' <u>ACTACGTCGAATGCATGT</u> CTCGGGACTTCTTCATCTTTGCC3' (SEC ID N°: 12)
GCINT3-APR3	5' <u>ACTACGTCGAATGCATGT</u> CTCGGGAGCTTCTTCATCTTTGCC3' (SEC ID N°: 13)
<b>Cebadores de choque:</b>	
GCINT3-BL1	5' <u>CCGCAGCATACG3'</u> (SEC ID N°: 14)
GCINT3-BL3	5' <u>CCGCAGCATACGCG3'</u> (SEC ID N°: 15)
GCINT3-BR1	5' <u>TTGGGCATATGCTT3'</u> (SEC ID N°: 16)
GCINT3-BR2	5' <u>CTTTGATGATTTGCC3'</u> (SEC ID N°: 17)
<b>Oligonucleótidos adaptadores:</b>	
GC3A-F1	5' <u>ACGTTAGCCACCATACTTGAGCAA</u> TGAAAAACCGTCATCAC3' (SEC ID N°: 18)
<b>IAC</b>	
IC3-IAC3	5' AAATCAAAGCGGAATGGTATGTCTGAGGCAACTAGCAAA GCAGTGCAAAAGATGAAGAAG 3' (SEC ID N°: 19)
Las secuencias de detección universales están en negrita y los sitios <i>BsoB1</i> en itálica.	
El subrayado representa secuencias de unión a diana.	

**Ejemplo 2: Optimización de las condiciones de reacción de SDA**

Se realizaron ensayos de tSDA fluorescente a tiempo real homogénea para optimizar las condiciones para los ensayos de la invención. Los oligonucleótidos descritos en las tablas 2 y 3 se analizaron para determinar qué oligonucleótidos proporcionarían resultados óptimos.

- 5 También se optimizaron las concentraciones de bicina y de hidróxido de potasio. Un ejemplo de concentraciones optimizadas de los componentes del ensayo SDA es tal como sigue:

- 50 nM de cebador de choque (GCINT3-BL2 y BR3)  
 500 nM de cebador de amplificación (GCINT3-APL2 y APR1)  
 200 nM de adaptador (GC3A-R1 y ICADPT9)  
 10 200 nM de sondas de detección (CTGCU<sub>nv</sub>3 y ICU<sub>nv</sub>4)
- 30 mM de fosfato de potasio  
 99,7 mM de bicina  
 58 mM de hidróxido de potasio  
 DMSO al 10 %  
 15 Glicerina al 9 %  
 dATP 0,1 mM, dGTP 0,1 mM, dUTP 0,25 mM y isómero S de dCTP alfa-tioatado 0,35 mM  
 acetato de magnesio 5 mM  
 100 µg/ml de BSA  
 Trehalosa al 1,82 %  
 20 DTT 360 µM  
 15 unidades BD de BsoB 1  
 6 unidades BD de Bst

- El ADN diana se lisó durante 10 min a 114 °C en un aparato BD Lyse Block. Las muestras se enfriaron durante 10 min y se transfirieron 150 µl a pocillos de cebado para su incubación durante 20 minutos. Se transfirieron 100 µl de la mezcla de cebado de SDA a micropocillos de amplificación. Las placas se transfirieron después a un instrumento BDProbeTec™-ET durante 60 min a 54 °C.

- Algunos oligonucleótidos enumerados en la tabla 2 y la tabla 3 (por ejemplo APL 1 y APL2) tenían rendimientos equivalentes, es decir, cuando estos oligonucleótidos se usaron en un ensayo de SDA, la cantidad de productos de amplificación detectados era aproximadamente la misma (o la variación se encuentra dentro de una significación estadística). Sin embargo, GC3A-R1 proporcionaba una señal de detección más fuerte en comparación con GC3A-F1 cuando estaba presente la misma cantidad de secuencia diana. Los cebadores de amplificación incluyen GCINT3- APL2 (SEC ID N° 1) y GCINT3-APR1 (SEC ID N° 2). Los cebadores de choque incluyen GCINT3- BL2 (SEC ID N° 3) y GCINT3-BR1 (SEC ID N° 4). Los oligonucleótidos adaptadores incluyen GC3A-R1 (SEC ID N° 5), ICA<sub>dpt</sub>9 (SEC ID N° 6), GC3A-R2 (SEC ID N° 20) y ICA<sub>dpt</sub>10 (SEC ID N° 21). Las sondas de detección incluyen CTGCU<sub>nv</sub>3 (SEC ID N° 7), ICU<sub>nv</sub>4 (SEC ID N° 8), MPC-DR (SEC ID N° 22) y MPC2-FD (SEC ID N° 23). El IAC incluye GCI3-IAC4 (SEC ID N° 9).

