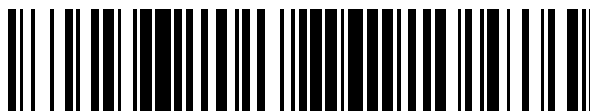


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 538**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2010** **E 10701589 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2396422**

54 Título: **Ensayo para *Trichomonas vaginalis* mediante amplificación y detección del gen AP65-1 de *Trichomonas vaginalis***

30 Prioridad:

14.01.2009 US 205017 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2016

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US

72 Inventor/es:

MC MILLIAN, RAY, A.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 575 538 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 para *Trichomonas vaginalis* mediante amplificación y detección del gen AP65-1 de *Trichomonas vaginalis*.

5 Antecedentes de la invención

El *Trichomonas vaginalis* es un protozoo flagelado parasitario anaeróbico que es el agente causante de la tricomoniasis. Es la infección por protozoo patogénico más común en el ser humano en los países industrializados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que se producen 180 millones de infecciones al año en todo el mundo. Las estimaciones para solamente Norteamérica son de entre 5 y 8 millones de nuevas infecciones cada año, con una tasa estimada de casos asintomáticos de hasta 50%.

La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual que puede producirse en hombres y mujeres. Entre los síntomas de *T. vaginalis* experimentados típicamente en las mujeres se incluyen vaginitis, picor, quemazón e inflamación de la vagina, cervicitis o inflamación del cérvix, uretritis o inflamación de la uretra, o descarga vaginal espumosa verde/amarilla. Además, la infección puede provocar incomodidad durante el coito y la micción, así como irritación y picor en el área genital femenina. En casos raros, puede producirse dolor en el abdomen inferior. Los síntomas en la mujer habitualmente aparecen 5 a 28 días después de la exposición.

La mayoría de hombres con tricomoniasis no manifiestan signos o síntomas. Aunque raramente, algunos hombres pueden experimentar temporalmente una irritación en el interior del pene, descarga leve o una ligera quemazón durante la micción o la eyaculación.

Existen varios modos conocidos de diagnosticar y detectar la tricomoniasis. Una forma clásica de detección es un frotis cérvico-vaginal, que muestra un "halo" transparente en torno al núcleo de las células superficiales procedentes de muestras de individuos infectados. Sin embargo, la tricomoniasis se detecta raramente mediante el estudio de la descarga o con un frotis cérvico-vaginal debido a la baja sensibilidad asociada a esta forma de detección. *T. vaginalis* se ha diagnosticado tradicionalmente mediante un montaje en fresco en el que se observa la mortalidad de las células helicoidales. En mujeres, un médico puede recoger un espécimen durante un examen pélvico mediante la inserción de un espéculo en la vagina, utilizando un aplicador con punta de algodón para recoger una muestra. A continuación la muestra se deposita sobre un portaobjetos de microscopía y se envía a un laboratorio para el análisis. Sin embargo, la detección mediante un montaje en fresco es menos sensible que métodos más nuevos tales como el ensayo rápido de antígenos y la amplificación mediada por la transcripción. Huppert et al., CID 45:194, 2007. Estos métodos más recientes presentan una mayor sensibilidad aunque no se ha generalizado su uso.

Actualmente, el método más común de análisis de laboratorio es mediante el cultivo durante la noche del organismo *T. vaginalis* (Sood et al., Indian J. Med. Res. 125:567-571, abril de 2007; Ohlemeyer et al., Journ. Of Ad. Health 22(3):205-208, marzo de 1998). Sin embargo, la presencia de *T. vaginalis* también puede diagnosticarse mediante PCR, utilizando los cebadores L23861 Fw y Rev (Sichirm et al., Journ. of Microbiological Methods, 68(2):243-247, febrero de 2007).

Madico et al., Journ. of Clinical Microbiology 36(1):3205-3210, nov. de 1998, dan a conocer el diagnóstico de la infección por *Trichomonas vaginalis* mediante PCR utilizando muestras de hisopo vaginal y diferentes parejas de cebadores y sugiere la utilización de BTUB 9/2 para los métodos diagnósticos.

De esta manera, se desean nuevas técnicas diagnósticas destinadas a la detección más fiable y precisa de *T. vaginalis*.

Sumario de la invención

El gen de la proteína de adhesión (es decir, el gen AP65-1, SEC ID nº 1), que presenta una longitud aproximada de 1,7 kb, se encuentra presente en *T. vaginalis*. El gen AP65-1 ha sido identificado en por lo menos tres cepas de *T. vaginalis* (ATCC nº 30001, ATCC nº 30238 y ATCC nº 300239). Inesperadamente se ha determinado que una parte del gen AP65-1 se encuentra altamente conservado en dichas tres cepas de *T. vaginalis* y que es exclusivo del organismo *T. vaginalis*. Altamente conservado, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a que la parte identificada se considera homóloga entre por lo menos las tres cepas anteriormente identificadas. Concretamente, la parte del gen AP65-1 entre aproximadamente los pares de bases 317 y aproximadamente 560 se determina que se encuentra conservada en las tres cepas de *T. vaginalis*.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para detectar tricomoniasis, que comprende: proporcionar una muestra biológica, poner en contacto la muestra biológica con una sustancia que comprende un conjunto de sondas oligonucleotídicas que comprende por lo menos una sonda oligonucleotídica que está marcada detectablemente y presenta una longitud de la secuencia de nucleótidos de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 y por lo menos dos cebadores oligonucleotídicos, cada uno de los cuales presenta una longitud de la secuencia de nucleótidos de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150, bajo condiciones en las que las sondas y los cebadores se aparean con un gen AP65-1 tal como se especifica en SEC ID nº 1 en la

localización entre los pares de bases aproximados 317 a 560 en el gen; amplificar la secuencia diana entre los cebadores, y detectar el marcaje como indicación de la hibridación del conjunto de sondas con la secuencia diana, indicando de esta manera la presencia o la cantidad de *Trichomonas*, en el que el conjunto de sondas comprende cebadores que presentan una secuencia oligonucleotídica que comprende SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13 y una sonda que presenta una secuencia oligonucleotídica que comprende la SEC ID nº 14.

Los oligonucleótidos indicados en la presente memoria se utilizan para detectar la presencia de *T. vaginalis* utilizando el gen *AP65-1*. Concretamente, los oligonucleótidos indicados en la presente memoria seleccionan determinadas partes del gen *AP65-1* y amplifican partes del mismo para la detección. Más concretamente, los oligonucleótidos indicados en la presente memoria se utilizan para seleccionar y amplificar una o más partes de la secuencia de ácidos nucleicos de *AP65-1* dentro del organismo como mecanismo para detectar *T. vaginalis*. Todavía más concretamente, los oligonucleótidos indicados en la presente memoria presentan como diana la parte conservada (pares de bases 317 a 560 de Genbank nº de acceso U18346) del gen *AP65-1* de *T. vaginalis*. La parte diana del gen *AP65-1* se ilustra en las figuras. 1A y 1B.

Los conjuntos de sondas oligonucleotídicas indicados en la presente memoria se diseñan para seleccionar el gen *AP65-1* y ofrecen un mecanismo de detección. El diseño del conjunto de sondas se basa en varios factores, entre ellos principalmente el ensayo en el que se utiliza el conjunto de sondas. Los ensayos para la detección de las secuencias de ADN o ARN son bien conocidos de la técnica. Estos ensayos típicamente utilizan algún tipo de amplificación o algún tipo de técnica de obtención de imágenes para confirmar la presencia del ADN diana. Entre los ejemplos de reacciones de amplificación se incluyen la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la ADC (amplificación por desplazamiento de cadena), AMT (amplificación mediada por la transcripción) y la RCL (reacción en cadena de la ligasa).

En una forma de realización, el mecanismo de amplificación seleccionado para la detección es ADC. La ADC es un mecanismo de amplificación isotérmico y por lo tanto no implica el ciclado térmico. De esta manera, se diseñan conjuntos de sondas de ADC para una temperatura de fusión (T_f) de la diana dentro de un intervalo estrecho predeterminado. La temperatura de fusión (T_f) de la diana es la temperatura a la que por lo menos cincuenta por ciento del oligonucleótido se aparea con su complemento perfecto. El experto en la materia conocerá que la T_f de una secuencia oligonucleotídica está determinada por el número de pares de bases en la secuencia, así como el tipo de bases en la secuencia. Estas directrices para diseñar los oligonucleótidos son bien conocidas por el experto en la materia y no se indican en detalle en la presente memoria.

Resulta ventajoso que el sitio diana dentro del gen *AP65-1* utilizado conjuntamente con los oligonucleótidos indicados en la presente memoria no presente tramos largos de bases repetidas. Es decir, no más de 3 o 4 bases en la secuencia son la misma base. La minimización del número de repeticiones de bases permite un diseño del sistema con temperaturas de fusión óptimas para los oligonucleótidos. Además, los oligonucleótidos que se unen a dichas partes discretas del gen *AP65-1* no interactúan entre sí al situarse en estrecha proximidad.

Los sitios de unión adecuados en el gen *AP65-1* para un conjunto de sondas de ADC se listan en la Tabla 1, a continuación, conjuntamente con su localización en la parte conservada del gen *AP65-1*.

Tabla 1

SECUENCIA	Localización*	Número de SEC ID
TGGTTGACAGCCACTTC	352-368	SEC ID nº 2
TGGCGCCGTAGATG	402-415	SEC ID nº 3
CTCTGGCTCTTATG	507-520	SEC ID nº 4
TACAGGACCGCAC	465-477	SEC ID nº 5
CCTGTAGGAGGCGTTGATG	445-463	SEC ID nº 6

*Genbank nº de acceso U18346

Los conjuntos de sondas oligonucleotídicas de ADC indicadas en la presente memoria son suficientemente complementarias respecto a partes del gen *AP65-1* para unirse selectivamente a dichas partes.

Para la forma de realización de ADC indicada en la presente memoria, el conjunto de sondas oligonucleotídicas presenta cebadores de desplazamiento ("bumper") izquierdo y derecho, cebadores de amplificación izquierdo y derecho y una sonda. En una forma de realización preferida, dichos cebadores y sondas presentan secuencias oligonucleotídicas que son el complemento perfecto de las secuencias indicadas anteriormente. Concretamente, los cebadores de desplazamiento izquierdo y derecho presentan la secuencia ACCAACTGTCGGTGAAG (SEC ID nº 7) y GAGACCGAGAATAC (SEC ID nº 8), respectivamente. SEC ID nº 7 es el complemento perfecto de SEC ID nº 2 y SEC ID nº 8 es el complemento perfecto de SEC ID nº 4. Los cebadores izquierdo y derecho contienen las secuencias respectivas ACCGCGGCATCTAC (SEC ID nº 9) y ATGTCCTGGCGTG (SEC ID nº 10). SEC ID nº 9 es el complemento perfecto de SEC ID nº 3. SEC ID nº 10 es el complemento perfecto de SEC ID nº 5. El conjunto de

sondas de ADC incluye además una sonda oligonucleotídica que presenta la secuencia GGACATCCTCCGCAACTAC (SEC ID nº 11), que es el complemento perfecto de SEC ID nº 6. El experto en la materia apreciará que sólo se requiere una complementariedad inferior a la perfecta en el caso de que se satisfagan los requisitos de T_f y otras condiciones de ensayo.

