

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 908**

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 14187351 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** **EP 2910646**

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:

07.07.2017

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

HARRIS, JAMES M.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 622 908 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

La presente invención se refiere a procedimientos de amplificación de ácido nucleico para la detección y/o cuantificación de secuencias de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoea*. La presente divulgación proporciona oligonucleótidos que son complementarios o que se hibridan con secuencias de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* para la amplificación y/o detección del mismo. La presente divulgación también proporciona controles internos de amplificación (IAC, del inglés, *internal amplification controls*) que se pueden usar en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos para determinar si las condiciones del ensayo son permisibles para la amplificación y/o detección de una secuencia diana. La presente invención proporciona un ensayo de amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) duplex para la amplificación y/o detección de secuencias de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoea* en presencia de un IAC.

Antecedentes de la invención

La gonorrea es la enfermedad transmisible más prevalente notificada en los Estados Unidos, con 2,5 millones de casos estimados notificados anualmente. Véase Lee y col., *Current Medical Diagnosis and Treatment*, 37ª ed., 1998, Appleton & Lange. La gonorrea está causada por *Neisseria gonorrhoeae*, un diplococo gram negativo que se encuentra típicamente en el interior de las células polimorfonucleares, y que se transmite comúnmente durante las relaciones sexuales. Esta bacteria puede infectar el tracto genital, la boca y el recto. En las mujeres, la apertura al útero, el cuello uterino, es el primer lugar de infección. El período de incubación de la bacteria es normalmente de 2-8 días (véase Tierney y col., *Current Medical Diagnosis and Treatment*, 37ª ed., 1998, Appleton & Lange). La gonorrea es una causa importante de uretritis en los hombres y cervicitis en las mujeres. La gonorrea puede diseminarse en el útero y en las trompas de Falopio, dando lugar a la enfermedad pélvica inflamatoria ("EPI") y, de hecho, aproximadamente del 20 % al 40 % de las EPI y el 14 % de la infertilidad tubárica se puede atribuir a las infecciones gonocócicas. Véase Chan y col., 2000, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124:1649-1652.

El diagnóstico tradicional de laboratorio de la gonorrea se realiza mediante un cultivo durante toda la noche de un frotis (por ejemplo, de orina o del cuello uterino) obtenido de un sujeto seguido de una identificación bioquímica y/o microscópica de *Neisseria gonorrhoea*.

Recientemente, los ensayos de amplificación de ácido nucleico se han utilizado ampliamente para la detección y/o el diagnóstico. Actualmente, los ensayos de amplificación de ADN de *Neisseria gonorrhoea* disponibles en el mercado incluyen la PCR (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ), y la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; Becton Dickinson, Sparks, MD). Las técnicas de amplificación de ácido nucleico *in vitro* proporcionan herramientas potentes para la detección y el análisis de los ácidos nucleicos, especialmente cuando los ácidos nucleicos diana están presentes en pequeñas cantidades. La sensibilidad de tales procedimientos los hace particularmente adecuados en áreas tales como el diagnóstico médico (por ejemplo, la detección de agentes infecciosos como bacterias y virus, el diagnóstico de enfermedades genéticas hereditarias y adquiridas, y el establecimiento del tipo de tejido), el aislamiento de genes, y la medicina forense (es decir, ensayos forenses para la detección de ácidos nucleicos específicos en las investigaciones criminales).

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se clasifican tradicionalmente de acuerdo con los requisitos de temperatura del procedimiento de amplificación. Las amplificaciones isotérmicas se realizan a una temperatura constante, a diferencia de las amplificaciones que requieren ciclos entre temperaturas altas y bajas. Son ejemplos de técnicas de amplificación isotérmica: la amplificación por desplazamiento de hebra (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), la replicación de secuencia autosostenida (3SR; Guatelli y col., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), el sistema de Q β replicasa (Lizardi y col., 1988, *Biotechnology* 6:1197-1202), y las técnicas desveladas en el documento WO 90/10064 y el documento WO 91/03573. Son ejemplos de técnicas que requieren ciclos de temperatura: la 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 por restricción (Patente de Estados Unidos n.º 5.102.784).

Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos actualmente disponibles para *Neisseria gonorrhoea*, sin embargo, carecen de un mecanismo de control interno para ensayar cualquier condición de reacción inhibitoria o errores humanos que están presentes en las pruebas y son por lo tanto propensos a resultados falsos negativos. Por lo tanto, existe la necesidad de un ensayo que disminuya la posibilidad de resultados falsos negativos.

Neisseria gonorrhoeae comparte un alto grado de homología con otras especies de *Neisseria* emparentadas muy estrechamente. Por lo tanto, existe claramente la necesidad del desarrollo de nuevos procedimientos y oligonucleótidos que son capaces de confirmar los resultados de los ensayos existentes y/o aumentar la especificidad y/o sensibilidad de una prueba para detectar *Neisseria gonorrhoea*.

La presente invención proporciona un ensayo de amplificación de ácido nucleico duplex que se puede usar como alternativa frente al ensayo actual monoplex de *Neisseria gonorrhoeae* (es decir, sin control de amplificación interno en la misma mezcla de reacción con una secuencia diana). La presente divulgación también proporciona oligonucleótidos que se pueden usar en ensayos de amplificación de ácido nucleico tanto duplex como monoplex, diseñados para

amplificar y/o detectar ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae*.

La cita o el análisis de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como la admisión de que esta es técnica anterior para la presente invención.

Sumario de la invención

La presente divulgación proporciona un procedimiento para detectar de forma cualitativa y/o de forma cuantitativa la presencia o ausencia de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento: (a) amplificar la secuencia diana usando un primer cebador de amplificación que tiene una secuencia que consiste esencialmente en la secuencia de unión diana de cualquier cebador de amplificación desvelado en el presente documento y (b) detectar la secuencia diana amplificada. La presente invención también comprende el uso de un segundo cebador de amplificación que consiste esencialmente en la secuencia de unión diana de cualquier cebador de amplificación desvelado en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona secuencias de control de amplificación interna con el fin de disminuir la aparición de resultados falsos negativos.

La presente invención también proporciona un procedimiento para detectar la secuencia diana de *Neisseria gonorrhoea* que comprende: (a) hibridar uno o más cebadores de amplificación desvelados en el presente documento con una secuencia diana y (b) detectar dicho cebador de amplificación hibridado.

La presente divulgación también proporciona oligonucleótidos que son útiles en la amplificación y detección de *Neisseria gonorrhoea*. La presente divulgación también proporciona kits que comprenden tales oligonucleótidos.

Descripción detallada de la invención

Cualquiera de las definiciones proporcionadas son por razones de claridad y no deberían considerarse limitantes. Excepto donde se indique, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la materia a la cual se refiere la invención.

La presente invención se refiere a procedimientos de amplificación de ácido nucleico y ensayos para la detección y/o cuantificación de secuencias de ácido nucleico de *Neisseria* tal como se define en las reivindicaciones adjuntas 1-5. La presente divulgación proporciona uno o más oligonucleótidos que son complementarios o que hibridan con secuencias de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* para la amplificación y/o detección de dichas secuencias. La presente divulgación además proporciona un control de amplificación interno (IAC) que puede usarse en ensayos de amplificación de ácido nucleico de la invención para determinar si las condiciones del ensayo son permisibles para la amplificación y/o detección de una secuencia diana. Los oligonucleótidos pueden usarse en todos los tipos de reacciones de amplificación, tales como, por ejemplo, la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), la replicación por círculo rodante (RCA), la amplificación mediada por transcripción (TMA), y la amplificación mediada por Q β replicasa.

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

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

La especificidad de un ensayo se refiere a la tolerancia frente a falsos positivos. Un resultado de ensayo es un falso positivo si la prueba se muestra positiva, pero la muestra realmente no contiene la secuencia diana. Por lo tanto, un ensayo más específico debe tener un nivel más bajo de falsos positivos.