Ensayo de SDA con componentes secos y muestras de detección lineales

- Los componentes de los ensayos SDA según la presente invención se optimizaron a un formato en el que cada componente podría secarse y rehidratarse cuando se necesitara. Las concentraciones de oligonucleótidos y reactivos para 100 µl de reacción SDA se enumeran a continuación.

Oligonucleótidos usados y sus concentraciones:

- 50 nM de cebador de choque GCINT3-BL2  
 50 nM de cebador de choque GCINT3-BL3  
 500 nM de cebador de amplificación GCINT3-APL2  
 45 200 nM de cebador de amplificación GCINT3-APL1  
 130 nM de adaptador GC3A-R2  
 200 nM de adaptador ICA<sub>dpt</sub>10  
 300 nM de detector MPC-FD  
 300 nM de detector MPC2-DR  
 50 300 copias de GCI3-IAC4

Concentraciones de reactivos y otros componentes:

- 60 mM de fosfato de potasio, (preparado a partir de una solución madre a pH 7,6)  
 DMSO al 10 %  
 Glicerina al 9 %  
 55 dATP 0,1 mM, dGTP 0,1 mM, dTTP 0 mM e isómero S de dCTP α-tioatado 0,125 mM  
 3,5 mM de acetato de magnesio

100 µg/ml de BSA  
 Trehalosa al 1,84%  
 320 mM de DTT  
 48 unidades BD de enzima de restricción BsoB1  
 8,4 unidades BD de polimerasa Bst

Esta mezcla de reacción optimizada usó GC3A-R2 (SEC ID N° 20) y ICAdpt10 (SEC ID N° 21) como oligonucleótidos adaptadores y MPC-DR (SEC ID N° 22) y MPC2-FD (SEC ID N° 23) como sondas de detección. Los productos de amplificación de ADN diana de *Neisseria gonorrhoeae* se detectaron mediante MPC2-FD, que se marcó con fluoresceína y dabculo. Los productos de amplificación de ADN de IAC (GC13-IAC4) se detectaron mediante MPC-DR, que se marcó con rodamina y dabculo. Las sondas de detección MPC-DR y MPC2-FD no necesitan hibridación intramolecular (por ejemplo, plegamiento en una estructura de horquilla) para lograr la desactivación de los colorantes fluorescentes, ya que los colorantes y las moléculas de desactivador se ubican en una proximidad cercana. Un sitio de restricción de *BsoB1* está presente entre el colorante y la molécula desactivadora. La amplificación del ADN diana de *Neisseria gonorrhoeae* o del IAC conduce a la generación de un segundo oligonucleótido complementario al oligonucleótido adaptador. El segundo oligonucleótido, que es complementario a la sonda de detección, se alinea a la sonda de detección y genera un ADN bicatenario. La enzima de restricción de *BsoB1* reconoce el sitio de *BsoB1* bicatenario entre el colorante y la molécula desactivadora y escinde el sitio, lo que separa el colorante fluorescente de la molécula desactivadora y genera la señal que se va a detectar.

### 20 Ejemplo 3: Sensibilidad del ensayo

Se usaron las condiciones de reacción optimizadas descritas en el ejemplo 2 para determinar la sensibilidad de un ensayo de SDA dúplex según la presente invención. Una cepa de *Neisseria gonorrhoeae* (N° ATCC 19424) se valoró desde  $1 \times 10^4$  a 25 partículas por reacción de SDA. Las células de *Neisseria gonorrhoeae* se lisaron en un aparato BD lyse block, se añadieron a la mezcla de reacción de SDA y después se amplificaron en el instrumento BDProbeTec™ ET. Un cien por cien de las reacciones de SDA dúplex que contenían *Neisseria gonorrhoeae* fueron positivos, con valores de detección significativamente superiores a los observados para el control negativo, confirmándose de este modo que el ensayo de SDA dúplex de la invención es sensible a ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae*.