Los cebadores y sonda presentan nucleótidos adicionales unidos a los mismos. La sonda presenta además fracciones adicionales de obtención de imágenes fijas a la misma. Estas fracciones facilitan la detección de la secuencia de ADN diana. Utilizando este conjunto de sondas oligonucleotídicas puede llevarse a cabo un ensayo de ADC en una muestra con el fin de determinar la presencia o la ausencia de las tres cepas de *T. vaginalis*. En una forma de realización ilustrativa, se amplifica una región de 75 pares de bases del gen *AP65-1* entre aproximadamente los pares de bases 317 y 560. Todavía más concretamente, la región de 75 pares de bases del gen *AP65-1* se amplifica entre los pares de bases 402 y 477.

En una forma de realización alternativa, el mecanismo de amplificación seleccionado para la detección es el ensayo de PCR en tiempo real Taqman®. Las secuencias oligonucleotídicas se unen a la región del gen *AP65-1* situada entre aproximadamente el par de bases 317 y aproximadamente el par de bases 560. Los conjuntos de cebador/sonda se configuran no sólo para unirse selectivamente en esta región del gen *AP65-1*, sino para amplificar cierta parte de la secuencia del gen *AP65-1* para la detección. Los oligonucleótidos indicados en la presente memoria presenta una secuencia que es capaz de unirse a la secuencia diana de ácidos nucleicos (y su cadena complementaria). Los oligonucleótidos indicados en la presente memoria también pueden utilizarse, solos o en combinación, para facilitar la detección mediante la amplificación del gen *AP65-1*. Son ejemplos de tres conjuntos de sondas utilizados para los ensayos de PCR en tiempo real Taqman®, descritos en términos de sus secuencias oligonucleotídicas:

Tabla 2

Descripción de la sonda:	Secuencia 5' a 3' del oligonucleótido
Cebador directo TaqMan® 1 de <i>AP65-1</i>	GAAGATTCTGGCAAGATCAAGGA (SEC ID nº 12)
Cebador inverso TaqMan® 1 de <i>AP65-1</i>	ACGACAATGCAGCGGATGT (SEC ID nº 13)
Sonda TaqMan® 1 del gen <i>AP65-1</i>	ATCCTCCGCAACTACCCACGCCA (SEC ID nº 14)
Cebador directo TaqMan® 2 del gen <i>AP65-1</i>	TTACACACCAACTGTCGGTGAAG (SEC ID nº 15)
Cebador inverso TaqMan® 2 del gen <i>AP65-1</i>	ATGTAGATGCCGCGGTATGAT (SEC ID nº 16)
Sonda TaqMan® 2 del gen <i>AP65-1</i>	TTGCCAGAAGTGGGCTACACACACCGTC (SEC ID n 17)
Cebador directo TaqMan® 3 del gen <i>AP65-1</i>	CAGAGGAAACAATGCCAATTCTT (SEC ID nº 18)
Cebador inverso TaqMan® 3 del gen <i>AP65-1</i>	TGACGGTGTGTAGCCCACTTC (SEC ID nº 19)
Sonda TaqMan® 3 del gen <i>AP65-1</i>	ACACCAACTGTCGGTGAAGCTTGCC (SEC ID nº 20)

En todavía otra forma de realización, los oligonucleótidos pueden utilizarse en un método para detectar la presencia o la ausencia de *T. vaginalis* en una muestra. En una forma de realización adicional, el método incluye tratar una muestra utilizando uno o más oligonucleótidos específicos para la secuencia diana en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos y detectar la presencia o la ausencia del producto del ácido nucleico amplificado.

En una forma de realización ilustrativa, como reacción de amplificación se selecciona la ADC. En el contexto de dicha forma de realización, los oligonucleótidos indicados en la presente memoria como adecuados para la utilización en el ensayo de ADC se utilizan en combinación como cebadores de amplificación, cebadores de desplazamiento y como detector en dicho ensayo.

En otra forma de realización se proporciona un kit para la detección de *T. vaginalis*. El kit comprende: un conjunto de sondas para la detección mediante amplificación de *Trichomonas vaginalis* que contiene un gen *AP65-1* como se indica en SEC ID nº 1, comprendiendo dicho conjunto de sondas: (a) cebadores que se unen a la región altamente conservada de la SEC ID nº 1 que presenta una secuencia oligonucleotídica que comprende SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13, (b) por lo menos una sonda detectora que se une a una región de la SEC ID nº 1 que presenta la secuencia oligonucleotídica que comprende la SEC ID nº 14.

El kit se proporciona con uno o más de los oligonucleótidos y reactivos tamponadores para la realización de ensayos de amplificación.

En un aspecto del kit, pueden proporcionarse oligonucleótidos y reactivos para los fines de la ADC. En este aspecto, se proporcionan dos oligonucleótidos como cebadores de amplificación, se proporcionan dos oligonucleótidos como cebadores de desplazamiento y puede proporcionarse un oligonucleótido para la utilización como detector.

En todavía otro aspecto del kit, los oligonucleótidos para los fines de la ADC pueden proporcionarse en formato seco o líquido. En formato seco, la composición puede aplicarse a un receptáculo apropiado en el que pueden añadirse tampones de ADC adecuados para llevar a cabo el ensayo.

En todavía otro aspecto del kit, pueden proporcionarse oligonucleótidos y reactivos para los fines de la PCR

TaqMan®. En este aspecto se proporcionan tres oligonucleótidos. Dos de los tres son cebadores de amplificación y el tercer oligonucleótido se configura como detector.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A representa esquemáticamente un conjunto de sondas de ADC y los sitios de unión a diana a los que las sondas se unen en la parte del gen *AP65-1* (SEC ID nº 24).

La figura 1B representa tres conjuntos de sondas TaqMan® y los sitios de unión a diana a los que las sondas se unen en la parte del gen *AP65-1* (SEC ID nº 24).

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describe un método de detección de *Trichomonas vaginalis* utilizando un ensayo que consiste de una o más sondas oligonucleotídicas que se unen al gen *AP65-1*. El solicitante ha determinado que una región del gen *AP65-1* entre por lo menos tres cepas de *T. vaginalis* (ATC 30001, ATCC nº 30238 y ATCC nº 300239) se encuentra altamente conservada. Es decir, una región del gen *AP65-1* es suficientemente homóloga entre las tres cepas de *T. vaginalis* para que las sondas oligonucleotídicas sean capaces de unión a la región identificada del gen *AP65-1* en las tres cepas. También se encuentra contemplado que las sondas oligonucleotídicas sean capaces de unión a una región correspondiente del gen *AP65-1* en otras cepas de *T. vaginalis*.

Los oligonucleótidos indicados en la presente memoria se unen a una región del gen *AP65-1*. Concretamente, los oligonucleótidos indicados en la presente memoria presentan como diana la región de pares de bases 317 a 560 del gen *AP65-1*. La región de pares de bases 317 a 560 del gen *AP65-1* se ha observado en tres cepas de *T. vaginalis* (ATCC nº 30001, ATCC nº 30238 y ATCC nº 300239) y se ha identificado como altamente conservada en por lo menos estas tres cepas. La invención aprovecha esta región conservada y la estabilidad del gen *AP65-1* en por lo menos tres cepas de *T. vaginalis*.

Se cree que el gen *AP65-1* es único de *T. vaginalis*. Debido a la conservación y estabilidad de este gen, la invención puede minimizar o eliminar la reacción cruzada/detección de otros organismos. La conservación y estabilidad entre los pares de bases 317 a 560 del gen *AP65-1* ventajosamente no demuestran aparentemente homología con otros organismos parasitarios, lo que permite la utilización de dicha región del gen *AP65-1* para la detección específica de *T. vaginalis* y reduce el riesgo de falsos positivos.

El gen *AP65-1* pertenece a la familia multigénica de AP65 (proteína de adhesión 65) codificante de múltiples proteínas homólogas de 65 kDa las secuencias proteicas de las cuales son idénticas a las de los enzimas málicos hidrogenosómicos. Estas proteínas también han sido detectadas sobre las membranas plasmáticas como parte de complejos de adhesión durante los contactos huésped-parásito. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, el solicitante cree que el gen *AP65-1* codifica proteínas asociadas a un receptor sobre *T. vaginalis* que permite que se una a un sitio diana sobre su huésped. De esta manera, se cree que el gen *AP65-1* desempeña un papel significativo en la patogenicidad de *T. vaginalis*.

De esta manera, debido a que el gen *AP65-1* desempeña un papel en la patogenicidad y es estable/está conservado, resulta ventajosa la utilización del mismo para la detección de *T. vaginalis*. Los oligonucleótidos dados a conocer se diseñan para detectar el gen *AP65-1* debido a la probabilidad de reacción cruzada/detección con otros organismos o células eucarióticas que podrían encontrarse presentes en la muestra del paciente es mínima.

Las sondas oligonucleotídicas y conjuntos de sondas indicados en la presente memoria están diseñados específicamente para presentar como diana el ácido nucleico del gen *AP65-1* y pueden utilizarse para detectar *T. vaginalis*. Más concretamente, los oligonucleótidos presentan como diana la parte conservada del gen *AP65-1* de *T. vaginalis*. Las formas de realización indicadas en la presente memoria proporcionan oligonucleótidos que seleccionan una secuencia de ácidos nucleicos en *T. vaginalis*.

Los conjuntos de sondas proporcionan una señal detectable en el caso de que el área que es la diana de los oligonucleótidos se encuentre presente en la muestra. Lo anterior es una indicación altamente fiable de la presencia del gen *AP65-1* y, a su vez, es una indicación altamente fiable de *Trichomonas vaginalis*.

En las formas de realización preferidas, las sondas oligonucleotídicas y conjuntos de sondas se configuran para someter a ensayo el gen *AP65-1* utilizando la detección de secuencias de ADN. Con frecuencia, los ensayos de detección implican la utilización de la amplificación o la obtención de imágenes para confirmar la presencia de ADN. Entre dichas reacciones se incluyen ADC, ADCT o ADCT fluorescente en tiempo real homogénea. Estos métodos son conocidos por el experto en la materia a partir de referencias tales como las patentes US nº 5.547.861, nº 5.648.211, nº 5.928.869 y nº 5.846.726.

También pueden utilizarse otros métodos, tales como la PCR (por ejemplo la PCR Taqman®), la AMT y la RCL. Además, se da a conocer un kit para detectar *T. vaginalis*.

Los oligonucleótidos indicados en la presente memoria presentan como diana el gen *AP65-1* contenido dentro de *T. vaginalis*. El gen *AP65-1* es conocido de la técnica y su secuencia presenta una longitud aproximada de 1,7 kb. Ver el número de acceso de Genbank U18346.

En la Tabla 3, a continuación, se presenta uno de dichos conjuntos de sondas, diseñado específicamente para el ensayo de ADC.