De acuerdo con la presente invención, se puede interpretar un resultado de un ensayo para detectar *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra que utiliza un IAC tal como se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Interpretación de un ensayo SDA diplex

IAC	Resultado			
	+	-	+	-
Secuencia diana para <i>Neisseria gonorrhoea</i>	-	+	+	-
Presencia o ausencia de <i>Neisseria gonorrhoea</i>	ausencia	presencia	presencia	reacción inhibitoria, el ensayo necesita repetirse o modificarse

De acuerdo con la presente invención, se puede usar un IAC en lugar de, y/o además de, un control de amplificación convencional (AC, de las siglas *amplification control*). Se entiende por un experto en la materia que la reacción AC convencional se realiza en una mezcla de reacción separada de la muestra a ensayar. Una reacción AC convencional comprende reactivos de amplificación y ADN diana. Si la amplificación y/o detección del ADN diana en la reacción AC se suprime, se puede atribuir una indicación de que la secuencia diana está ausente en una muestra de ensayo a las señales inhibitorias en la reacción. Aunque esta forma de reacción de control es eficaz, no es la más deseable. Ya que la reacción AC se realiza de forma separada, no puede reflejar exactamente 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 idénticas condiciones de espacio y tiempo que la amplificación y/o detección de la secuencia diana, minimizando así el error humano.

La presente divulgación también proporciona cebadores de amplificación que se hibridan con una secuencia diana (es decir, una secuencia de *Neisseria gonorrhoea*) y/o una secuencia IAC. En algunas realizaciones de la divulgación, un cebador amortiguador o un oligonucleótido adaptador o su respectiva secuencia de unión a diana descrita en la tabla 2, la tabla 3 o la figura 1 se puede usar como un cebador de amplificación. En algunas realizaciones de la divulgación, se selecciona un cebador de amplificación de los cebadores de amplificación descritos en la tabla 2, en la tabla 3 o en la figura 1, tal como se desvela en el presente documento. En otra realización de la invención, se selecciona un cebador de amplificación de las secuencias de unión a diana de cebadores de amplificación descritos en la tabla 2, en la tabla 3 o en la figura 1, tal como se desvela en el presente documento. En otra realización de la divulgación, los cebadores de amplificación comprenden GCINT3- APL2 (SEQ ID NO:1) y GCINT3-APR1 (SEQ ID NO: 2).

La presente divulgación además proporciona oligonucleótidos adaptadores y sondas de detección que se pueden usar en un ensayo de amplificación de ácido nucleico para la detección de secuencias de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae*. En algunas realizaciones de la divulgación, el oligonucleótido adaptador es un oligonucleótido monocatenario que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 18, 20 o 21. En otras realizaciones de la invención, la sonda de detección es un oligonucleótido monocatenario que comprende la SEQ ID NO: 7, 8, 22 o 23, y un par donador/desactivador fluorescente unido al oligonucleótido.

Procedimientos de amplificación

Los oligonucleótidos desvelados en el presente documento se pueden usar en cualquier procedimiento de amplificación de ácido nucleico conocido en la materia.

Los procedimientos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"; véase las Patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; y 4.965.188), la amplificación por desplazamiento de hebra ("SDA"; véase Birren 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.º 5.270.184), la amplificación termofílica por desplazamiento de hebra ("tSDA"; véase el documento EP 0 684 315), la replicación de secuencia autosostenida ("3SR"; véase Birren y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:1874-78 (1990)), la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico ("NASBA"; véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.130.238), el sistema replicasa Q β (véase Lizardi y col., Biotechnology 6:1197 (1988)), la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"; véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.427.930); la replicación por círculo rodante (véase Lizardi y col., Nat Genet 19:225-232 (1998)) y la amplificación basada en la transcripción (véase Kwoh y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:1173-77 (1989)). Los cebadores de amplificación de la presente divulgación se pueden usar para llevar a cabo PCR, SDA o tSDA.

La SDA generalmente procede del siguiente modo. En primer lugar, los cebadores de amplificación se unen a la secuencia diana o a un producto de extensión monocatenario desplazado que se ha polimerizado previamente. En segundo lugar, una polimerasa deficiente en exonucleasa 5'-3' incorpora un α -tiodesoxinucleósido trifosfato (" α -tio dNTP") en un producto de extensión. Si el α -tio dNTP es un α -tio dCTP, por ejemplo, se incorpora al producto de extensión donde haya un resto G complementario en el molde. La incorporación de un α -tio dNTP en el producto de extensión en un sitio de reconocimiento de una endonucleasa de restricción crea un sitio hemimodificado, es decir, un sitio modificado solo en la hebra del producto de extensión. Una endonucleasa de restricción entonces corta el sitio de restricción bicatenario hemimodificado. A continuación, la endonucleasa de restricción se disocia del sitio de corte. Finalmente, una polimerasa que es deficiente en la actividad exonucleasa 5'-3' se extiende desde el extremo 3' del

corte y desplaza la hebra corriente abajo de ADN. El corte, la extensión de la hebra y el desplazamiento de la hebra tienen lugar de manera concurrente y de forma continua porque la extensión del corte regenera otro sitio de restricción que se puede cortar. Cuando un par de cebadores de amplificación se usa de manera que cada uno hibrida con una de las dos hebras de un dúplex bicatenario que comprende una secuencia diana, la amplificación es exponencial porque tanto la hebra codificante como la no codificante sirven como moldes en cada ronda de amplificación. Cuando se usa un único cebador de amplificación, la amplificación es lineal porque solo una hebra sirve como molde para la extensión del cebador. Los ejemplos de endonucleasas de restricción que cortan sus sitios de reconocimiento bicatenarios cuando se incorpora un α -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.º 5.270.184, n.º 5.455.166 y n.º 5.648.211. Un ensayo de SDA puede ser, pero no se limita a, una SDA tradicional (o convencional) (tal como se describe en Walker y col., PNAS (1992) 89:392-396, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.962.273, 5.712.124 y 5.744.311), una SDA termofílica (tal como se describe en Walker y col., Nuc. Acids Res. (1992) 20:1691-1696, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.648.211 y 5.744.311), y una SDA termofílica fluorescente homogénea en tiempo real (tal como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 6.379.888).

La contaminación cruzada con productos de amplificación trasladados de reacciones de amplificación previas en reactivos, dispositivos de pipeteo y superficies de laboratorio se puede reducir incorporando diversos restos a los productos de extensión. Por ejemplo, la timina se puede sustituir con 2'-desoxiuridina 5' trifosfato ("dU"), tal como se enseña en el documento EP 0 624 643. La escisión del dU que se incorpora a los productos de amplificación se cataliza con uracil ADN glicosilasa ("UDG"), que hace que los productos de amplificación que contienen dU sean incapaces de amplificarse adicionalmente. El propio UDG puede desactivarse cuando sea apropiado para continuar la amplificación.

En el caso de la tSDA, los cebadores y sus secuencias diana preferentemente se seleccionan de manera que su contenido en GC sea menos del 70 % del total de la composición de nucleótidos para minimizar la estructura secundaria y las interacciones cebador-cebador que pueden limitar la eficacia de la amplificación diana. Un cebador de amplificación adecuado para la tSDA comprende, en orden desde el extremo 3' de la sonda hasta el extremo 5', una secuencia de unión a la diana, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción, y una "cola." La secuencia de unión a la diana se hibrida de forma específica con una secuencia complementaria de un ácido nucleico diana. El sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción se reconoce mediante una endonucleasa de restricción que corta una hebra de ADN dúplex cuando se hemimodifica el sitio de reconocimiento, tal como se describe en Walker y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:392 (1992) y Kim y col., Nucl. Acids. Res. 20:1691 (1992). La cola 5' funciona como un sitio de cebado de la polimerasa cuando el resto del cebador de amplificación se corta y se desplaza durante la tSDA. La función de cebado de la cola sostiene la reacción tSDA y permite la síntesis de múltiples amplicones de una sola molécula diana. La longitud y la secuencia de la región de la cola pueden variar, siempre que la cola permanezca hibridada con la diana después del corte y que la cola no contenga secuencias que hibriden, ya sea con la secuencia de unión a la diana o con otros cebadores.