**Tabla 4. Límite de detección experimental de *Neisseria gonorrhoeae***

Células/reacción:	10.000	1.000	500	100	50	25	0
MOTA:	76.990	97.390	92.160	86.960	82.290	78.980	450
	91.020	79.160	86.800	94.700	80.190	77.990	300
	17.910	98.710	99.150	86.920	94.000	69.940	710
	88.880	101.920	94.960	94.190	86.820	71.050	60
	10.1790	103.940	98.000	92.490	94.040	66.150	810
	85.750	100.460	88.840	92.880	94.730	72.240	40
	106.660	100.550	84.360	85.880	86.200	90.580	360
	99.990	99.990	91.600	90.360	78.380	79.340	140
<b>Media:</b>	<b>96124</b>	<b>97754</b>	<b>91984</b>	<b>90548</b>	<b>87956</b>	<b>75784</b>	<b>359</b>

La condición de reacción secado/rehidratación optimizada descrita en el ejemplo 2 también se analizó para determinar su sensibilidad. Se lisaron diferentes muestras que contenían células de *Neisseria gonorrhoeae* (cepa 19424) con diferentes concentraciones en 2 ml de tampón [tampón de fosfato de potasio 30 mM (preparado a partir de un solución madre de pH 7,6), DMSO al 10 % y glicerina al 9 % durante 10 minutos a 114 °C en un aparato BD Lyse Block. Las muestras se enfriaron durante 15 min y se transfirieron 150 µl de cada muestra a los pocillos de cebado. Las muestras rehidratadas presentes en los pocillos de cebado se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, seguido por 10 min en una serie de bloques térmicos a 72,5 °C. Para cada muestra, se transfirieron 100 µl de la mezcla de reacción de cebado a un micropocillo de amplificación calentado previamente durante 10 min en un bloque térmico a 54 °C, seguido por mezclado de 50 µl del volumen transferido tres veces en el pocillo de amplificación. Las placas se sellaron y se transfirieron a un instrumento BDProbeTec™ ET durante 60 min a 52 °C. Los especímenes que tenían una lectura de al menos 4.000 MOTA (tal como se determina mediante un procedimiento distinto a la aceleración) se registraron como positivas para *Neisseria gonorrhoeae* (es decir, la lectura de 4.000 MOTA fue el valor de corte para una muestra para determinarla positiva para *Neisseria gonorrhoeae*). El MOTA se describe en el documento EP-A-1158449. El valor más elevado que una muestra negativa para ADN diana de *Neisseria gonorrhoeae* fue de 780 MOTA. Las lecturas de MOTA se obtuvieron según las instrucciones del fabricante del BDProbeTec™ ET (Becton Dickinson, MD).

Los datos de la tabla 5 indican que el ensayo de SDA dúplex según la presente invención puede detectar al menos 5 partículas de *Neisseria gonorrhoeae* por reacción, en el que el 95 % de LOD serían 8 copias por reacción.

Tabla 5: Sensibilidad analítica del ensayo de SDA dúplex para *Neisseria gonorrhoeae* con mezcla de reacción de secado optimizada