Tabla 3

SEC ID	Descripción	Secuencia oligonucleótida 5'-3'	~Tf (°C)	Localización de ORF* (pb)
SEC ID nº 7	Elemento de desplazamiento izquierdo (cadena arriba)	ACCAACTGTCGGTGAAG	52	352-368
SEC ID nº 21	Elemento de desplazamiento izquierdo (cadena arriba)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGG <u>ACCGCGGCATCTAC</u>	46	402-415
SEC ID nº 8	Elemento de desplazamiento derecho (cadena abajo)	GAGACCGAGAATAC	42	507-520
SEC ID nº 22	Elemento de desplazamiento derecho (cadena abajo)	ACCGCATCGAATGACTGT CTCGGG <u>ATGTCCTGGCGTG</u>	42	465-477
SEC ID nº 23	Sonda detectora	(6-Fam)-TCCCCGAG (dT)-Dabcilo <u>GGACATCCTCCGCAACTAC</u>	60	445-463

*nº de acceso de GenBank U18346

El oligonucleótido de desplazamiento izquierdo (ACCAACTGTCGGTGAAG, SEC ID nº 7) puede hibridarse con una secuencia diana complementaria contenida dentro del gen *AP65-1*. Más concretamente, el elemento de desplazamiento ("bumper") izquierdo se une a la localización en aproximadamente 352-368 pares de bases del gen *AP65-1*. Esta secuencia oligonucleotídica ha sido diseñada específicamente para unirse a dicha región particular del gen *AP65-1*.

El oligonucleótido cebador izquierdo incluye SEC ID nº 9 (ACCGCGGCATCTAC) y puede hibridarse con una secuencia diana complementaria contenida dentro del gen *AP65-1*. Más concretamente, el cebador izquierdo se une a la localización en aproximadamente los pares de bases 402-415 del gen *AP65-1*. El cebador izquierdo ha sido diseñado específicamente para unirse a dicha región particular del gen *AP65-1*.

El oligonucleótido de desplazamiento derecho (GAGACCGAGAATAC, SEC ID nº 8) puede hibridarse con una secuencia diana complementaria contenida dentro del gen *AP65-1*. Más concretamente, el elemento de desplazamiento derecho del gen *AP65-1* se une a la localización en los pares de bases 507-520 del gen *AP65-1*. Esta secuencia oligonucleotídica ha sido diseñada para unirse a dicha región particular del gen *AP65-1*.

El oligonucleótido cebador derecho contiene la SEC ID nº 10 (ATGTCCTGGCGTG) y puede hibridarse con una secuencia diana complementaria contenida dentro del gen *AP65-1*. Más concretamente, el cebador derecho se une a la localización en aproximadamente los pares de bases 465-477 del gen *AP65-1*.

La sonda oligonucleotídica que contiene la SEC ID nº 11 (GGACATCCTCCGCAACTAC) ha sido diseñada para unirse específicamente a los pares de bases 445-463 del gen *AP65-1*.

Las sondas indicadas anteriormente se describen en términos de que son 100% complementarias a las secuencias de unión a diana de las mismas. Tal como se indica posteriormente, los cebadores y sondas pueden unirse a secuencias diana aunque sean menos de 100% complementarias a dichas regiones. El grado requerido de complementariedad depende de una diversidad de factores, entre ellos la astringencia de las condiciones de unión. Dependiendo de las condiciones de astringencia utilizadas, los cebadores y sondas pueden modificarse para incluir diferentes bases en su secuencia y todavía ser suficientemente complementarios para unirse a la región diana del ácido nucleico de *AP65-1*. La expresión suficientemente complementario, tal como se utiliza en la presente memoria,

incluye una complementariedad de 70% o superior. En formas de realización preferidas, la complementariedad de los cebadores/sondas a su secuencia diana es de por lo menos 80% a lo largo de la longitud de la parte de unión de los cebadores/sondas. Más preferentemente, la complementariedad de los cebadores y sondas respecto a las secuencias diana de los mismos es de 90% o superior.

Aunque los oligonucleótidos indicados en la presente memoria deben ser suficientemente complementarios para unirse a las partes respectivas del ácido nucleico de *AP65-1*, se reconoce que en cierto punto la secuencia del oligonucleótido se convierte en menos complementaria respecto a la secuencia en el ácido nucleico de *AP65-1* y puede unirse a otras secuencias de ácidos nucleicos. Por lo tanto, resulta deseable que las sondas oligonucleotídicas sigan siendo suficientemente complementarias a la parte respectiva de las mismas del gen *AP65-1* y no pierdan selectividad para el sitio de unión a diana respectivo.

El conjunto de sondas oligonucleotídicas indicado anteriormente se configura para la utilización en la ADC. Sin embargo, debe apreciarse que mediante experimentación rutinaria el experto en la materia podrá utilizar las secuencias oligonucleótidas indicadas en la presente memoria con o sin modificación como sondas para la utilización en otros ensayos.

Los oligonucleótidos indicados en la presente memoria pueden utilizarse para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos dentro de la región diana del gen *AP65-1*. Además, cualquier secuencia que pueda producirse como resultado de una reacción de amplificación, denominada producto de amplificación, amplicón o amplicón, puede servir como secuencia diana amplificable para los oligonucleótidos indicados en la presente memoria.

En el contexto de la ADC, el conjunto de sondas oligonucleotídicas indicadas puede amplificar una porción de 75 pares de bases del gen *AP65-1*. De esta manera, los oligonucleótidos pueden amplificar una secuencia de ácidos nucleicos de *AP65-1* natural, la segunda cadena complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos del gen *AP65-1* natural y cualquiera de las cadenas de una copia de la secuencia del gen *AP65-1* natural, los cuales pueden producirse como resultado de una reacción de amplificación.

Generalmente se utiliza un cebador de amplificación para amplificar una secuencia diana mediante extensión del cebador después de la hibridación con la secuencia diana. Los cebadores de amplificación típicamente presentan una longitud de aproximadamente 10 a 75 nucleótidos, preferentemente presentan una longitud de aproximadamente 15 a 50 nucleótidos. La longitud total del cebador de amplificación para la utilización en la ADC típicamente es de aproximadamente 25 a 50 nucleótidos.

Un cebador de amplificación de una forma de realización de la invención tal como se indica en la presente memoria resulta útil para la ADC y generalmente presenta tres tipos de secuencia. Una secuencia, una secuencia de unión a la diana, dentro del cebador puede ser capaz de unirse o hibridarse con la secuencia diana. Otra secuencia dentro del cebador puede ser un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. Todavía otra secuencia dentro del cebador puede actuar como secuencia de nuevo cebado.

La secuencia de unión a diana dentro del cebador oligonucleotídico de amplificación generalmente puede encontrarse localizada en el extremo 3' de la misma. La secuencia de unión a diana puede presentar una longitud de entre aproximadamente 10 y 25 nucleótidos y puede presentar especificidad de hibridación con el cebador de amplificación. De esta manera, se entiende que el experto en la materia puede modificar la secuencia de unión a diana para modificar eficazmente la especificidad de hibridación del cebador de amplificación y dirigir la hibridación a una secuencia alternativa.

Un cebador de amplificación de ADC también puede presentar un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción 5' respecto a la secuencia de unión a la diana. El sitio de reconocimiento en el cebador de amplificación puede permitir que una endonucleasa de restricción realice un corte en una cadena de un ADN dúplex en el caso de que el sitio de reconocimiento esté hemimodificado. Lo anterior ha sido descrito por G. Walker et al. (PNAS 89:392-396, 1992, y Nucl. Acids Res. 20:1691-1696, 1992). Los nucleótidos 5' respecto al sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción (la "cola") funcionan como sitio de nuevo cebado de la polimerasa al cortarse y desplazarse una muesca en el resto del cebador de amplificación durante la ADC.

La función de nuevo cebado de los nucleótidos de cola sostiene la reacción de ADC y puede permitir la síntesis de múltiples amplicones a partir de una única molécula diana. La cola generalmente presenta una longitud de aproximadamente 10 a 25 nucleótidos. Su longitud y secuencia generalmente no resultan críticos y pueden seleccionarse y modificarse rutinariamente. Debido a que la secuencia de unión a diana es la parte del cebador que determina su especificidad de diana, para los métodos de amplificación que no requieren secuencias especializadas en los extremos de la diana, el cebador de amplificación generalmente consiste esencialmente de únicamente la secuencia de unión a diana. Para los métodos de amplificación que requieren secuencias especializadas unidas a la diana diferentes del sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción cortable y la cola para la ADC (por ejemplo un promotor de ARN polimerasa para la amplificación 3SR, ABSAN o basada en la transcripción) puede requerir secuencias especializadas para unir la secuencia de unión a diana. Lo anterior puede llevarse a cabo utilizando métodos rutinarios para la preparación de oligonucleótidos sin alterar la especificidad de hibridación del

cebador.

La Tabla 3 ilustra dos oligonucleótidos que resultan útiles como cebadores de amplificación en el contexto de la ADC. Los cebadores de amplificación, el cebador izquierdo y el cebador derecho, se muestran con las secuencias de unión a diana subrayadas. Estas partes pueden hibridarse con una secuencia diana del gen *AP65-1*. Las secuencias en negrita indican un sitio de enzima de restricción. La secuencia sin ningún marcaje puede actuar como la región de cola.

Un cebador de desplazamiento o cebador externo es un cebador utilizado para desplazar los productos de extensión de cebador en reacciones de amplificación isotérmicas. El cebador de desplazamiento puede aparearse con una secuencia diana cadena arriba del cebador de amplificación de manera que la extensión del cebador de desplazamiento puede desplazar el cebador de amplificación cadena abajo y el producto de extensión del mismo. Dos oligonucleótidos, el elemento de desplazamiento izquierdo y el elemento de desplazamiento derecho, indicados en la Tabla 3, pueden resultar útiles como cebadores de desplazamiento en el contexto de la ADC. La Tabla 3 indica además la sonda/detector de ADC. Las posiciones de hibridación de las sondas indicadas en la Tabla 3 con el gen *AP65-1* utilizadas en un contexto de la ADC se ilustran en la figura 1.

La secuencia diana producida mediante hibridación de un cebador y la extensión del cebador por parte de la polimerasa utilizando la secuencia molde diana puede denominarse producto de extensión a los fines de análisis en la presente memoria.

En una forma de realización, se ha diseñado un sistema de ADC que comprende la detección directa utilizando un formato lineal de sonda detectora. El tamaño de amplicón de ADC es de aproximadamente 80 pares de bases de longitud y no contiene sitios BsoB I. Se utilizó el software Oligo 6.0 para garantizar que no existe ninguna estructura secundaria o interacciones significativas entre los oligonucleótidos que afecten negativamente al rendimiento de la ADC. Cada uno de los oligos en el diseño de la ADC de *T. vaginalis* se comprobó utilizando el sitio de la NCBI (Blast) y ninguno mostró homología significativa con ningún organismo relevante que se esperase aislar a partir de un espécimen genitourinario. De esta manera, se espera que la reactividad cruzada sea mínima, en caso de existir, con otros organismos que se espere aislar a partir de un espécimen genitourinario.

El experto en la materia apreciará que los oligonucleótidos tales como los utilizados en los ensayos de amplificación pueden modificarse en cierta medida sin pérdida de utilidad o especificidad para una secuencia diana en *T. vaginalis*, por ejemplo el gen *AP65-1*. Por ejemplo, tal como es conocido de la técnica, la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos complementarias y parcialmente complementarias puede conseguirse mediante ajuste de las condiciones de hibridación para incrementar o reducir la astringencia (es decir, el ajuste de la temperatura de hibridación o el contenido salino del tampón). Dichas modificaciones menores de las secuencias dadas a conocer y cualesquiera ajustes necesarios de las condiciones de hibridación para mantener la especificidad para *T. vaginalis* requieren únicamente la experimentación rutinaria y se encuentran dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia.