Algunos procedimientos de amplificación, tales como la tSDA, usan un "cebador amortiguador" o un "cebador externo" para desplazar los productos de extensión del cebador. Un "cebador amortiguador" o un "cebador externo" es un cebador que se usa para desplazar un cebador de amplificación y su producto de extensión en una reacción de amplificación. Un cebador amortiguador hibrida con una secuencia diana cadena arriba de un cebador de amplificación, de manera que la extensión del cebador amortiguador desplaza el cebador de amplificación cadena abajo y su producto de extensión. Los productos de extensión del cebador pueden desplazarse como alternativa mediante calor. Los cebadores amortiguadores usados en las reacciones de SDA y tSDA no necesitan hibridar de manera específica con ácidos nucleicos de enterovirus. Más bien, los cebadores amortiguadores pueden hibridar con cualquier secuencia diana que esté cadena arriba de los cebadores de amplificación y que esté lo suficientemente cerca del sitio de unión del cebador de amplificación como para desplazar el producto de extensión del cebador de amplificación tras la extensión del cebador amortiguador. Las faltas de coincidencias entre la secuencia del cebador amortiguador y su secuencia diana generalmente no afectan a la eficacia de la amplificación, siempre que el cebador amortiguador todavía hibride con su secuencia diana. Asimismo, la especificidad del sistema SDA para la amplificación de la secuencia diana en preferencia a otros ácidos nucleicos no depende de la especificidad del cebador amortiguador o los cebadores amortiguadores para la hibridación con el ácido nucleico diana. La especificidad de un sistema SDA por la secuencia diana proviene de la fidelidad de hibridación de los cebadores de SDA y sondas u oligonucleótidos usados para la detección de productos amplificados.

Cuando una reacción de amplificación usada de acuerdo con la invención es una reacción tSDA, las polimerasas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, *exo- Vent* (New England Biolabs), *exo- Deep Vent* (New England Biolabs), *Bst* (BioRad), *exo- Pfu* (Stratagene), *Bca* (Panvera), y *Sequencing Grade Taq* (Promega). Otros pueden ser identificados de forma rutinaria usando el ensayo de extensión anterior. Las polimerasas *Tth* (Boehringer), *Tfi* (Epicentre), *REPLINASE* (DuPont) y *REPLITHERM* (Epicentre) son capaces de desplazar una banda desde un corte, pero también tienen actividad exonucleasa 5'-3'. Estas polimerasas son útiles en los procedimientos de la invención después de la retirada de la actividad exonucleasa, por ejemplo, mediante ingeniería genética. Como la termoestabilidad de las endonucleasas de restricción termofílicas se limita generalmente a menos de 65 °C, las polimerasas termofílicas con actividad óptima alrededor de esta temperatura o por debajo (por ejemplo, *Bst* y *Bca*) son más compatibles con las endonucleasas de restricción termofílicas en la reacción.

Los componentes de la presente divulgación pueden optimizarse a una forma donde cada componente puede secarse y rehidratarse cuando se necesite usando cualquier técnica conocida en la materia. (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 mediante la extensión del oligonucleótido después de hibridarse a una secuencia diana o mediante el ligamiento de múltiples oligonucleótidos que están adyacentes cuando hibridan con la secuencia diana. Al menos una porción del cebador de amplificación hibrida con 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 formas para la detección de *Neisseria gonorrhoea*. Por ejemplo, las secuencias de unión a diana desveladas en el presente documento pueden usarse como alternativa como sondas de hibridación para la detección directa de *Neisseria gonorrhoeae*, bien sin amplificación previa o en un ensayo tras la amplificación. Tales procedimientos de hibridación se conocen bien en la materia y típicamente emplean un marcador detectable asociado con o unido a la secuencia de unión a diana para facilitar la detección de la hibridación.

El diseño de los cebadores de amplificación puede optimizarse para cada procedimiento de amplificación. Como no se requieren secuencias o estructuras especiales para impulsar 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 molde. Sin embargo, otras reacciones de amplificación requieren secuencias de nucleótidos especializadas, además de la secuencia de unión a diana, para que se produzca la reacción. Por ejemplo, un cebador de amplificación para su uso en un ensayo de SDA además comprende sitio 5' de reconocimiento de la endonucleasa de restricción a la secuencia de unión a diana (véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.455.166 y 5.270.184). El cebador de amplificación también puede comprender un grupo 3'-OH, que se puede extender mediante la ADN polimerasa cuando la secuencia de unión al molde del cebador de amplificación hibrida con la secuencia diana. Los cebadores de amplificación para la replicación de secuencia autosostenida (3SR) y el ensayo basado en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), por el contrario, comprenden un promotor de ARN polimerasa cerca del extremo 5'. (se describen ensayos 3SR 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 impulsar la reacción de amplificación dirigiendo la transcripción de múltiples copias de ARN del molde. Tales secuencias adicionales a la secuencia de unión diana que son necesarias para una reacción de amplificación particular se conocen bien en la materia. un promotor reconocido por la ARN polimerasa para ensayos de replicación autosostenidos

En el diseño de los cebadores de amplificación y los cebadores amortiguadores de la presente divulgación, se deben tener en cuenta las preocupaciones generales conocidas en la materia. Por ejemplo, cuando se usa una secuencia diana que comprende un gran número de repeticiones de GC y AT para diseñar un cebador, debe tenerse cuidado para minimizar las interacciones potenciales de dímeros para evitar la autohibridación de los cebadores. Los cebadores que pueden formar cuatro o más uniones consecutivas consigo mismos, u ocho o más uniones intercatenarias con otros cebadores se deben evitar de manera general. Los cebadores que pueden formar dímeros 3' deberían evitarse especialmente, porque la hibridación en los extremos 3' del cebador, incluso de manera transitoria, conducirán a la extensión del cebador debido a la acción de la polimerasa y a arruinar al cebador. Determinados programas informáticos (por ejemplo, Oligo™, National Biosciences, Inc., Plymouth, Minn) se pueden usar en el diseño de los cebadores para evitar problemas. Las combinaciones de cebadores también se exploran con respecto a las condiciones óptimas.

Tal como se sabe en la materia, el alineamiento o hibridación de secuencias de ácido nucleico complementarias y parcialmente complementarias también se puede obtener mediante el ajuste de las condiciones de la reacción para aumentar o disminuir la rigurosidad (por ejemplo, el ajuste de la temperatura o el contenido en sales del tampón). La presente divulgación abarca tales modificaciones de las secuencias desveladas y cualquier ajuste necesario de las condiciones. La información referida a las condiciones del tampón se puede encontrar en Experimental Design in Biotechnology, por Dr. Perry Haaland (Marcell Dekker, NY, 1989).

En una reacción de amplificación diplex, se diseña un cebador de amplificación que es capaz de hibridar tanto con una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* como con una secuencia de un IAC y amplificar la secuencia con la que está hibridado. Esto se logra usando una secuencia de ácido nucleico compartida entre la secuencia diana de *Neisseria gonorrhoea* y la secuencia de un IAC para diseñar un cebador de amplificación. Otras secuencias, como las requeridas para la realización de una reacción de amplificación seleccionada, se pueden añadir opcionalmente a un cebador de amplificación tal como se desvela en el presente documento.