Partículas GC/reacción:	100		50		25		10		5		0	
	GC	IAC	GC	IAC								
<b>Ensayo:</b>												
<b>Señal MOTA:</b>	35310	53810	29590	13020	29030	62760	17430	33260	1450	51720	70	23970
	40430	43470	37330	22980	29370	60730	21520	45650	7440	67860	50	28710
	44710	47850	30740	34010	38490	62380	21350	52550	30400	44520	0	27810
	42830	48900	41850	40070	26130	68260	20370	59350	16780	61070	0	33420
	45890	56330	33720	21230	37780	64060	24750	61590	10200	62770	0	31800
	46440	45940	32840	37910	11310	63130	9690	61080	9400	55130	0	21200
	41760	52050	27620	39700	44480	52060	6680	61080	9870	46970	0	24610
	45030	40540	28410	38390	26790	57070	4860	63420	37170	40580	40	25490
	47150	57830	25470	21300	27220	46500	20550	36150	21810	74400	10	30800
	52600	54100	25350	15400	28520	60980	13530	38000	8990	75350	0	36760
	46430	42930	26160	31500	13390	67020	4400	46070	11260	68370	20	33630
	37050	52130	20190	34580	13160	69200	22570	46970	800	69120	0	29870
	34160	52800	23670	25080	24550	46050	20930	30400	4250	69090	50	34660
	20010	27110	33000	17740	21280	61770	13980	44680	3780	57160	400	23850
	25030	25730	26260	37050	14160	54520	14990	43910	5640	48400	500	27940
	27650	43420	14870	43620	19400	49540	25170	37440	9280	39860	0	27460
	34430	16280	20170	11350	9410	60260	4980	37570	2190	50000	10	31130
	26700	23730	16510	23140	19250	56410	10520	44460	9130	52690	0	40930
	31450	29120	22860	15220	17710	56680	5650	46490	25800	40170	200	39490
	37310	35120	20210	27470	21120	53100	12180	51870	8220	50060	0	36480
	30480	40810	20400	17350	13670	60860	6640	50260	6070	43700	10	41690
			28530	18160	17810	44850	26520	42950	2050	59640	290	39220
			14210	31980	16390	47370	20220	41150	20010	14720	780	45520
			21600	18020	16010	35580	24280	33250	12640	43040		
<b>Media:</b>	37 755	42 381	25 898	26 511	22 351	56 714	15 573	46 233	11 443	53 600	106	32 019

**Ejemplo 4: Ensayo de especificidad a especies de *Neisseria gonorrhoeae* y a especies que no son de *Neisseria gonorrhoeae***

La especificidad del ensayo de SDA dúplex de la invención se determinó usando los oligonucleótidos de la tabla 2 y las condiciones de reacción de SDA descritas en el ejemplo 2: Ensayo de SDA con componentes secos y muestras de detección lineales

Un panel de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* se analizó para determinar la especificidad del ensayo de SDA dúplex de la invención. El ensayo detectó un cien por cien de las cepas de *N. gonorrhoeae* cuando se analizaron 250 partículas celulares por reacción de SDA (Tabla 6). Un panel de especies de *Neisseria* pero no *gonorrhoeae* y de microorganismos que no eran *Neisseriaceae* se analizó también en el ensayo de SDA dúplex de la invención (Tabla 7 y Tabla 8). Los resultados de las tablas son un resumen de múltiples experimentos que abordan la reactividad cruzada. Los organismos se incubaron en un McFarland que, después del procesamiento, proporcionaron aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ reacción de SDA. Los organismos enumerados en la tabla 7 y 8 se analizaron a esa concentración, siendo la excepción *C. trachomatis* a  $1 \times 10^6$  EB/reacción. El resultado de IAC permitió la determinación de que un resultado de ensayo negativo fue debido a la falta de reactividad cruzada con los oligonucleótidos de ensayo, no debido a un inhibidor de amplificación presente en una muestra procesada. Una cepa de *N. cinerea* (N° 565) (identificada previamente como *N. lactamica*) llevó a no detectar el IAC de ensayo GC dúplex. El IAC se detectó en un ensayo después de una dilución de la muestra ( $1 \times 10^5$  células/reacción de SDA). Esta muestra diluida también produjo un resultado negativo para la reactividad cruzada. Se determinaron dos cepas de *Neisseria lactamica* (N° 23970 y 391) que reaccionaban de forma cruzada con el ensayo. Adicionalmente, un resultado muy débilmente positivo se detectó con 1 de cada 3 replicados de *Branhamella catarrhalis* cepa N° 25240. Todas las cepas de *Neisseria kochii* fueron positivas con el ensayo de SDA para *Neisseria gonorrhoeae*. Esto se esperaba, ya que el organismo se ha identificado como una subespecie de *Neisseria gonorrhoeae*.

Estos resultados demuestran el patrón de reactividad cruzada del ensayo descrito en la presente invención.