Como guía general para el diseño de los oligonucleótidos útiles como cebadores, la T_f se reduce aproximadamente 1°C-1,5°C con cada reducción de 1% de la homología de las secuencias. Los intervalos de temperatura pueden variar entre aproximadamente 50°C y 62°C, pero los cebadores de amplificación pueden diseñarse para ser óptimos a 52°C. Sin embargo, las temperaturas inferiores a 50°C pueden resultar en cebadores que no presentan especificidad, mientras que las temperaturas superiores a 62°C pueden resultar en la falta de hibridación. Una consideración adicional al diseñar los cebadores de amplificación puede ser el contenido de guaninas y citosinas. Generalmente, el contenido de GC de un cebador puede ser de aproximadamente 60% a 70%, aunque también puede ser inferior y puede ser adecuadamente ajustado por el experto en la materia. La región hibridante de la secuencia de unión a diana puede presentar una T_f de aproximadamente 42°C a 48°C. Las secuencias de ácidos nucleicos complementarias y parcialmente complementarias de apareamiento pueden obtenerse mediante modificación de las condiciones de apareamiento para incrementar o reducir la astringencia (es decir, ajustando la temperatura de apareamiento o el contenido de sales del tampón). Las modificaciones tales como las de las secuencias dadas a conocer y cualesquiera ajustes necesarios de las condiciones de apareamiento para mantener la especificidad del gen *AP65-1* requieren únicamente experimentación rutinaria y se encuentran dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia.

Los productos de amplificación generados utilizando los cebadores de la invención pueden detectarse a partir de un tamaño característico, por ejemplo en geles de poliacrilamida o agarosa teñidos con bromuro de etidio. La secuencia diana del gen *AP65-1* de *T. vaginalis* amplificado se detecta mediante una sonda de ensayo, que es un oligonucleótido etiquetado con un marcaje detectable. En una forma de realización, puede utilizarse por lo menos una sonda de ensayo etiquetada para la detección de secuencias diana amplificadas mediante hibridación (una sonda detectora), mediante hibridación y extensión tal como indican Walker et al., Nucl. Acids Res., *supra* (un cebador detector), o mediante hibridación, extensión y conversión en la forma de doble cadena, tal como se indica en el documento EP 0 678 582 (un cebador de señal). La sonda de ensayo se selecciona para hibridarse con una secuencia en la diana que se encuentra entre los cebadores de amplificación, es decir, es una sonda de ensayo interna.

El marcaje detectable de la sonda de ensayo puede ser una fracción que puede detectarse directa o indirectamente como indicación de la presencia del ácido nucleico diana. Para la detección directa del marcaje, pueden etiquetarse sondas de ensayo con un isótopo radioactivo y detectarse mediante autorradiografía o etiquetarse con una fracción fluorescente y detectarse mediante fluorescencia, tal como es conocido de la técnica. Alternativamente, las sondas de ensayo pueden detectarse indirectamente mediante etiquetaje con un marcaje que requiere reactivos adicionales para convertirlo en detectable. Entre los marcajes indirectamente detectables se incluyen, pro ejemplo, los agentes quimioluminiscentes, los enzimas que producen productos y ligandos de reacción visibles (por ejemplo haptenos, anticuerpos o antígenos) que pueden detectarse mediante unión a parejas de unión específicas marcadas (por ejemplo anticuerpos o antígenos/haptenos). Los ligandos también resultan útiles para inmovilizar el oligonucleótido marcado con ligando (la sonda de captura) en una fase sólida para facilitar su detección. Entre los marcajes particularmente útiles se incluyen biotina (detectable mediante la unión a avidina o estreptavidina marcada) y enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina (detectable mediante la adición de sustratos enzimáticos para producir productos de reacción de color). Los métodos para añadir dichos marcajes a, o para incluir dichos marcajes en, oligonucleótidos son bien conocidos de la técnica y cualesquiera de dichos métodos resultan adecuados para la utilización en la invención descrita en la presente memoria.

Entre los ejemplos de métodos de detección específicos que pueden utilizarse se incluyen un método quimioluminiscente en el que los productos amplificados se detectan utilizando una sonda de captura biotinilada y una sonda detectora conjugada con enzima tal como se indica en la patente US nº 5.470.723. Tras la hibridación de dichas dos sondas de ensayo a sitios diferentes en la región de ensayo de la secuencia diana (entre los sitios de unión de dos cebadores de amplificación), el complejo puede capturarse en una palca de microtitulación recubierta con estreptavidina mediante la sonda de captura, y revelarse la señal quimioluminiscente y leerse en un luminómetro. Como otra alternativa para la detección de productos de amplificación, un cebador de señal tal como se indica en el documento EP 0 678 582 puede incluirse en la reacción de ADC. En dicha forma de realización, se generan productos de amplificación secundaria marcados durante la ADC de una manera dependiente de la amplificación de la diana y puede detectarse como indicación de la amplificación de la diana mediante el marcaje asociado.

La hibridación del oligonucleótido puede ser específica de especie. Es decir, la detección, amplificación o hibridación del oligonucleótido en una especie u organismo o un grupo de especies relacionadas puede producirse sin detección, amplificación o hibridación de oligonucleótidos sustancial en otra especie del mismo género o especie de un género diferente. Los oligonucleótidos dados a conocer en la presente memoria pueden resultar útiles para identificar las tres cepas de *T. vaginalis*. Lo anterior incluye las cepas 286, 272 e IR78.

Pueden añadirse opcionalmente otras secuencias, según se requiera para realizar una reacción de amplificación seleccionada, a las secuencias de unión a diana dadas a conocer en la presente memoria sin alterar la especificidad de especie del oligonucleótido. A título de ejemplo, los cebadores de amplificación específicos de AP65-1 de *T. vaginalis* de la invención pueden contener un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BsoBI que crea una mella durante la reacción de ADC.

Resultará evidente para el experto en la materia que otros sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción mellables pueden sustituirse por el sitio de reconocimiento BsoBI, incluyendo, aunque sin limitación, los sitios de reconocimiento dados a conocer en el documento EP 0 684 315. Preferentemente, el sitio de reconocimiento es para una endonucleasa de restricción termofílica de manera que la reacción de amplificación puede llevarse a cabo bajo las condiciones de la ADC termofílica (ADCt). De manera similar, la secuencia de cola del cebador de amplificación (5' respecto al sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción) generalmente no resulta crítica, aunque debe evitarse el sitio de restricción utilizado para la ADC y las secuencias que se hibridan con su propia secuencia de unión a diana o con los otros cebadores.

Por lo tanto, algunos cebadores de amplificación para la ADC según la invención consisten de secuencias 3' de unión a la diana, un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción mellable 5' respecto a la secuencia de unión a diana y una secuencia de cola de aproximadamente 10 a 25 nucleótidos de longitud 5' respecto al sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. El sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción mellable y la secuencia de cola son secuencias requeridas para la reacción de ADC. Para otras reacciones de amplificación, los cebadores de amplificación según la invención pueden consistir de las secuencias de unión a diana dadas a conocer únicamente (por ejemplo para la PCR) o la secuencia de unión a diana y secuencias adicionales requeridas para la reacción de amplificación seleccionada (por ejemplo las secuencias requeridas para la ADC tal como se ha indicado anteriormente o un promotor reconocido por la ARN polimerasa para 3SR).

En la ADC, los cebadores de desplazamiento no resultan esenciales para la especificidad de especie, ya que funcionan desplazando los cebadores de amplificación específicos de especie cadena abajo. Sólo se requiere que los cebadores de desplazamiento se hibriden con la diana cadena arriba de los cebadores de amplificación de manera que al extenderse desplacen el cebador de amplificación y el producto de extensión del mismo. Por lo tanto, la secuencia particular del cebador de desplazamiento generalmente no resulta crítica y puede derivarse de cualquier secuencia diana cadena arriba (respecto al cebador de amplificación izquierdo) o cadena abajo (respecto

al cebador de amplificación derecho) que se encuentre suficientemente próxima al sitio de unión del cebador de amplificación para permitir el desplazamiento del producto de extensión del cebador de amplificación con la extensión del cebador de desplazamiento. Los desapareamientos ocasionales con la diana en la secuencia del cebador de desplazamiento o alguna hibridación cruzada con secuencias no diana generalmente no afectan negativamente a la eficiencia de la amplificación con la condición de que el cebador de desplazamiento siga siendo capaz de hibridarse con la secuencia diana específica. Sin embargo, los cebadores de desplazamiento indicados en la presente memoria son específicos de especie, específicos de *T. vaginalis*, y por lo tanto también pueden utilizarse como secuencias de unión a diana en cebadores de amplificación, si se desea.

Las reacciones de amplificación que utilizan los cebadores indicados en la presente memoria pueden incorporar timina, tal como enseñan Walker et al., *supra*, o pueden sustituir total o parcialmente 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato en lugar de TTP en la reacción para reducir la contaminación cruzada de las reacciones de amplificación posteriores, por ejemplo tal como se enseña en el documento EP 0 624 643. La dU (uridina) se incorpora en los productos de amplificación y puede extraerse mediante tratamiento con uracil-ADN glucosilasa (UDG). Estos sitios básicos convierten al producto de amplificación en no amplificable en las reacciones de amplificación posteriores. La UDG puede inactivarse con el inhibidor de uracil-ADN glucosilasa (Ugi) antes de llevar a cabo la amplificación posterior para evitar la extracción de dUU en los productos de amplificación de nueva formación.

Pueden utilizarse otros sistemas para llevar a cabo la ADCt utilizando diferentes combinaciones de cebadores, elementos de desplazamiento y detectores. Estos sistemas son bien conocidos por el experto en la materia y no se comentan en detalle en la presente memoria.

Puede prepararse una mezcla de cebadores que contenga un cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo. La mezcla de cebadores contiene además los elementos de desplazamiento cadena arriba y cadena abajo. Los cebadores y elementos de desplazamiento pueden utilizarse a concentraciones finales de aproximadamente 0,5 y 0,05 μ M, respectivamente.

El oligonucleótido u oligonucleótidos utilizados para facilitar la detección o identificación de un ácido nucleico pueden utilizarse como sonda de ensayo. Por ejemplo, en la invención descrita en la presente memoria, pueden utilizarse sondas de ensayo para la detección o identificación de los ácidos nucleicos de AP65-1 de *T. vaginalis*. Las sondas detectoras, cebadores detectores, sonda de captura y cebadores de señal tales como los indicados posteriormente son ejemplos de sondas de ensayo.