A modo de ejemplo, pero sin limitación, los cebadores de amplificación para su uso en un ensayo SDA generalmente comprenden una secuencia 3' de unión a molde, un sitio 5' de reconocimiento de endonucleasa de restricción que se puede cortar en la secuencia de unión a molde, y una secuencia de cola de aproximadamente 10-25 nucleótidos de longitud 5' hasta el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción. Tal cebador de amplificación puede contener un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *BsoBI*, que se corta durante la reacción SDA. Será evidente para un experto en la materia que otros sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que se

pueden cortar se pueden sustituir por el sitio de reconocimiento *BsoBI*. El cebador de amplificación también puede contener una secuencia de cola (desde 5' hasta el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción). La secuencia de cola no debe contener el sitio de restricción usado para la SDA ni las secuencias que se hibridarán bien con su propia secuencia de unión a diana o con los otros cebadores (por ejemplo, cebadores amortiguadores).

- 5 En algunas realizaciones, se usa un par de cebadores de amplificación, cada uno de los cuales se hibrida con una de las dos cadenas de una secuencia diana bicatenaria o una secuencia IAC. En este caso, la amplificación es exponencial porque tanto la hebra codificante como la no codificante sirven como moldes para el cebador opuesto en posteriores rondas de amplificación. Cuando se usa un único cebador de amplificación, la amplificación es lineal porque solo una hebra sirve como molde para la extensión del cebador.
- 10 En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación abarcan un cebador de amplificación que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 1, 2, 10, 11, 12, 13 o sus respectivas secuencias de unión a diana. En otras realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación abarcan al menos dos cebadores de amplificación, en los que un primer cebador de amplificación comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 1, 10, 11 o sus respectivas secuencias de unión a diana; y un segundo cebador de amplificación comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 2, 12, 13 o sus respectivas secuencias de unión a diana.

- En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación abarcan uno o más cebadores amortiguadores. Un cebador amortiguador es un cebador usado para desplazar un cebador de amplificación y su producto de extensión en una reacción de amplificación. Un cebador amortiguador se hibrida con una secuencia diana
- 20 cadena arriba de un cebador de amplificación, de manera que la extensión del cebador amortiguador desplaza el cebador de amplificación cadena abajo y su producto de extensión. Un cebador amortiguador también puede funcionar como un cebador de amplificación. En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación abarcan uno o más cebadores amortiguadores. En determinadas realizaciones, el cebador amortiguador comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia que comprende la SEQ ID NO: 3, 4, 14, 15, 16 o 17. En una realización, un
- 25 cebador amortiguador comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia parcial o completa de la SEQ ID NO: 3, 4, 14, 15, 16 o 17. En otra realización, los procedimientos de la presente divulgación abarcan al menos dos cebadores amortiguadores, en los que un primer cebador comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 3, 14 o 15, y un segundo cebador comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 4, 16 o 17.

30 Secuencias diana

- Con "diana" o "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* a amplificar y/o detectar. Una diana o secuencia diana incluye la secuencia de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* a amplificar y cualquier segunda hebra complementaria. En algunas realizaciones, la secuencia diana puede ser monocatenaria o bicatenaria, en cuyo caso, bien una o ambas hebras se pueden unir a un cebador de amplificación. Una diana o
- 35 secuencia diana también puede comprender una secuencia de nucleótidos que se reconoce mediante un oligonucleótido adaptador (es decir, una secuencia que se une al adaptador).

Los cebadores de la presente divulgación están diseñados para hibridarse con una región de ADN genómico de *Neisseria gonorrhoea* (véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.962.273).

Control de amplificación interno

- 40 Con "control de amplificación interno", "IAC" o "secuencia IAC" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida con un cebador de amplificación y una secuencia que se puede detectar de forma separada de la secuencia diana. Se puede emplear cualquier procedimiento de detección conocido en la materia.

- De acuerdo con la presente invención, una secuencia de IAC se diseña para compartir secuencias de ácido nucleico con una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoea*, por tanto, el(los) mismo(s) cebador(es) de amplificación puede amplificar tanto una secuencia IAC como una secuencia diana si está presente en una muestra. También se diseña una secuencia IAC para tener algunas secuencias de ácido nucleico que difieren de la secuencia diana de *Neisseria gonorrhoea*, de manera que la detección de la secuencia IAC y la secuencia diana puede diferenciarse. Ya que una secuencia IAC se amplifica y/o detecta en la misma mezcla de reacción que la secuencia diana, los ensayos duplex
- 50 tienen la ventaja de detectar el error humano o una condición inhibidora de la reacción, 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 a ensayar elimina la necesidad de separar las reacciones de control de amplificación tal como se requiere en los ensayos actuales SDA monoplex.

- Aunque sin pretender ligarse a un mecanismo particular de acción, la presencia de un IAC en la misma reacción que la secuencia diana permite al ensayo de la presente invención detectar la presencia de inhibidores de la reacción y/o condiciones que pueden indicar un resultado falso negativo. Tal como se usa en el presente documento, un resultado falso negativo se refiere a un resultado que indica no detección de una secuencia diana, sin embargo, tal indicación no se debe a la ausencia de la secuencia diana en la muestra, sino que se debe a un error humano o a una condición de
- 55

la reacción, por ejemplo, la ausencia de un elemento crítico en la reacción, o la existencia de un inhibidor en la reacción, o un error al realizar el ensayo.

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

En algunas realizaciones, se diseña una secuencia IAC de manera que sus extremos 3' o 5' contienen una secuencia en común con una secuencia de ADN de *Neisseria gonorrhoea*. En algunas otras realizaciones, se diseña un IAC de manera que tanto el extremo 3' como el 5' contengan secuencias en común con una secuencia de ADN de *Neisseria gonorrhoeae* para que se una un cebador de amplificación.

También se diseña una secuencia del IAC para comprender una secuencia de ácido nucleico que es diferente de la secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* a amplificar, de manera que la detección de los productos de la amplificación del IAC y de la secuencia diana pueda diferenciarse.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención utilizan un IAC que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 9 o 19.

Detección de los ácidos nucleicos

Los productos de amplificación generados usando uno o más cebadores de la divulgación se pueden detectar mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. Tal como se usa en el presente documento, los productos de la amplificación incluyen tanto las secuencias diana amplificadas como las secuencias IAC amplificadas. Los productos de amplificación se pueden detectar mediante la hibridación a una sonda marcada usando técnicas convencionales, por ejemplo, una que hibrida los ácidos nucleicos amplificados a una secuencia que está entre los cebadores de amplificación. Como alternativa, los productos de amplificación se pueden detectar por su tamaño característico, por ejemplo, mediante electroforesis seguida de una tinción de bromuro de etidio para visualizar los ácidos nucleicos. En una alternativa adicional, se usa un cebador de amplificación marcado. En un aspecto adicional más, se extiende un cebador de amplificación / sonda interna marcada en la secuencia diana, tal como se describe en 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 acompaña directamente de una hibridación y extensión de una sonda indicadora marcada tal como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.928.869 y la Patente de Estados Unidos n.º 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 con enzimas, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.470.723. Tras la hibridación de estas dos sondas en diferentes sitios entre los dos sitios de unión de cebador de amplificación, el complejo se captura en una placa de microtitulación recubierta de estreptavidina, y la señal quimioluminiscente se desarrolla y se lee en un luminómetro.