**Tabla 6: Cepas de *Neisseria gonorrhoeae***

Organismo	Cepa	Fuente	Resultado
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	19424	ATCC	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	35542	ATCC	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	43069	ATCC	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	43070	ATCC	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	49226	ATCC	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	51109	ATCC	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	454	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	1632	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	2900	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	111	CDC	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	4	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	20	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	98	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	115	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	497	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	1588	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	1618	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	2373	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	3981	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	8000	BD	Pos.
<i>Neisseriagonorrhoeae</i>	8002	BD	Pos.
ADN de <i>Neisseriagonorrhoeae</i> clonado (plásmido)	N/A	N/A	Pos.
Control negativo	N/A	N/A	Neg.

**Tabla 7: Reactantes cruzados de especies de *Neisseria***

Organismo	N° de cepa/organismo	Sitio	Resultado
<i>Neisseria cinerea</i>	232	BD	Neg.
<i>Neisseria cinerea</i>	565	BD	Neg.
<i>Neisseria elongata</i>	25295	ATCC	Neg.
<i>Neisseria elongata ss</i>	49377	BD	Neg.
<i>Neisseria elongate ss</i>	49378	ATCC	Neg.
<i>Neisseria elongata ss glycolytica</i>	29315	ATCC	Neg.

ES 2 531 752 T3

(continuación)

Organismo	Nº de cepa/organismo	Sitio	Resultado
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30008	HVM	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30034	HVM	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30037	HVM	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30136	HVM	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30137	HVM	Neg.
<i>Neisseria flavescens</i>	13120	ATCC	Neg.
<i>Neisseria flavescens</i>	13115	ATCC	Neg.
<i>Neisseria flavescens</i>	13116	ATCC	Neg.
<i>Neisseria flavescens</i>	13117	ATCC	Neg.
<i>Neisseria lactamica</i>	264	BD	Neg.
<i>Neisseria lactamica</i>	391	BD	Pos.
<i>Neisseria lactamica</i>	408	BD	Neg.
<i>Neisseria lactamica</i>	803	BD	Neg.
<i>Neisseria lactamica</i>	23970	ATCC	Pos.
<i>Neisseria lactamica</i>	7624	BD	Neg.
<i>Neisseria lactamica</i>	216-75	ATCC	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	13077	ATCC	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	305	BD	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	14685	ATCC	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	35699	BD	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	41799	BD	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	55592	ATCC	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	1490	CCF	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	2039	CCF	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	2040	CCF	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i>	c136	CCF	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i> (768)	301	BD	Neg.
<i>Neisseria meningitidis</i> (LRD728)	53900	BD	Neg.
<i>Neisseria mucosa</i>	19693	ATCC	Neg.
<i>Neisseria mucosa</i>	19694	ATCC	Neg.
<i>Neisseria mucosa</i>	19695	ATCC	Neg.
<i>Neisseria mucosa</i>	19696	ATCC	Neg.
<i>Neisseria mucosa</i>	1915	CCF	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	6573	BD	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	8078	BD	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	8028	BD	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 30015	HVM	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 30035	HVM	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 35304	HVM	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 35308	HVM	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 35320	HVM	Neg.
<i>Neisseria polysaccharea</i>	1574	CCF	Neg.
<i>Neisseria polysaccharea</i>	43768	ATCC	Neg.
<i>Neisseria sicca</i>	Msdh	BD	Neg.
<i>Neisseria sicca</i>	29256	ATCC	Neg.
<i>Neisseria sicca</i>	29259	ATCC	Neg.
<i>Neisseria sicca</i>	891	CCF	Neg.
<i>Neisseria sicca</i>	9913	ATCC	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	10555	BD	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	7697	BD	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	7858	BD	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	209	CCF	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	616	CCF	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	1253	CCF	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	1378	CCF	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	1889	CCF	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	2007	CCF	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	nh14	Farrell	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	nh15	Farrell	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	nh18	Farrell	Neg.