Los cebadores y sondas se utilizan preferentemente en un método de transferencia de energía fluorescencia en tiempo de ADCt. La amplificación por desplazamiento de cadena (ADC) es un método isotérmico de amplificación de los ácidos nucleicos en el que la extensión de cebadores, creación de mellas de un sitio de reconocimiento/corte de endonucleasa de restricción hemimodificado, desplazamiento de productos de extensión de cadena sencilla, apareamiento de cebadores con los productos de extensión (o la secuencia diana original) y la posterior extensión de los cebadores ocurren concurrentemente en la mezcla de reacción. Lo anterior contrasta con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que las etapas de la reacción ocurren en fases o ciclos discretos como resultado de las características de ciclado de la temperatura de la reacción. La ADC se basa en: 1) la capacidad de una endonucleasa de restricción de crear una mella en la cadena no modificada de una forma hemifosforotioato de su sitio de reconocimiento/corte de doble cadena, y 2) la capacidad de determinadas polimerasas de iniciar la replicación en la mella y desplazar la cadena que no es molde cadena abajo. Tras una incubación inicial a temperatura incrementada (aproximadamente 95°C) para desnaturalizar las secuencias diana de doble cadena para el apareamiento de los cebadores, tiene lugar a temperatura constante la polimerización y desplazamiento posteriores de las cadenas de nueva síntesis.

La producción de cada nueva copia de la secuencia diana consiste de cinco etapas: 1) unión de cebadores de amplificación a una secuencia diana original o un producto de extensión de cadena sencilla desplazado que ha sido polimerizado previamente, 2) extensión de los cebadores por una polimerasa deficiente en exonucleasa 5'-3' que incorpora un a-tio-desoxinucleósido trifosfato (a-tio dNTP), 3) creación de mella en un sitio de restricción de doble cadena hemimodificado, 4) disociación del enzima de restricción del sitio de la mella, y 5) extensión desde el extremo 3' de la mella por la polimerasa deficiente en exonucleasa 5'-3' con desplazamiento de la cadena de nueva síntesis cadena abajo. La creación de mella, la polimerización y el desplazamiento ocurren concurrente y continuamente a una temperatura constante debido a que la extensión a partir de la mella regenera otro sitio de restricción mellable.

En el caso de que se utilice un par de cebadores de amplificación, cada uno de los cuales se hibrida con una de las dos cadenas de una secuencia diana de doble cadena, la amplificación es exponencial. Esto se debe a que las cadenas de sentido y antisentido sirven como moldes para el cebador contrario en posteriores rondas de amplificación. En el caso de que se utilice un único cebador de amplificación, la amplificación es lineal debido a que únicamente una cadena sirve como molde para la extensión del cebador. Son ejemplos de endonucleasas de restricción que crean mellas en sus sitios de reconocimiento/corte de doble cadena al incorporarse un a-tio dTP, HincII, HindII, Aval, NciI y Fnu4HI. La totalidad de dichas endonucleasas de restricción y otras que muestran la actividad de creación de mella requerida resultan adecuadas para la utilización en la ADC convencional. Sin

embargo, son relativamente termolábiles y pierde actividad a más de aproximadamente 40°C.

Pueden prepararse dianas para la amplificación mediante ADC mediante la fragmentación de ácidos nucleicos de mayor tamaño mediante restricción con una endonucleasa que no corte la secuencia diana. Sin embargo, resulta generalmente preferente que los ácidos nucleicos diana que presentan los sitios de reconocimiento/corte de endonucleasa de restricción seleccionados para la creación de mella en la reacción de ADC se generen tal como se indica en Walker et al. (Nuc. Acids Res., *supra*) y en la patente US nº 5.270.184. Brevemente, en el caso de que la secuencia diana sea de doble cadena, se hibridan a la misma cuatro cebadores. Dos de los cebadores (S1 y S2) son cebadores de amplificación de ADC y dos (B1 y B2) son cebadores externos o de desplazamiento. S1 y S2 se unen a cadenas contrarias de ácidos nucleicos de doble cadena que flanquean la secuencia diana. B1 y B2 se unen a la secuencia diana 5' respecto a S1 y S2, respectivamente. A continuación, se utiliza la polimerasa deficiente en exonucleasa para extender simultáneamente la totalidad de los cuatro cebadores en presencia de tres desoxinucleósidos trifosfato (por ejemplo 2'-desoxiadenosina 5'-O-(1-tiotrifosfato), "dATP a S"). Los productos de extensión de S1 y S2 son desplazados de esta manera respecto al molde de secuencia diana original por extensión de B1 y B2. Los productos de extensión de cadena sencilla desplazados de los cebadores de amplificación sirven como dianas para la unión del cebador de amplificación y de desplazamiento contrarios (por ejemplo el producto de extensión de S1 se une a S2 y B2). El ciclo siguiente de extensión y desplazamiento resulta en dos fragmentos de ácido nucleico de doble cadena con sitios de reconocimiento/corte de endonucleasa de restricción hemimodificados en cada extremo. Estos son sustratos adecuados para la amplificación mediante ADC. Tal como en la ADC, las etapas individuales de la reacción de generación de diana ocurren concurrente y continuamente, generando secuencias diana con las secuencias de reconocimiento/corte en los extremos que se requieren para la creación de mella por el enzima de restricción en la ADC. Debido a que la totalidad de los componentes de la reacción de ADC ya se encuentra presentes en la reacción de generación de diana, las secuencias diana generadas automática y continuamente entran en el ciclo de ADC y resultan amplificadas.

Para evitar la contaminación cruzada de una reacción de ADC por los productos de amplificación de otra, puede incorporarse dUTP en el ADN amplificado por ADC en lugar de dTTP sin inhibición de la reacción de amplificación. Los ácidos nucleicos modificados con uracilo seguidamente pueden ser reconocidos específicamente e inactivados mediante tratamiento con uracil-ADN glucosilasa (UDG). Por lo tanto, en el caso de que se incorpore dUTP en el ADN amplificado por ADC en una reacción anterior, cualesquiera reacciones de ADC posteriores pueden tratarse con UDG antes de la amplificación de las dianas de doble cadena, y cualquier ADN que contenga dU de reacciones previamente amplificadas podrá convertirse en no amplificable. El ADN diana que debe amplificarse en la reacción posterior no contiene dU y no resultará afectado por el tratamiento con UDG. A continuación, la UDG podrá ser inhibida mediante tratamiento con Ugi antes de la amplificación de la diana. Alternativamente, la UDG puede ser inactivada por calor. En la ADC termofílica, la temperatura más alta de la reacción misma ($\geq 50^\circ\text{C}$) puede utilizarse para inactivar concurrentemente la UDG y amplificar la diana.

La ADC requiere una polimerasa que no presente actividad de exonucleasa 5'-3', inicie la polimerización en una mella de cadena sencilla en ácidos nucleicos de doble cadena y desplace la cadena después de la mella, generando simultáneamente una nueva cadena complementaria mediante la utilización de la cadena no mellada como molde. La polimerasa debe extender mediante la adición de nucleótidos a un 3'-OH libre. Con el fin de optimizar la reacción de ADC, también resulta deseable que la polimerasa sea altamente procesiva, para maximizar la longitud de la secuencia diana que puede amplificarse. Las polimerasas altamente procesivas son capaces de polimerizar nuevas cadenas de longitud suficiente antes de disociarse y terminar la síntesis del producto de extensión. La actividad de desplazamiento resulta esencial para la reacción de amplificación, ya que permite que la diana se encuentre disponible para la síntesis de copias adicionales y genera el producto de extensión de cadena sencilla al que un segundo cebador de amplificación puede hibridarse en reacciones de amplificación exponencial. La actividad de c

reacción de mella también resulta de gran importante ya que es esta creación de mella la que perpetúa la creación y permite iniciar rondas posteriores de amplificación de la diana.

La ADC termofílica se lleva a cabo esencialmente como la ADC convencional descrita por Walker et al. (PNAS y Nuc. Acids. Res., *supra*, 1992), con sustitución de la polimerasa termoestable deseada y la endonucleasa de restricción termoestable. Evidentemente la temperatura de reacción se ajustará a la temperatura más alta adecuada para los enzimas sustituidos y el sitio de reconocimiento/corte de la endonucleasa de restricción HincII se sustituirá por el sitio de reconocimiento/corte de endonucleasa de restricción apropiado para la endonucleasa termoestable seleccionada. También en contraste con Walker et al., el experto en la materia puede incluir los enzimas en la mezcla de reacción antes de la etapa inicial de desnaturalización en el caso de que sean suficientemente estables a la temperatura de desnaturalización. Son endonucleasas de restricción preferentes para la utilización en la ADC termofílica, BsrI, BstNI, BsmAI, BslI y BsoBI (New England BioLabs) y BstOI (Promega). Las polimerasas termofílicas preferentes son Bca (Panvera) y Bst (New England Biolabs).

La ADCt fluorescente en tiempo real homogénea es una modificación de la ADCt. Utiliza oligonucleótidos detectores para producir una inhibición reducida de la fluorescencia de una manera dependiente de la diana. Los oligonucleótidos detectores contienen una pareja de pigmentos donante/aceptor unida de manera que la inhibición de la fluorescencia se produce en ausencia de diana. El despliegue o linealización de una estructura secundaria por apareamiento de bases intramoleculares en el oligonucleótido detector en presencia de la diana incrementa la

distancia entre los pigmentos y reduce la inhibición de la fluorescencia. El despliegue de la estructura secundaria con apareamiento de bases típicamente implica apareamiento de bases intermolecular, entre la secuencia de la estructura secundaria y una cadena complementaria, de manera que la estructura secundaria resulta por lo menos parcialmente interrumpida. Puede linearizarse por completo en presencia de una cadena complementaria de longitud suficiente. En una forma de realización preferente, se encuentra presente un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción (SRER) entre los dos pigmentos de manera que el apareamiento de bases intermolecular, entre la estructura secundaria y una cadena complementaria también convierta el SRER en un sitio de doble cadena y cortable o mellable por la endonucleasa de restricción. El corte o creación de mella por parte de la endonucleasa de restricción separa los pigmentos donante y aceptor en fragmentos de ácido nucleico separados, contribuyendo adicionalmente a una menor inhibición. En cualquiera de las formas de realización, se lleva a cabo un seguimiento de los cambios asociados en un parámetro de la fluorescencia (por ejemplo un incremento de la intensidad de fluorescencia del donante, una reducción de la intensidad de fluorescencia del aceptor o una proporción de fluorescencia antes y después del despliegue) a modo de indicación de la presencia de la secuencia diana. El seguimiento de un cambio en la intensidad de fluorescencia del donante resulta preferente, ya que este cambio típicamente es mayor que el cambio en la intensidad de la fluorescencia del aceptor. También pueden seguirse otros parámetros de la fluorescencia, tales como el cambio en el tiempo de vida media de la fluorescencia.

Un oligonucleótido detector para la ADCt fluorescente en tiempo real homogénea es un oligonucleótido que comprende una sección 5' o 3' de cadena sencilla que se hibrida con la secuencia diana (la secuencia de unión a diana) y una estructura secundaria con apareamiento de bases intramolecular contigua a la secuencia de unión a diana. Los oligonucleótidos detectores de la invención comprenden además una pareja de pigmentos donante/aceptor unido al oligonucleótido detector, de manera que la fluorescencia del donante se encuentra inhibida cuando la estructura secundaria presenta apareamiento de bases intramolecular y el despliegue o linearización de la estructura secundaria resulta en una reducción de la inhibición de la fluorescencia. El corte del oligonucleótido se refiere a la rotura de los enlaces fosfodiéster de ambas cadenas de un ADN dúplex o la rotura del enlace fosfodiéster de un ADN de cadena sencilla. Esto contrasta con la creación de mellas, que se refiere a la rotura del enlace fosfodiéster de únicamente una de las dos cadenas en un ADN dúplex.