En una realización de la presente invención, el procedimiento de detección puede detectar los productos de amplificación tanto de la diana como del IAC, y diferenciar entre los productos de amplificación detectados. Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la materia capaz de lograr este propósito. Por ejemplo, los procedimientos de detección que se desvelan en Walker y col., Nucl. Acids Res., (1992) 20:1691-1696, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.648.211, 5.962.273, 5.814.490, 5.928.869, 6.316.200, y en la Patente Europea EP 0 678 582 se puede usar de acuerdo con la presente invención. En otra realización, se usan las sondas universales y los procedimientos de detección de ácidos nucleicos (véase la Patente de Estados Unidos n.º 6.379.888).

En una realización, el procedimiento de detección universal emplea un oligonucleótido adaptador y una sonda de detección para la detección de una secuencia diana (una secuencia diana, una secuencia IAC o productos de extensión de las mismas). El oligonucleótido adaptador comprende una secuencia 3' de unión a diana y una secuencia 5'. El complemento de la secuencia 5', producido por amplificación, hibridará y se extenderá fuera de la sonda de detección. Tal hibridación se puede detectar entonces como una indicación del éxito de la reacción de amplificación.

Se pueden usar al menos dos oligonucleótidos adaptadores diferentes para detectar de manera simultánea diferentes secuencia diana (por ejemplo, productos de amplificación de una secuencia diana y productos de amplificación de una secuencia IAC). En este caso, la secuencia 5' adaptadora del oligonucleótido adaptador es diferente para cada molde a detectar. Mediante sondas de detección marcadas que indican la presencia de la secuencia diana e IAC con diferentes marcadores fluorescentes (por ejemplo., diferentes pares de colorantes donador/desactivador), se puede determinar la presencia de cada uno detectando cambios en el grado de desactivación de la fluorescencia en cada sonda de detección.

En algunas realizaciones, los nucleótidos adaptadores y las sondas de detección se usan para la detección de los productos de amplificación de una secuencia IAC y una secuencia diana. La porción de la secuencia IAC que se puede reconocer mediante un oligonucleótido adaptador se diseña para ser diferente de la porción de la secuencia diana que se puede reconocer mediante un oligonucleótido adaptador, es decir, el oligonucleótido adaptador que reconoce la secuencia IAC y el oligonucleótido adaptador que reconoce la secuencia diana tienen, entre otras cosas, diferentes

secuencias de unión a molde. La especificidad de los oligonucleótidos adaptadores (con respecto a la secuencia IAC y la secuencia diana) conduce finalmente a la detección de diferentes productos de amplificación (de una secuencia de IAC o de una secuencia diana) mediante diferentes sondas de detección.

En una realización, se pueden emplear, si se desea, múltiples oligonucleótidos adaptadores por hebra de molde, cada hibridación con la secuencia diana cadena abajo de la otra en la misma hebra, con todos los oligonucleótidos adaptadores hibridados cadena abajo del cebador de amplificación. De este modo, cada oligonucleótido adaptador se desplaza mediante la extensión del oligonucleótido adaptador cadena arriba y el oligonucleótido adaptador que está más en 5' se desplaza mediante el cebador de amplificación. El uso de múltiples oligonucleótidos adaptadores tiene la ventaja de aumentar o amplificar la señal generada por secuencia diana, con un aumento de la sensibilidad del ensayo.

Muchos pares de colorantes donador/desactivador conocidos en la materia son útiles en la presente invención. Estos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC)/isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), FITC/Texas Red.TM. (Molecular Probes), FITC/1-pirenobutirato de N-hidroxisuccinimidilo (PYB), FITC/isotiocianato de eosina (EITC), 1-pirenosulfonato de N-hidroxisuccinimidilo marcado (PYS)/FITC, FITC/Rodamina X, FITC/tetrametilrodamina (TAM- RA), y otros. La selección de un par de coloración donador/desactivador no es crítica. Para los mecanismos de desactivación por transferencia de energía sólo es necesario que las longitudes de onda de emisión del fluoróforo donador se superpongan a las longitudes de onda de excitación del desactivador, es decir, debe haber suficiente solapamiento entre los dos tintes para permitir suficiente transferencia de energía, cambio de carga o desactivación de la fluorescencia. El ácido P-(dimetil aminofenilazo) benzoico (DABCYL) es un colorante desactivador no fluorescente que desactiva de forma eficaz la fluorescencia de un fluoróforo adyacente, por ejemplo, fluoresceína o 5-(2'-aminoetil) aminonaftaleno (EDANS). Cualquier par de colorantes que produzca la desactivación de la fluorescencia en la sonda de detección de la invención se puede usar en los procedimientos de la invención, independientemente del mecanismo mediante el que tenga lugar la desactivación. Los procedimientos de marcado terminal e interno también se conocen en la materia y pueden usarse de manera rutinaria para unir el donador y el desactivador en sus respectivos sitios en la sonda de detección.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación utilizan un oligonucleótido adaptador que comprende una secuencia de oligonucleótidos que consiste esencialmente SEQ ID NO: 5, 6, 18, 20 o 21.

La presente divulgación proporciona sondas de detección que son oligonucleótidos monocatenarios que comprenden la SEQ ID NO: 7, 8, 22 o 23, y un marcador. En determinadas realizaciones, el marcador comprende al menos un par donador/desactivador fluorescente unido al oligonucleótido, en el que el resto fluorescente es rodamina, fluoresceína o dabcil.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una SDA termofílica (tSDA) fluorescente en tiempo real homogénea diplex. Una SDA termofílica fluorescente en tiempo real y homogénea es una tSDA modificada que detecta secuencias diana de ácido nucleico mediante mecanismos de desactivación de fluorescencia (véase(véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.379.888). Por ejemplo, en una realización, una sonda de detección puede comprender un par donador/aceptor fluorescente, de manera que la desactivación de la fluorescencia tiene lugar en ausencia de la secuencia diana. Aunque sin pretender ligarse a un mecanismo particular de acción, en ausencia de hibridación de la sonda de detección con un segundo oligonucleótido (que se produce mediante amplificación de una secuencia diana), la sonda adopta una conformación que lleva al donador y al desactivador a una cercana proximidad espacial y da como resultado la desactivación de la fluorescencia del donador. La sonda puede plegarse en una estructura secundaria ordenada (por ejemplo, un cuádruplex G, una horquilla o una triple hélice), en un bucle aleatorio, o en cualquier otra conformación que lleva al donador y al desactivador lo suficientemente cerca como para producir la desactivación de la fluorescencia. Sin embargo, cuando la sonda de detección hibrida con un segundo oligonucleótido, la estructura secundaria emparejada de forma intramolecular de la sonda de detección se despliega o linealiza, lo que aumenta la distancia entre el donador y el desactivador y, por tanto, reduce o elimina la desactivación de la fluorescencia. Como alternativa, la sonda de detección puede diseñarse como una sonda de detección lineal(es decir, que no se pliega en una estructura secundaria), en la que la distancia entre el donador y el desactivador es lo suficientemente corta como para producir desactivación de la fluorescencia. En este caso (y opcionalmente en casos en los que se use la 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 fluorescente donador/desactivador. El emparejamiento intermolecular entre la sonda de detección y un segundo oligonucleótido da lugar al RERS bicatenario y por tanto se puede escindir o cortar mediante una endonucleasa de restricción. Aunque no se pretenda unir mediante un mecanismo particular de acción, la escisión o el corte mediante la endonucleasa de restricción separa el donador y el aceptor en fragmentos de ácido nucleico separados, lo que lleva a una disminución de la desactivación.