(continuación)

Organismo	Nº de cepa/organismo	Sitio	Resultado
<i>Neisseria subflava</i>	nh7	Farrell	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	nh8	Farrell	Neg.
<i>Neisseria subflava</i>	nh9	Farrell	Neg.
<i>Neisseria weaveri</i>	1246	CCF	Neg.
<i>Neisseria weaveri</i>	1399	CCF	Neg.
<i>Neisseria weaveri</i>	1862	CCF	Neg.
<i>Neisseria kochii</i>	31291	NRL	Pos.
<i>Neisseria kochii</i>	31292	NRL	Pos.
<i>Neisseria kochii</i>	31294	NRL	Pos.
<i>Neisseria kochii</i>	32895	NRL	Pos.
<i>Neisseria kochii</i>	32896	NRL	Pos.
Control negativo	N/A	N/A	Neg

Tabla 8: Reactantes cruzados que no son *Neisseria*

Reactantes cruzados que no son <i>Neisseria</i>	ATCC o ID.	Fuente	Resultado
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	13339	ATCC	Neg.
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	19001	ATCC	Neg.
<i>Actinomyces israelii</i>	10049	ATCC	Neg.
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	7966	ATCC	Neg.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	8750	ATCC	Neg.
<i>Bacillus subtilis</i>	12100	ATCC	Neg.
<i>Bacteroides fragilis</i>	25285	ATCC	Neg.
<i>Branhamella catarrhalis</i>	25238	ATCC	Neg.
<i>Branhamella catarrhalis</i>	25240	ATCC	*Pos. débil
<i>Branhamella catarrhalis</i>	25238	ATCC	Neg.
<i>Branhamella catarrhalis</i>	c223	CCF	Neg.
<i>Branhamella catarrhalis</i>	c224	CCF	Neg.
<i>Branhamella catarrhalis</i>	c225	CCF	Neg.
<i>Candida albicans</i>	44808	ATCC	Neg.
<i>Candida glabrata</i>	2001	ATCC	Neg.
<i>Candida tropicalis</i>	750	ATCC	Neg.
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	AR-39	ATCC	Neg.
<i>Chlamydia psittaci</i>	Cal-10	BD	Neg.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	LGVII	BD	Neg.
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	ATCC	Neg.
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	ATCC	Neg.
<i>Corynebacterium renale</i>	19412	ATCC	Neg.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	36556	ATCC	Neg.
<i>Edwardsiella tarda</i>	15469	ATCC	Neg.
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	ATCC	Neg.
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	ATCC	Neg.
<i>Enterococcus faecium</i>	19434	ATCC	Neg.
<i>Escherichia coli</i>	11775	ATCC	Neg.
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	13253	ATCC	Neg.
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14018	ATCC	Neg.
<i>Gemella haemolysans</i>	10379	ATCC	Neg.
<i>Haemophilus influenzae</i>	33533	ATCC	Neg.
<i>Kingella kingae</i>	23330	ATCC	Neg.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	ATCC	Neg.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	ATCC	Neg.
<i>Lactobacillus brevis</i>	14869	ATCC	Neg.
<i>Lactobacillus jensenii</i>	25258	ATCC	Neg.
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	ATCC	Neg.
<i>Moraxella lacunata</i>	17967	ATCC	Neg.
<i>Moraxella osloensis</i>	9281	BD	Neg.
<i>Morganella morganii</i>	25830	ATCC	Neg.
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337	ATCC	Neg.
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	29743	ATCC	Neg.
<i>Peptostreptococcus productus</i>	27340	ATCC	Neg.

(continuación)

Reactantes cruzados que no son <i>Neisseria</i>	ATCC o ID.	Fuente	Resultado
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14029	ATCC	Neg.
<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	ATCC	Neg.
<i>Providencia stuartii</i>	35031	ATCC	Neg.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	ATCC	Neg.
<i>Salmonella minnesota</i>	9700	ATCC	Neg.
<i>Salmonella typhimurium</i>	13311	ATCC	Neg.
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	ATCC	Neg.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	E155	ATCC	Neg.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12386	ATCC	Neg.
<i>Streptococcus mitis</i>	9811	ATCC	Neg.
<i>Streptococcus mutans</i>	25175	ATCC	Neg.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6303	ATCC	Neg.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	ATCC	Neg.
<i>Streptomyces griseus</i>	10137	ATCC	Neg.
<i>Veillonella parvula</i>	10790	ATCC	Neg.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802	ATCC	Neg.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	27729	ATCC	Neg.