Los oligonucleótidos detectores de la invención para la ADCt fluorescente en tiempo real homogénea comprenden una secuencia que forma una estructura secundaria con apareamiento de bases intramolecular bajo las condiciones de reacción seleccionadas para la extensión o hibridación del cebador. La estructura secundaria se posiciona contiguamente a la secuencia de unión diana del oligonucleótido detector de manera que por lo menos una parte de la secuencia de unión a diana forme una cola 3' o 5' de cadena sencilla. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "contiguo a la secuencia de unión a diana" se refiere a que la totalidad o una parte de la secuencia de unión a diana se mantiene como de cadena sencilla en una cola 5' o 3' que se encuentra disponible para la hibridación con la diana. Es decir, la estructura secundaria no comprende la secuencia de unión a diana entera. Una parte de la secuencia de unión a diana puede participar en el apareamiento de bases intramolecular en la estructura secundaria, puede incluir la totalidad o parte de una primera secuencia que participa en el apareamiento de bases intramolecular en la estructura secundaria, puede incluir la totalidad o parte de una primera secuencia que participa en el apareamiento de bases intramolecular en la estructura secundaria pero preferentemente no se extiende hacia el interior de su secuencia complementaria. Por ejemplo, en el caso de que la estructura secundaria sea una estructura de tallo-bucle (por ejemplo una "horquilla") y la secuencia de unión a diana del oligonucleótido detector se encuentre presente en forma de una cola 3' de cadena sencilla, la secuencia de unión a diana puede extenderse también a través de la totalidad o parte del primer brazo del tallo y, opcionalmente, a través de la totalidad o parte del bucle. Sin embargo, la secuencia de unión a diana preferentemente no se extiende hacia el interior del segundo brazo de la secuencia que participa en el apareamiento de bases intramolecular del tallo. Es decir, resulta deseable evitar que ambas secuencias participen en el apareamiento de bases intramolecular en una estructura secundaria capaz de hibridarse con la diana. Las no correspondencias en la parte de apareamiento de bases intramolecular de la estructura secundaria del oligonucleótido detector puede reducir la magnitud del cambio de fluorescencia en presencia de diana, aunque son aceptables en el caso de que no sea importante la sensibilidad del ensayo. Las no correspondencias en la secuencia de unión a diana de la cola de cadena sencilla también son aceptables, aunque de manera similar pueden reducir la sensibilidad y/o especificidad del ensayo. Sin embargo, es una característica de la invención descrita en la presente memoria que el apareamiento de bases perfecto en tanto la estructura secundaria como la secuencia de unión a diana no compromete la reacción. Las correspondencias perfectas en la secuencias que participan en la hibridación mejora la especificidad del ensayo sin efectos negativos sobre la cinética de la reacción.

Al añadirlos a la reacción de amplificación, los cebadores de señal oligonucleótidos detectores de la invención se convierten en la forma de doble cadena mediante hibridación y extensión de un cebador de amplificación tal como se ha indicado anteriormente. El desplazamiento de cadena por la polimerasa también despliega o lineariza la estructura secundaria y la convierte en una doble cadena mediante la síntesis de una cadena complementaria. El SRER, en caso de estar presente, también se convierte en doble cadena y en cortable o mellable por la endonucleasa de restricción. Debido a que la estructura secundaria es desplegada o linearizada por la actividad de desplazamiento de cadena de la polimerasa, se incrementa la distancia entre el pigmento donante y aceptor, reduciendo de esta manera la inhibición de la fluorescencia del donante. El cambio asociado de fluorescencia del pigmento donante o aceptor puede seguirse o detectarse como indicación de la amplificación de la secuencia diana.

El corte o mellado del SERS generalmente incrementa adicionalmente la magnitud del cambio de fluorescencia mediante la producción de dos fragmentos separados del producto de amplificación secundario de doble cadena, presentando unido a cada uno de ellos uno de los dos pigmentos. Estos fragmentos pueden difundirse libremente en la solución de reacción, incrementando adicionalmente la distancia entre los pigmentos de la pareja de donador/aceptor. Un incremento de la intensidad de fluorescencia del donante o una reducción de la intensidad de fluorescencia del aceptor puede detectarse y/o seguirse como indicación de se está produciendo o se ha producido la amplificación de la diana, aunque también pueden seguirse otros parámetros de fluorescencia que resultan afectados por la proximidad de la pareja de pigmentos donante/aceptor. Por ejemplo, puede detectarse un cambio de la intensidad de fluorescencia como a) un incremento en la proporción de fluorescencia del fluoróforo donante tras linearizar o desplegar la estructura secundaria y fluorescencia del fluoróforo donante en el oligonucleótido detector antes de la linearización o despliegue, o b) como una reducción en la proporción de fluorescencia del pigmento aceptor tras la linearización o despliegue y fluorescencia del pigmento aceptor en el oligonucleótido detector antes de la linearización o despliegue.

Los oligonucleótidos indicados también pueden resultar útiles en otros ensayos de amplificación con o sin modificación. El experto ordinario en la materia será capaz de adaptar las secuencias oligonucleótidas o partes de las mismas tal como se indica en la presente memoria para otros ensayos de amplificación. Por ejemplo, el oligonucleótido indicado en la presente memoria puede resultar útil en la PCR, la AMT y la RCL con o sin modificación.

Resultará evidente que, además de la ADC, los oligonucleótidos detectores de la invención pueden adaptarse para la utilización como cebadores de señal en otros métodos de amplificación por extensión de cebador (por ejemplo PCR, 3SR, AMT o ABSAN). Por ejemplo, los métodos pueden adaptarse para la utilización en la PCR mediante la utilización de cebadores de amplificación de PCR y una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena que no presente actividad exonucleasa 5'-3' (por ejemplo Taq de grado secuenciación de Promega o exo.sup (Vent o exo.sup), Deep Vent de New England BioLabs). Los cebadores de señal oligonucleótidos detectores se hibridan con la diana cadena abajo de los cebadores de amplificación de PCR, son desplazados y se convierten en doble cadena esencialmente tal como se indica para la AMT. En la PCR, puede seleccionarse opcionalmente cualquier SERS para la utilización en el oligonucleótido detector, ya que típicamente no se encuentran presentes desoxinucleósidos trifosfato que puedan inducir la producción de muesca y no el corte del SERS. Debido a que el termociclado es una característica de la amplificación mediante PCR, la endonucleasa de restricción preferentemente se añade a baja temperatura después del ciclo final de apareamiento y extensión del cebador para la detección del resultado final de la amplificación. Sin embargo, podría encontrarse presente una endonucleasa de restricción termofílica que permanezca activa durante las etapas de temperatura alta de la reacción de PCR durante la amplificación para proporcionar un ensayo en tiempo real. Tal como en los sistemas de ADC, la linearización de la estructura secundaria y la separación de la pareja de pigmentos reduce la inhibición de la fluorescencia, con un cambio en un parámetro de la fluorescencia tal como la intensidad que sirve como indicación de la amplificación de la diana.

El cambio de la fluorescencia que resulta del despliegue o linearización de los oligonucleótidos detectores puede detectarse en un punto final seleccionado en la reacción. Sin embargo, debido a que las estructuras secundarias linearizadas se producen concurrentemente a la hibridación o extensión de los cebadores, el cambio en la fluorescencia también puede seguirse a medida que se produce la reacción, es decir, "en tiempo real". Este formato de ensayo en tiempo real homogéneo puede utilizarse para proporcionar información semicuantitativa o cuantitativa sobre la cantidad inicial de diana presente. Por ejemplo, la tasa a la que cambia la intensidad de la fluorescencia durante la reacción de despliegue o linearización (como parte de la amplificación de la diana o en métodos de detección no basados en la amplificación) es una indicación de los niveles iniciales de diana. En consecuencia, en el caso de una presencia de más copias iniciales de la secuencia diana, la fluorescencia del donante alcanzará más rápidamente un valor umbral seleccionado (es decir, un menor tiempo hasta la positividad). La reducción de la fluorescencia del aceptor de manera similar muestra un tiempo más corto hasta la positividad, detectado como el tiempo necesario para alcanzar un valor mínimo seleccionado. Además, la tasa de cambio de los parámetros de fluorescencia durante el curso de la reacción es más rápida en muestras que contienen cantidades iniciales más altas de diana que en muestras que contienen cantidades iniciales más bajas de diana (es decir, una pendiente incrementada de la curva de fluorescencia). Pueden llevarse a cabo estas mediciones u otras conocidas de la técnica a modo de indicación de la presencia de la diana o de indicación de la amplificación de la diana. La cantidad inicial de diana típicamente se determina mediante comparación de los resultados experimentales con resultados para cantidades conocidas de diana.

Los ensayos para la presencia de una secuencia diana seleccionada según los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en solución o sobre una fase sólida. Los ensayos homogéneos en tiempo real o de punto final en los que el oligonucleótido detector funciona como cebador típicamente se llevan a cabo en solución. Los ensayos de hibridación que utilizan los oligonucleótidos detectores de la invención también pueden llevarse a cabo en solución (por ejemplo como ensayos en tiempo real homogéneos) aunque también resultan particularmente adecuados para ensayos en fase sólida para la detección en tiempo real o de punto final de la diana. En un ensayo en fase sólida, los oligonucleótidos detectores pueden inmovilizarse sobre la fase sólida (por ejemplo perlas, membranas o el recipiente de reacción) mediante marcajes internos o terminales utilizando métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, puede inmovilizarse un oligonucleótido detector marcado con biotina sobre una fase sólida modificada con avidina en donde producirá un cambio de fluorescencia al ser expuesto a la diana bajo condiciones de hibridación apropiadas. La captura de la diana de esta manera facilita la separación de la diana respecto de la muestra y permite la eliminación de sustancias en la muestra que podrían interferir con la detección de la señal u otros aspectos del ensayo.

Por conveniencia comercial, los oligonucleótidos útiles para la detección e identificación específicas de los ácidos nucleicos de AP65-1 de *T. vaginalis* pueden empaquetarse en forma de un kit. Típicamente, dicho kit contiene los oligonucleótidos según la invención. Los reactivos para llevar a cabo la reacción de amplificación de ácidos nucleicos también pueden incluirse con los oligonucleótidos específicos de AP65-1 de *T. vaginalis*. Por ejemplo, pueden incluirse tampones, otros oligonucleótidos, nucleótidos trifosfato, enzimas, etc. Los componentes del kit pueden empaquetarse juntos en un mismo recipiente. Opcionalmente pueden incluirse instrucciones que ilustran una forma de realización descrita para llevar a cabo una forma de realización específica de los métodos inventivos. También pueden incluirse en el kit otros componentes opcionales, por ejemplo un oligonucleótido etiquetado con un marcaje adecuado para la utilización como sonda de ensayo y/o reactivos o medios para detectar el marcaje.