Un cambio asociado en un parámetro de fluorescencia (por ejemplo, un aumento en la intensidad de fluorescencia del donador, una disminución en la intensidad de la fluorescencia del aceptor o una proporción de las intensidades de las fluorescencias del donador y el aceptor) se puede controlar de acuerdo con los procedimientos de la invención para detectar y/o controlar la presencia de la secuencia diana. Generalmente se prefiere el control de un cambio en la fluorescencia del donador, ya que este cambio es típicamente mayor que el cambio en la intensidad de la fluorescencia del aceptor. También se pueden controlar otros parámetros de fluorescencia tales como un cambio en el tiempo de

vida de la fluorescencia, de acuerdo con la 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 las SEQ ID NO: 1, 2, 10, 11, 12, 13 o sus respectivas secuencias de unión a diana y al menos un envase que contiene tales cebadores. El kit puede incluir de manera opcional 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 hibridación o una reacción de amplificación, tal como una hibridación de Southern, una hibridación por transferencia puntual, una PCR, o una SDA. Para la detección mediante hibridación, se puede incluir una solución apropiada para realizar la hibridación, por ejemplo, NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, SDS al 0,1 %. Se pueden incluir en el kit componentes para los procedimientos de detección, por ejemplo, una segunda sonda, un radiomarcador, un sustrato enzimático, un anticuerpo, y similares. También se pueden incluir reactivos apropiados para su uso en un procedimiento de amplificación de ácido nucleico. Los componentes del kit se envasan juntos en un envase común, incluyendo típicamente las instrucciones para llevar a cabo realizaciones específicas seleccionadas de los procedimientos desvelados en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño de conjuntos de cebadores SDA

Se ha secuenciado y caracterizado para su direccionamiento mediante ensayos de amplificación una porción del genoma de *Neisseria gonorrhoeae* (véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.962.273). Para el fin de este ensayo, se seleccionó para el direccionamiento una porción del genoma de *Neisseria gonorrhoeae* que no había sido direccionado previamente para ensayos de amplificación. Esta subregión del genoma de *Neisseria gonorrhoeae* se analizó en las bases de datos actuales GenBank y SeqWeb para la especificidad de *Neisseria gonorrhoeae*.

Los cebadores de amplificación se diseñaron para amplificar tanto las secuencias diana de *Neisseria gonorrhoeae* como un IAC. Se diseñaron múltiples versiones de los cebadores, tal como se muestra en la tabla 2 y 3. Las posiciones de las regiones del genoma de *Neisseria gonorrhoeae* con las que se hibridan los oligonucleótidos seleccionados (cebadores de amplificación, cebadores amortiguadores y oligonucleótidos adaptadores) se ilustran en la figura 1.

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

Oligonucleótido	Secuencia
Cebadores de amplificación:	
GCINT3-APL2	5'CGTCTCCAGTCGAGACTTCGCGGAATCAAAGCGAATGGG3' (SEQ ID NO: 1)
GCINT3-APR1	5'ACTACGTCGAA [*] GCATGTCGCGGACTTCTTCATCTTTTGG3' (SEQ ID NO:2)
Amortiguadores:	
GCINT3-BL2	5'CCGCAGCATACGC3' (SEQ ID NO:3)
GCINT3-BR3	5'TGCGCATATGCTTTG3' (SEQ ID NO:4)
Oligonucleótidos adaptadores:	
GC3A-R1	5'ACGTTAGCCACCATACTAGTGTGATGACGGTTTTTCATTGC3' (SEQ ID NO:5)
ICAdpt9	5'ACTGATCCGCACTAACGACTGCTTTGCTAGTTGCCCTCAGACA T3' (SEQ ID NO: 6)
GC3A-R2	5' ACTGATCCGCACTAACGACTGTGATGACGGTTTTTCATTGC 3' (SEQ ID NO:20)
ICAdpt10	5'
	ACGTTAGCCACCATACTAGTGTGCTTTGCTAGTTGCCCTCAGACAT 3' (SEQ ID NO:21)
Sondas de detección:	
CTGCUInv3	5' (Dabcil)- TAGTGCCCGAGCAC (Rodamina)-TACGTTAGCCACC ATACTTGA3' (SEQ ID NO:7)
ICUnv4	5' (Fluoresceína)- TAGCACCCGAGTGC (Dabcil)-TAACTGATCCGCA CTAACGACT3' (SEQ ID NO:8)
MPC-DR	5' (Dabcil)- TCCCCGAGT-(Rodamina)ACGTTAGCCACCATACT TGA 3' (SEQ ID NO:22)
MPC2-FD	5' (Fluoresceína)- TCCCCGAGT-(Dabcil) ACTGATCCGCACTAA CGACT 3' (SEQ ID NO:23)
IAC:	
GC13-IAC4	5'AATCAAAAGCGAATGCGTATGTCTGAGGCAACTAGCAAAGCT GCAAAAGATGAAGAAG3' (SEQ ID NO:9)
Las secuencias de detección universal están en negrita y los sitios <i>BsoBI</i> en cursiva. Lo subrayado representa secuencias de unión a diana.	

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

Oligonucleótido	Secuencia
Cebadores de amplificación:	
GCINT3-APL1	5'CGTCTCCAGTCCAGACTTCTCGGGAATCAAAAAGCGAATGC3' (SEQ ID NO: 10)
GCINT3-APL3	5'CGTCTACCGTCCAGACTTCTCGGGAATCAAAAAGCGAATGCGC3' (SEQ ID NO: 11)
GCINT3-APR2	5'ACTACGTGGAATGCATGTCTCGGGACTTCTTCATCTTTGCC3' (SEQ ID NO: 12)
GCINT3-APR3	5'ACTACGTGGAATGCATGTCTCGGGAGCTTCTTCATCTTTGCC3' (SEQ ID NO: 13)
Amortiguadores:	
GCINT3-BL1	5'CCGCAGCATACG3' (SEQ ID NO:14)
GCINT3-BL3	5'CCGCAGCATACGCG3' (SEQ ID NO:15)
GCINT3-BR1	5'TTGCGCATATGCTT3' (SEQ ID NO:16)
GCINT3-BR2	5'CTTTGATGATTTGCG3' (SEQ ID NO:17)
Oligonucleótidos adaptadores:	
GC3A-F1	5'ACGTTAGCCACCATACTTGAGCAATGAAAAACCGTCATCAC3' (SEQ ID NO: 18)
IAC	
IC3-IAC3	5' AATCAAAAAGCGAATGCGTATGTCTGAGGCAACTAGCAAA GCAGTGCAAAAAGATGAAGAAG 3' (SEQ ID NO:19)
Las secuencias de detección universal están en negrita y los sitios <i>BsoB1</i> en cursiva. Lo subrayado representa secuencias de unión a diana.	

Ejemplo 2: Optimización de las condiciones de la reacción SDA

- 5 Los ensayos tSDA fluorescentes en tiempo real y homogéneos se realizaron para optimizar las condiciones para los ensayos de la invención. Los oligonucleótidos descritos en la tabla 2 y 3 se ensayaron para determinar qué oligonucleótidos proporcionarían resultados óptimos. También se optimizaron las concentraciones de bicina e hidróxido de potasio. Un ejemplo de concentraciones optimizadas de los componentes del ensayo SDA es el que sigue:
- 10 amortiguador (GCINT3-BL2 y BR3) 50 nM
 cebador de amplificación (GCINT3-APL2 y APR1) 500 nM
 adaptador (GC3A-R1 y ICADPT9) 200 nM
 sondas de detección (CTGCUnv3 y ICUnv4) 200 nM
 fosfato de potasio 30 mM
- 15 bicina 99,7 mM
 hidróxido de potasio 58 mM
 DMSO al 10 %
 glicerol al 9 %
 dATP 0,1 mM, dGTP 0,1 mM, dUTP 0,25 mM e isómero S de dCTP con tioato en alfa 0,35 mM
- 20 acetato de magnesio 5 mM
 BSA 100 µg/ml
 trehalosa al 1,82 %
 DTT 360µM
- 25 15 unidades BD de BsoB 1
 6 unidades BD de Bst

El ADN diana se lisó durante 10 minutos a 114 °C en un bloque de lisis BD. Las muestras se enfriaron durante 10 minutos y se transfirieron 150 µl a los pocillos cebadores para incubarlos durante 20 minutos. Se transfirieron 100 µl de la mezcla cebadora de SDA a los micropocillos de amplificación. Las placas se transfirieron a continuación al instrumento BDProbeTec™- ET durante 60 minutos a 54 °C.