**Ejemplo 5: Demostración del ensayo de SDA dúplex para *Neisseria gonorrhoeae***

5 Los datos siguientes demuestran la capacidad del ensayo de SDA dúplex para *Neisseria gonorrhoeae* para  
amplificar y detectar dos fuentes de ADN diana (ADN diana de *Neisseria gonorrhoeae* y un IAC, por ejemplo GC13-  
IAC4 (SEC ID N° 9)). Este experimento usó los oligonucleótidos primarios de la tabla 2 y las condiciones de reacción  
de SDA descritas en el ejemplo 2. Los datos enumerados en la tabla 9 demuestran que el ensayo de SDA dúplex  
10 para *Neisseria gonorrhoeae* puede amplificar y detectar, en un solo pocillo de ensayo, tanto ADN de *Neisseria*  
*gonorrhoeae* (GC) como el control de amplificación interno (IAC). Las dos fuentes diana de ADN se distinguieron por  
el uso de diferentes sondas de detección marcadas fluorescentemente: rodamina (ROX) para *Neisseria gonorrhoeae*  
y fluoresceína (FAM) para el IAC. El ADN de *Neisseria gonorrhoeae* y el IAC pudieron amplificarse y detectarse  
cuando estaban presentes solos (condiciones 1 y 2), indicando la capacidad del ensayo para detectar tanto ADN  
diana como el IAC. La secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* también se detectó en presencia del IAC  
15 (condición 3). La señal de *Neisseria gonorrhoeae* no se alteró significativamente cuando estaba presente IAC. Se  
encontró que la señal de IAC se suprimía en la condición 3. Sin embargo, esto no se refleja en la especificidad o  
sensibilidad del ensayo, ya que es importante que se detecte el IAC en ausencia de *Neisseria gonorrhoeae* para  
indicar una carencia de inhibidores o la presencia de un error humano.

**Tabla 9. Experimento de detección dual**

	Condición 1		Condición 2		Condición 3	
	ROX	FAM	ROX	FAM	ROX	FAM
<b>Diana GC</b>	100	100	0	0	100	100
<b>Diana IAC</b>	0	0	300	300	300	300
<b>MOTA:</b>	68060	1220	240	39900	71370	11440
	52860	2580	40	50650	57370	14430
	81610	1760	160	51570	67760	18230
	53710	1400	170	69930	89480	7720
	82700	2410	150	60770	75250	8210
	55320	3000	30	75640	85300	12380
<b>Media</b>	<b>65710</b>	<b>2062</b>	<b>132</b>	<b>58077</b>	<b>74422</b>	<b>12068</b>

**Listado de secuencias**

- <110> Harris, James
- 5 <120> Amplificación y detección de Neisseria gonorrhoeae
- <130> 050878ep
- <140>
- 10 <141>
- <160> 23
- <170> Microsoft Word 2000
- 15 <210> 1
- <211> 41
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Cebador de amplificación
- <400> 1
- 25 cgtctccagt ccagacttct cgggaatcaa aagcgaatgc g
- <210> 2
- <211> 41
- <212> ADN
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador de amplificación
- 35 <400> 2
- actacgtcga atgcatgtct cgggacttct tcatcttttg c
- <210> 3
- <211> 13
- 40 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador de choque
- 45 <400> 3
- ccgcagcata cgc
- <210> 4
- 50 <211> 15
- <212> ADN
- <213> Cebador de choque
- <220>
- 55 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador
- <400> 4
- tgccatag ctttg
- 60 <210> 5
- <211> 41
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 65 <220>

<223> Oligonucleótido adaptador

<400> 5  
acgtagcca ccatactga gtagacgg ttttcattg c

5

<210> 6  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Oligonucleótido adaptador

<400> 6  
15 actgatccgc actaacgact gcttgctag ttgcctcaga cat

<210> 7  
<211> 35  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sonda de detección; T en la posición 1 está marcado con dabciilo; T en la posición 15 está marcado con rodamina

25

<400> 7  
tagtgcccga gcactacgtt agccaccata ctga

<210> 8  
30 <211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> Sonda de detección; T en la posición 1 está marcado con fluoresceína; T en la posición 15 está marcada con dabciilo