En una forma de realización, un kit puede incluir por lo menos un oligonucleótido útil en el contexto de la ADC. Los oligonucleótidos indicados en la presente memoria pueden resultar útiles como cebadores de amplificación, cebadores de desplazamiento o sondas.

En otra forma de realización, el kit puede incluir por lo menos un oligonucleótido indicado en la presente memoria y componentes opcionales útiles en el contexto de la ADC. Dichos componentes opcionales pueden ser tampones, nucleótidos trifosfato, enzimas, etc. Opcionalmente, los reactivos para la detección simultánea de una secuencia diana, tal como una sonda, pueden incluirse en el kit. El experto en la materia conocerá cómo optimizar dicho kit para las reacciones de amplificación con el fin de detectar e identificar *T. vaginalis* utilizando los oligonucleótidos indicados en la presente memoria.

En todavía otra forma de realización, el kit puede utilizarse para detectar y diagnosticar si una muestra clínica contiene ADN de AP65-1 de *T. vaginalis*. La muestra clínica puede añadirse al kit de manera que puede amplificarse y detectarse una secuencia de ácidos nucleicos utilizando los oligonucleótidos indicados en la presente memoria.

Además, el kit puede incluir oligonucleótidos y reactivos para la ADC en formato seco o líquido. Los componentes del kit pueden ser más estables y fáciles de manipular en formato seco. Los componentes secos del kit pueden añadirse o pretratarse a una fase sólida, tal como una placa de microtitulación, micromatriz u otro receptáculo apropiado, en el que sólo se requiere añadir la muestra y tampón de ADC. Este formato facilita el ensayo de múltiples muestras simultáneamente y resulta útil en método de alto rendimiento. Pueden utilizarse los instrumentos BD ProbeTec™ y Viper™ XTR.

Los Ejemplos a continuación ilustran unas formas de realización específicas de la invención descrita en la presente memoria. Tal como resultará evidente para el experto en la materia, son posibles diversos cambios y modificaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: sensibilidad del ensayo

Se evaluó la sensibilidad analítica de *Trichomonas vaginalis* ATCC nº 30001 utilizando el ensayo de ADC a 10^4 /reacción, 10^3 /reacción y 10^2 /reacción que contiene un tampón de bicina/KOH (pH 8,6) con cosolventes. El sistema de ADC con diana en la región conservada del gen AP65-1 se sometió a ensayo frente a cuatro réplicas del gen AP65-1 (Tabla 4). La sensibilidad del ensayo de ADC de *T. vaginalis* puede considerarse igual o inferior a las 20 copias de diana en cada ensayo.

Tabla 4

Sensibilidad de ensayo

Réplica	10^4 /reacción	10^3 /reacción	10^2 /reacción
1	Positivo	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Positivo
3	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Positivo

El ensayo de ADC del gen AP65-1 presenta como diana una región de 75 pb del gen AP65-1 entre los pares de bases 402 y 477.

Ejemplo 2: sistema de PCR Taqman® para la detección de AP65-1

Se diseñaron conjuntos de sondas para llevar a cabo la PCR Taqman® del gen AP65-1. La PCR en tiempo real Taqman® es un tipo de PCR cuantitativa. Taqman® utiliza una sonda fluorogénica que es un oligonucleótido de cadena sencilla de 20 a 26 nucleótidos y está diseñado para unirse únicamente a la secuencia de ADN entre los dos cebadores de PCR. En Taqman®, los pigmentos informadores y pigmentos inhibidores se unen a la sonda. La sonda se hibrida con el ADN alternando la temperatura para desnaturalizar y rehibridar el ADN. La polimerasa Taq añade nucleótidos al ADN diana y ésta elimina la sonda Taqman® del ADN molde. Al separar el pigmento informador del pigmento inhibidor, el pigmento informador emite energía que es detectable. La energía se cuantifica utilizando un ordenador, que proporciona una señal que indica que la diana ha sido detectada.

Para poner en práctica la PCR Taqman®, se utilizan dos cebadores de PCR con un tamaño de producto preferente de entre 50 y 150 pares de bases y una sonda con un informador fluorescente, o fluoróforo (por ejemplo 6-carboxifluoresceína (FAM) y tetraclorofluoresceína (TET)) y un inhibidor tal como tetrametilrodamina (TAMRA) unido covalentemente a sus extremos 5' y 3'. Los informadores fluorescentes y fluoróforos adecuados son bien conocidos y no se describen en detalle en la presente memoria. Se describen tres conjuntos de sondas Taqman® ejemplares para la utilización en el gen AP65-1 altamente conservado en la Tabla 7, a continuación.

Cada conjunto de sondas consiste de un cebador directo (CD), un cebador inverso (CI) y una sonda (S).

Tabla 7: ejemplos de conjuntos de sondas de PCR Taqman®

SEC ID nº	Nombre	Descripción	5' Secuencia 3'	~Tf (°C)	Localización del ORF (pb)
SEC ID nº 12	CD de Taqman® de AP65-1	Cebador directo Taqman® de AP65-1	GAAGATTCTGGCAAGATCAAGGA	58	448-470
SEC ID nº 13	CI de Taqman® de AP65-1	Cebador inverso Taqman® de AP65-1	ACGACAATGCAGCGGATGT	59	497-515
SEC ID nº 14	S de Taqman® de AP65-1	Sonda Taqman® de AP65-1	ATCCTCCGCAACTACCCACGCCA	69	472-494
SEC ID nº 15	CD2 de Taqman® de AP65-1	Cebador directo Taqman® 2 de AP65-1	TTCACACCAACTGTCGGTGAAG	59	369-391
SEC ID nº 16	CI2 de Taqman® de AP65-1	Cebador inverso Taqman® 2 de AP65-1	ATGTAGATGCCGCGGTATGAT	58	420-440
SEC ID nº 17	S2 de Taqman® de AP65-1	Sonda Taqman® 2 de AP65-1	TTGCCAGAAGTGGGCTACACACA CCGTC	70	393-418
SEC ID nº 18	CD3 de Taqman® de AP65-1	Cebador directo Taqman® 3 de AP65-1	CAGAGGAAACAATGCCAATTCTT	58	347-369
SEC ID nº 19	CI3 de Taqman® de AP65-1	Cebador inverso Taqman® 3 de AP65-1	TGACGGTGTGTAGCCCACTTC	60	399-419
SEC ID nº 20	S3 de Taqman® de AP65-1	Sonda Taqman® 3 de AP65-1	ACACCAACTGTCGGTGAAGCTTG CC	68	373-397

Las sondas se diseñan para aparearse con la localización de ORG en el gen AP65-1 que se indica en la Tabla. La figura 2 ilustra los sitios de unión en el gen AP65-1 para los cebadores y sondas indicados en la Tabla 7.

Además de los cebadores y sondas, la PCR Taqman® requiere reactivos que se utilizan para la PCR habitual (por ejemplo polimerasa, nucleótidos libres), así como un aparato de PCR en tiempo real para el análisis de los datos. Los reactivos y equipos son bien conocidos por el experto en la materia y no se exponen en detalle en la presente memoria.

Listado de secuencias

- 5 <110> BECTON DICKINSON
- <120> ENSAYO PARA TRICHOMONAS VAGINALIS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN DEL GEN AP65-1 DE TRICHOMONAS VAGINALIS
- 10 <130> BECTON 243
- <140>
- <141>
- 15 <150> 61/205, 017
- <151> 2009-01-14
- <160> 24
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1751
- <212> ADN
- 25 <213> Trichomonas vaginalis
- <400> 1

tttttgatta aagatgctta catcttcagt ctctcttcca gcacgtgaac tctcccgcaa	60
ggttctccca accctcaaga caggaatgac cttacttcag gatggagatc tcaacaaagg	120
tacagctttc acaaaagaag aacgtgaccg cttcaatctt cgtggcctcc tcccatataa	180
ggtcttcaca aaggatgaac aagctgctcg tatccgccgc cagttcgagt tgatgccaac	240
accactcctc aagtacatct tcctcgccaa cgagcgtgag aagaactcac agtccttctg	300
gagattcctc ttcacacacc caccagagga aacaatgcca attctttaca caccaactgt	360
cggatgaagct tgccagaagt gggctacaca ccgtcaatca taccgcggca tctacatcac	420
accagaagat tctggcaaga tcaaggacat cctccgcaac taccacgcc aggacatccg	480
ctgcattgtc gttacagatg ctggccgtat tctcgggtctc ggcgatctcg gtgcttccgg	540
ccttgggtatt ccagttggta agcttatgct ttacacactt atcggccaag ttgaccaga	600
tcagacactt ccagtccagt tagatatggg tacagacaga aaggaaatcc tcgccgaccc	660
actctaccac ggctggcgcc atccacgtgt acgtggcgct gagcacctca agttcgtcac	720
agaattcgtt gaggcagtca aggaagtctt cggtgacaca tgccttgtcc agttcgaaga	780
tttcgaaatg gaaactgctt tcaagcttct cgaccacttc agatggcgct gcaactgctt	840
caacgatgat atcgaaggta cagctgccgt tgctgctgct acacttgctt cagctacaca	900
catggaaggt gttccagatc tcaagaacca gaagatcatc ttcacgggtg ctggctctgc	960
tgccataggc attgctaacc tcattgtcga tatgacagtt tcccgcggtg gcatcaccaa	1020
ggagcaagcc ttcaagaaca tcatcatggt cgatcacctg ggcatgggtc atgctggccg	1080

taaggatctc tacgacttca acaagccata catgcacgac atggaagtct acggctcagt 1140
tctcgaggcc gtcaagaagt tcaaggctac atgcgtcatt ggtgtttccg gtgttccagg 1200
actcatcaca aaggaaatcg tccaggcaac attaaagaat gctgagcacc cagtcatcat 1260
gccactttcc aacccaacac caaaggctga agctacacca cacgatgttt acctttggtc 1320
caatggcaag gccctctgcg ctacaggctc accattccca gccgaacaag tcaacggcag 1380
aaagggtcatc actgcccaag ctaacaactc ctggatcttc ccagctgttg gttacgctct 1440
tggtacaaca aaggctcgcc actgcccgac taaggctctc gaaatcgccg ctgaatctct 1500
tgcttcctc gtcaagaagg aggatcacga tcagggcaat cttctccac cactcaacaa 1560
gatccgtgac tactcattcg gcacgctta cgatgtttcc aagtacctca tcgacaacga 1620
gctcgcaaca gctgttccac caaagggtac atctctcaag gactggctca aggctcagct 1680
cttcgaacca tcagctgact acgaaccact ttactaagcg cgatttttaa acacttagct 1740
ttcttaattt a 1751

<210> 2

<211> 17

5 <212> ADN

<213> Trichomonas vaginalis

<400> 2

10 tgggtgacag ccacttc

17

<210> 3

<211> 14

<212> ADN

15 <213> Trichomonas vaginalis

<400> 3

20 tggcgccgta gatg

14

<210> 4

<211> 14

<212> ADN

<213> Trichomonas vaginalis

25 <400> 4

ctctggctct tatg

14

30 <210> 5

<211> 13

<212> ADN

<213> Trichomonas vaginalis

35 <400> 5

tacaggaccg cac

13

<210> 6

40 <211> 19

<212> ADN

<213> Trichomonas vaginalis

<400> 6

45

	cctgtaggag gcgttgatg	19
	<210> 7	
	<211> 17	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> origen	
10	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 7	
15	acaactgtc ggtgaag	17
	<210> 8	
	<211> 14	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> origen	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
25	<400> 8	
	gagaccgaga atac	14
	<210> 9	
30	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<221> origen	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 9	
40	accgcggcat ctac	14
	<210> 10	
	<211> 13	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> origen	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
50	<400> 10	
	atgtcctggc gtg	13
55	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<221> origen	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 11	
65	ggacatcctc cgcaactac	19