- 5 Algunos oligonucleótidos enumerados en la tabla 2 y la tabla 3 (por ejemplo APL1 y APL2) fueron equivalentes en el rendimiento, es decir, cuando estos oligonucleótidos se usaron en un ensayo SDA, la cantidad de productos de amplificación detectada era aproximadamente la misma (o la variación está dentro de la significación estadística). Sin embargo, el GC3A-R1 proporcionó 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 (SEQ ID NO:1) y GCINT3-APR1 (SEQ ID NO:2). Los cebadores amortiguadores incluyen GCINT3-BL2 (SEQ ID NO:3) y GCINT3-BR3 (SEQ ID NO:4). El oligonucleótido adaptador incluye GC3A-R1 (SEQ ID NO:5), IACAdpt9 (SEQ ID NO:6), GC3A-R2 (SEQ ID NO:20) e IACAdpt10 (SEQ ID NO:21). Las sondas de detección incluyen CTGCUuv3 (SEQ ID NO:7), ICUnv4 (SEQ ID NO:8), MPC-DR (SEQ ID NO:22) y MPC2-FD (SEQ ID NO:23). El IAC incluye GCI3-IAC4 (SEQ ID NO:9).

15 Ensayos SDA con componentes secos y sondas de detección lineales

Los componentes de los ensayos SDA de acuerdo con la presente invención se optimizaron a un formato en el que cada componente pudiera secarse y rehidratarse cuando fuera necesario. Las concentraciones de oligonucleótidos y reactivos para una reacción SDA de 100 µl se enumeran a continuación.

Oligonucleótidos utilizados y sus concentraciones:

- 20 Amortiguador GCINT3-BL2 50 nM
Amortiguador GCINT3-BR3 50 nM
Cebador de amplificación GCINT3-APL2 500 nM
Cebador de amplificación GCINT3-APR1 200 nM
Adaptador GC3A-R2 130 nM
25 Adaptador IACAdpt10 200 nM
Detector MPC-FD 300 nM
Detector MPC2-DR 300 nM
300 copias de GCI3-IAC4

Concentraciones del reactivo y otros componentes:

- 30 Fosfato de potasio 60 mM, (hecho a partir de una solución madre de pH 7,6)
DMSO al 10 %
glicerol al 9 %
dATP 0,1 mM, dGTP 0,1 mM, dTTP 0,1 mM, e isómero S de dCTP con tioato en α 0,125 mM, 3,5 mM de acetato de magnesio
35 100 µg/ml de BSA
trehalosa al 1,84 %
DTT 320 mM
48 unidades BD de la enzima de restricción BsoB1
8,4 unidades BD de polimerasa Bst

- 40 Esta mezcla de reacción optimizada utiliza GC3A-R2 (SEQ ID NO:20) e IACAdpt10 (SEQ ID NO:21) como oligonucleótidos adaptadores, y MPC-DR (SEQ ID NO:22) y MPC2-FD (SEQ ID NO:23) como sondas de detección. Los productos de amplificación de ADN diana de *Neisseria gonorrhoea* se detectaron mediante MPC2-FD, que se marcó con fluoresceína y dabcil. Los productos de amplificación de ADN del IAC (GCI3-IAC4) se detectaron mediante MPC-DR, que se marcó con rodamina y dabcil. Las sondas de detección MPC-DR y MPC2-FD no necesitan hibridación intramolecular (por ejemplo, plegarse en estructura de horquilla) para lograr la desactivación de los colorantes fluorescentes, ya que el que colorante y la molécula de desactivador se posicionan en estrecha proximidad. Hay un sitio de restricción de la *BsoB1* entre el colorante y la molécula desactivadora. La amplificación del ADN diana de *Neisseria gonorrhoea* o del IAC lleva a la generación de un segundo oligonucleótido complementario con el oligonucleótido adaptador. El segundo oligonucleótido, que es complementario a la sonda de detección, se hibrida con la sonda de detección y genera un ADN bicatenario. La enzima de restricción *BsoB1* reconoce el sitio bicatenario *BsoB1* entre el colorante y la molécula desactivadora y escinde el sitio, lo que separa al colorante fluorescente de la molécula desactivadora y provoca que se detecte la señal.

Ejemplo 3: Ensayo de Sensibilidad

- 55 Las condiciones de la reacción optimizadas descritas en el ejemplo 2 se usaron para determinar la sensibilidad de un ensayo SDA duplex de acuerdo con la presente invención. Se tituló una cepa de *Neisseria gonorrhoea* (ATCC n.º19424) de 1x10⁴ hasta 25 partículas por reacción de SDA. Las células de *Neisseria gonorrhoea* se lisaron en un bloque de lisis BD, se añadieron a la mezcla de la reacción SDA, y después se amplificaron en el instrumento BDProbeTec™ ET. El cien por cien de las reacciones SDA duplex que contenían *Neisseria gonorrhoea* fueron

positivas, con valores de detección significativamente mayores que aquellos vistos para el control negativo, y confirmando, por tanto que el ensayo SDA diplex de la invención es sensible frente al ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoea*.

Tabla 4. *Neisseria gonorrhoeae* Límite de detección del experimento

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
Media:	96124	97754	91984	90548	87956	75784	359

5

También se ensayó la sensibilidad de la condición de la reacción de secado/rehidratación optimizada descrita en el ejemplo 2. Se lisaron durante 10 minutos a 114 °C en un bloque de lisis BD, diferentes muestras que contenían células de *Neisseria gonorrhoea* (cepa 19424) con diferentes concentraciones en 2 ml de tampón [tampón de fosfato de potasio 30 mM (hecho de una solución madre con pH 7,6), DMSO al 10 %, y glicerol al 9 %]. Las muestras se enfriaron durante 15 minutos y se transfirieron 150 µl de cada muestra a los pocillos cebadores. Las muestras rehidratadas en los pocillos cebadores se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente seguido de 10 minutos en un bloque de calentamiento establecido a 72,5 °C. Para cada muestra, se transfirieron 100 µl de la mezcla de reacción del cebador a un micropocillo de amplificación calentado previamente durante 10 minutos en un bloque de calentamiento a 54 °C, seguido de una mezcla de un volumen de 50 µl del volumen transferido tres veces en el pocillo de amplificación. Las placas se cerraron herméticamente y se llevaron al instrumento BDProbeTec™ ET durante 60 minutos a 52 °C. Las muestras de ensayo que tenían una lectura de al menos 4.000 MOTA (siglas del inglés *Method Other Than Acceleration*, determinado por un procedimiento que no es la aceleración) se registraron como positivos para *Neisseria gonorrhoea* (es decir, la lectura de 4.000 MOTA fue el valor de corte para determinar que una muestra es positiva para *Neisseria gonorrhoeae*). El MOTA se describe en la Solicitud Europea n.º 01110657.2 publicada, que se incorpora al presente documento a modo de referencia. El valor más alto que alcanzó una muestra negativa para el ADN diana de *Neisseria gonorrhoea* fue de 780 MOTA. Las lecturas de MOTA se obtuvieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante del BDProbeTec™ ET (Becton Dickinson, MD).

10

15

20

Los datos en la tabla 5 indican que el ensayo SDA diplex de acuerdo con la presente invención puede detectar al menos 5 partículas de *Neisseria gonorrhoea* por reacción, en las que el LDD al 95 % puede ser 8 copias por reacción.