<400> 8  
40 tagcaccgga gtgctaactg atccgacta acgact

<210> 9  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Control de amplificación interno

<400> 9  
50 aatcaaaagc gaatgcgtat gtctgaggca actagcaaag ctgcaaaaga tgaagaag

<210> 10  
<211> 40  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador de amplificación

<400> 10  
60 cgtctccagt ccagacttct cggaatcaa aagcgaatgc

<210> 11  
<211> 42  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de amplificación  
  
 <400> 11  
 5 cgtctaccgt ccagacttct cgggaatcaa aagcgaatgc gc  
  
 <210> 12  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de amplificación  
  
 15 <400> 12  
 actacgtcga atgcatgtct cgggacttct tcatctttg cc  
  
 <210> 13  
 <211> 43  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de amplificación  
 25  
 <400> 13  
 actacgtcga atgcatgtct cgggagcttc tcatctttt gcc  
  
 <210> 14  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de choque  
 35  
 <400> 14  
 ccgcagcata cg  
  
 40 <210> 15  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador de choque  
  
 <400> 15  
 ccgcagcata cgcg  
 50  
 <210> 16  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador de choque  
  
 <400> 16  
 60 ttgcgcatat gctt  
  
 <210> 17  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de choque  
  
 <400> 17  
 5 ctttgatgat ttgcg  
  
 <210> 18  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido adaptador  
  
 <400> 18  
 15 acggttagcca ccatacttga gcaatgaaaa accgtcatc ac  
  
 <210> 19  
 <211> 59  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Control de amplificación interno  
 25  
 <400> 19  
 aatcaaaagc gaatgcgtat gtctgaggca actagcaaag cagtgcaaaag atgaagaag  
  
 <210> 20  
 <211> 41  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido adaptador  
 35  
 <400> 20  
 actgatccgc actaacgact gtgatgacgg ttttcattg c  
  
 <210> 21  
 <211> 44  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido adaptador  
 45  
 <400> 21  
 50 acggttagcca ccatacttga gcttgctag ttgcctcag acat  
  
 <210> 22  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Sonda de detección; T en posición 1 está marcado con dabciilo; A en posición 10 está marcado con rodamina  
 tccccgagta cgtagccac catacttga  
  
 <210> 23  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
  
 <220>  
 <223> Sonda de detección; T en posición 1 está marcado con fluoresceína; A en posición 10 está marcado con

# ES 2 531 752 T3

dabcilo

<400> 23

tccccgagta ctgatccgca ctaacgact

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de detección de una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* que comprende:
  - 5 (a) en una muestra, amplificar la secuencia diana usando un primer cebador de amplificación que tiene una secuencia que consiste esencialmente en una secuencia de unión a diana de al menos una de SEC ID N° 1 o 2, en presencia de un cebador adaptador de SEC ID N° 5; y
  - (b) detectar la secuencia diana amplificada.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 que además comprende un segundo cebador de amplificación que tiene una secuencia que consiste esencialmente en la secuencia de unión a diana de SEC ID N° 1 o 2.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que
  - 10 (a) el primer cebador de amplificación consiste esencialmente en una secuencia de unión a diana de SEC ID N° 1, y
  - (b) el segundo cebador de amplificación consiste esencialmente en una secuencia de unión a diana de SEC ID N° 2.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha reacción de amplificación es seleccionada del grupo que consiste en detección directa, reacción de amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), reacción de cadena de la polimerasa (PCR), hibridación in situ, amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia autosostenida (SSR), amplificación por círculo rodante o amplificación basada en secuencias de aminoácidos (NASBA).
- 20 5. Un procedimiento de detección de una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* que comprende:
  - (a) hibridar uno o más cebadores de amplificación que tienen una secuencia que consiste esencialmente en la secuencia de unión a diana de SEC ID N° 1 o 2 en presencia de un control de amplificación interno que consiste esencialmente en SEC ID N° 9 o 19 y un cebador adaptador que consiste en SEC ID N° 5, y amplificar dicho control de amplificación interno y
  - (b) detectar al menos uno de dicho cebador de amplificación y dicho control de amplificación interno.