	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> origen	
10	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 12	
	gaagattctg gcaagatcaa gga	23
15	<210> 13	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<221> origen	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 13	
25	acgacaatgc agcggatgt	19
	<210> 14	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Origen	
35	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 14	
	atcctccgca actaccacg cca	23
40	<210> 15	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<221> origen	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
50	<400> 15	
	ttacacacca actgtcgggtg aag	23
	<210> 16	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<221> origen	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 16	
65	atgtgatgc cgcggtatga t	21

5 <210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> Origen
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 10 <400> 17
 ttgccagaag tgggctacac acaccgtc 28
 15 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 18
 25 cagaggaaac aatgccaatt ctt 23
 30 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 19
 tgacggtgtg tagcccactt c 21
 40 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 20
 50 acaccaactg tcggtgaagc ttgcc 25
 55 <210> 21
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 21
 65 cgattccgct ccagacttct cgggaccgcg gcatctac 38
 <210> 22

ES 2 575 538 T3

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

10 <400> 22
 accgcatcga atgactgtct cgggatgtcc tggcgtg 37

15 <210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

25 <400> 23
 ggacatcctc cgcaactac 19

30 <210> 24
 <211> 244
 <212> ADN
 <213> Trichomonas vaginalis

<400> 24

cacccaccag aggaaacaat gccaattctt tacacaccaa ctgtcgggtga agcttgccag 60
aagtgggcta cacaccgtca atcataccgc ggcattctaca tcacaccaga agattctggc 120
aagatcaagg acatcctccg caactaccca cgccaggaca tccgctgcat tgcgttaca 180
gatgctggcc gtattctcgg tctcggcgat ctcggtgctt cgggccttgg tattccagtt 240
ggta 244

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la tricomoniasis, que comprende:

5 proporcionar una muestra biológica;

10 poner en contacto la muestra biológica con una sustancia que comprende un conjunto de sondas oligonucleotídicas que comprende por lo menos una sonda oligonucleotídica que está marcada de manera detectable y presenta una longitud de la secuencia de nucleótidos de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 y por lo menos dos cebadores oligonucleotídicos, presentando cada uno de los cuales una longitud de la secuencia de nucleótidos de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 bajo unas condiciones tales que las sondas y los cebadores se aparean con un gen AP65-1 como se especifica en la SEC ID nº 1 en la localización entre aproximadamente los pares de bases 317 a 560 sobre el gen;

15 amplificar la secuencia diana entre los dos cebadores; y

detectar el marcador como una indicación de la hibridación del conjunto de sondas a la secuencia diana indicando así la presencia o la cantidad de tricomoniasis;

20 en el que el conjunto de sondas comprende unos cebadores que presentan una secuencia oligonucleotídica que comprende la SEC ID nº 12 y la SEC ID nº 13 y una sonda que presenta una secuencia oligonucleotídica que comprende la SEC ID nº 14.

25 2. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3. Kit que comprende:

30 un conjunto de sondas para la detección por amplificación de *Trichomonas vaginalis* que contiene un gen AP65-1 tal como se especifica en SEC ID nº 1, comprendiendo dicho conjunto de sondas:

(a) unos cebadores que se unen a la región altamente conservada de SEC ID nº 1 que presenta una secuencia oligonucleotídica que comprende la SEC ID nº 12 y la SEC ID nº 13;

35 (b) por lo menos una sonda detectora que se une a una región de SEC ID nº 1 que presenta una secuencia oligonucleotídica que comprende la SEC ID nº 14.

4. Kit según la reivindicación 3, en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

40

FIG. 1A

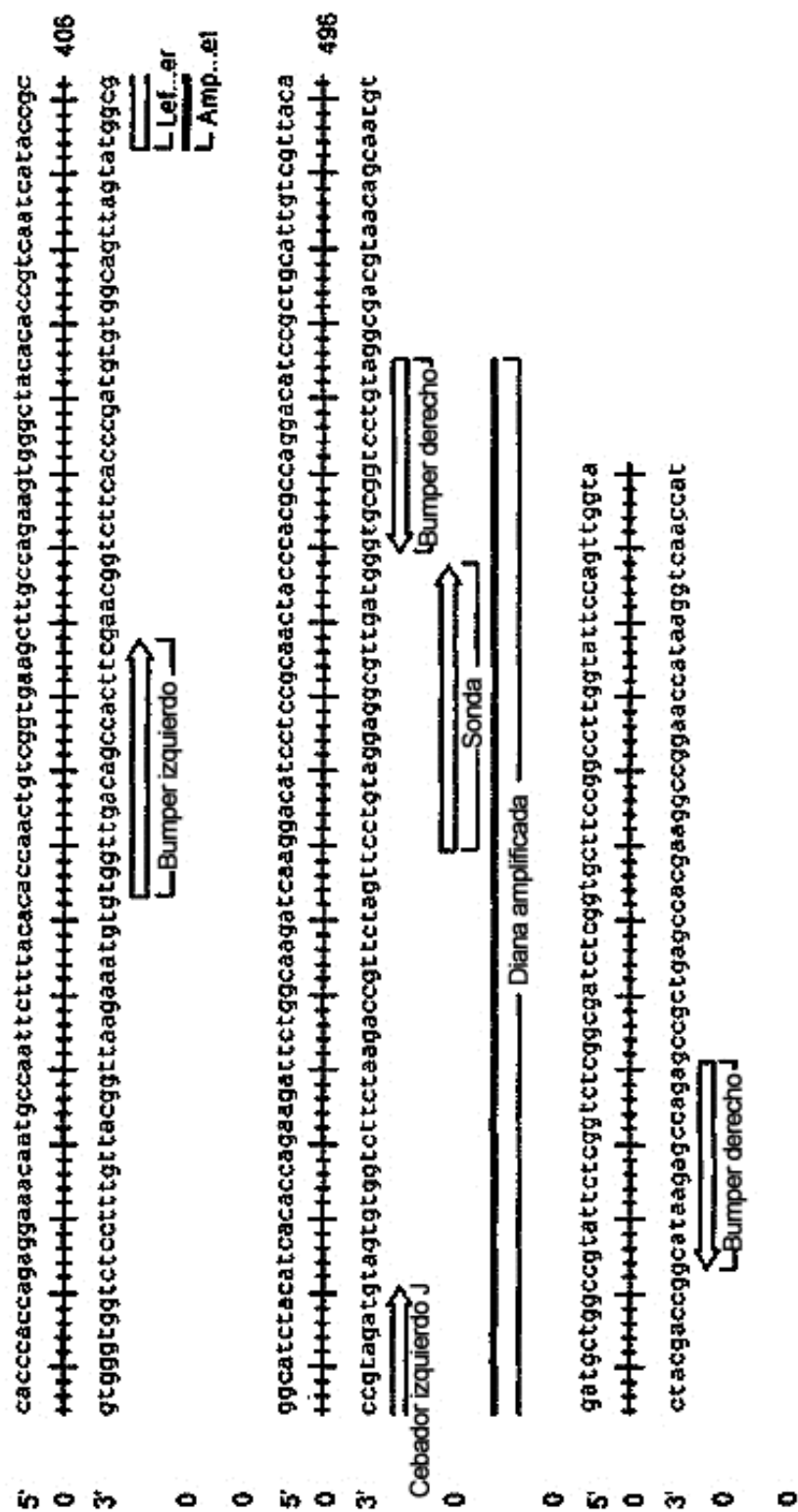


FIG. 1B

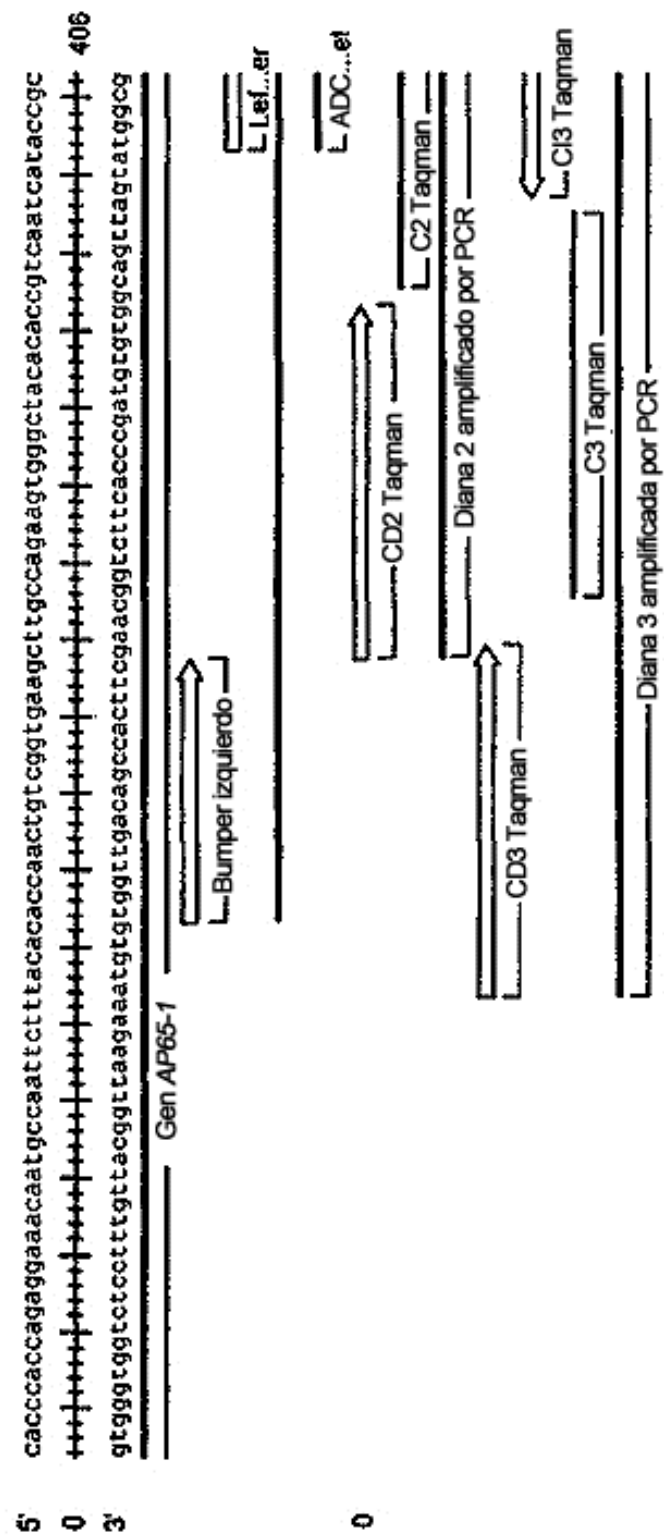


FIG. 1B Continuación