25

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

Partículas GC/reacción		100		50		25		10		5		0	
Ensayo:		GC	IAC	GC	IAC	GC	IAC	GC	IAC	GC	IAC	GC	IAC
Señal MOTA:	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	
												</	

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

La especificidad del ensayo SDA diplex de la invención se determinó usando los oligonucleótidos en la tabla 2 y las condiciones de la reacción de SDA descritas en el ejemplo 2: ensayos SDA con componentes secos y sondas de detección lineal.

- 5 Se ensayó un panel de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* para determinar la especificidad del ensayo SDA diplex de la invención. El ensayo detectó un cien por cien de las cepas de *N. gonorrhoea* cuando se ensayaron 250 partículas celulares por reacción SDA (tabla 6). Se ensayó también un panel de especies de *Neisseria* pero no la especie *gonorrhoea* y microorganismos que no eran *Neisseria* en el ensayo SDA diplex de la invención (tabla 7 y tabla 8). Los resultados en las tablas son un resumen de los múltiples experimentos que abordaron la reactividad cruzada. Los organismos se cultivaron en un McFarland que, después del procesado, produjo aproximadamente 1×10^7 células/reacción SDA. Los organismos enumerados en la tabla 7 y 8 se ensayaron a esa concentración, con excepción de *C. trachomatis* a 1×10^6 CE/ reacción. El resultado de IAC permitió la determinación de que un resultado negativo del ensayo se debía a la carencia de reactividad cruzada con los oligonucleótidos del ensayo, y no debido a un inhibidor de amplificación presente en una muestra procesada. Una cepa de *N. cinerea* (n.º565) (identificada previamente como *N. lactamica*) condujo a que no se detectase el IAC del ensayo GC Diplex. El IAC se detectó en el ensayo tras una dilución de la muestra (1×10^5 células/reacción SDA). Esta muestra diluida también produjo un resultado negativo para la reactividad cruzada. Se determinaron dos cepas de *Neisseria lactamica* (n.º23970 y 391) para la reacción cruzada con el ensayo. Además, se detectó un positivo muy débil con 1 de 3 réplicas de la cepa n.º25240 de *Bramhamella catarrhalis*. Todas las cepas de *Neisseria kochii* fueron positivas para el ensayo SDA para *Neisseria gonorrhoea*. Esto era lo esperado dado que el organismo había sido identificado como una subespecie de *Neisseria gonorrhoea*.

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

Tabla 6. Cepas de *Neisseria gonorrhoeae*

Organismo	Cepa	Fuente	Resultado
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	19424	ATCC	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	35542	ATCC	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43069	ATCC	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43070	ATCC	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	49226	ATCC	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	51109	ATCC	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	454	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1632	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2900	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	111	CDC	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	4	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	98	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	115	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	497	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1588	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1618	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2373	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3981	BD	pos.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	8000	BD	pos.

(continuación)

Organismo	Cepa	Fuente	Resultado
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	8002	BD	pos.
ADN de <i>Neisseria gonorrhoea</i> (plásmido) clonado	N/D	N/D	pos.
Control negativo	N/D	N/D	Neg.

Tabla 7. Reactivos de cruce de las especies de *Neisseria*

Organismo	Cepa/Organismo n.º	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 nitroreducens</i>	49377	BD	Neg.
<i>Neisseria elongate ss nitroreducens</i>	49378	ATCC	Neg.
<i>Neisseria elongata ss glycolytica</i>	29315	ATCC	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30008	HVMC	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30034	HVMC	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30037	HVMC	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30136	HVMC	Neg.
<i>Neisseria flava</i>	nrl 30137	HVMC	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.

(continuación)

Organismo	Cepa/Organismo n.º	Sitio	Resultado
<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	HVMC	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 30035	HVMC	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 35304	HVMC	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 35308	HVMC	Neg.
<i>Neisseria perflava</i>	nrl 35320	HVMC	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.

(continuación)

Organismo	Cepa/Organismo n.º	Sitio	Resultado
<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.
<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/D	N/D	Neg.

Tabla 8. Reactivos cruzados que no son de *Neisseria*

Reactivos cruzados que no son de <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.

(continuación)

Reactivos cruzados que no son de <i>Neisseria</i>	ATCC o ID.	Fuente	Resultado
<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>	LGV II	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)

Reactivos cruzados que no son de <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 de un ensayo SDA duplex para *Neisseria gonorrhoeae*

- Los siguientes datos demuestran la capacidad de un ensayo SDA duplex para *Neisseria gonorrhoeae* de amplificar y detectar dos fuentes de ADN diana (ADN diana y un IAC de *Neisseria gonorrhoeae*, por ejemplo, GC13-IAC4 (SEQ ID NO:9)). Este experimento utilizó los oligonucleótidos primarios de la tabla 2 y las condiciones de la reacción SDA descritas en el ejemplo 2. Los datos enumerados en la tabla 9 demuestran que el ensayo SDA duplex para *Neisseria gonorrhoeae* puede amplificar y detectar, en un único pocillo de ensayo, tanto el ADN (GC) de *Neisseria gonorrhoeae* como el control interno de amplificación (IAC). Las dos fuentes de ADN diana se distinguieron mediante el uso de diferentes sondas de detección marcadas con fluorescencia: rodamina (ROX) para *Neisseria gonorrhoeae* y fluoresceína (FAM) para el IAC. El ADN de *Neisseria gonorrhoeae* y el IAC se puede amplificar y detectar cuando están 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 (condición 3). La señal de *Neisseria gonorrhoeae* no se alteró de manera significativa cuando el IAC estuvo presente. Se descubrió que la señal IAC se había suprimido en la condición 3. Sin embargo, esto no refleja la especificidad o sensibilidad del ensayo, ya que es importante que se detecte el IAC en ausencia de *Neisseria gonorrhoeae* para indicar la falta de inhibidores o la presencia del error humano.

Tabla 9. Experimento de detección dual

	Condición n.º 1		Condición n.º 2		Condición n.º 3	
	ROX	FAM	ROX	FAM	ROX	FAM
GC Diana	100	100	0	0	100	100
IAC Diana	0	0	300	300	300	300

(continuación)

	Condición n.º 1		Condición n.º 2		Condición n.º 3	
	ROX	FAM	ROX	FAM	ROX	FAM
MOTA:	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
Media:	65710	2062	132	58077	74422	12068

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Becton, Dickinson and Company
<120> Ensayo de *Neisseria Gonorrhoeae*
<130> P-5677
- 10 <150> EP 05102954.4
<151> 14-04-2005

<150> US 10/825908
15 <151> 16-04-2004

<160> 23

<170> Microsoft Word 2000
- 20 <210> 1
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Cebador de Amplificación

<400> 1
30 cgtctccagt ccagacttct cggaatcaa aagcgaatgc g

<210> 2
<211> 41
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de Amplificación
- 40 <400> 2
actacgtcga atgcatgtct cggaacttct tcatttttg c

<210> 3
<211> 13
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador Amortiguador
 <400> 3
 ccgcagcata cgc
 <210> 4
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Cebador Amortiguador
 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 4
 15 tgccatatg ctttg
 <210> 5
 <211> 41
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Adaptador
 25 <400> 5
 acgttagcca ccatactga gtgatgacgg ttttcattg c
 <210> 6
 <211> 43
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Adaptador
 35 <400> 6
 actgatccgc actaacgact gcttgctag ttgcctcaga cat
 <210> 7
 <211> 35
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Sonda de Detección; T en la posición 1 está marcada con dabcil; T en la posición 15 está marcada con Rodamina
 <400> 7
 tagtgcccga gcactacgtt agccaccata ctga
 50 <210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Sonda de Detección; T en la posición 1 está marcada con fluorosceína; T en la posición 15 está marcada con dabcil
 60 <400> 8
 tagcaccgga gtgctaactg atccgcacta acgact
 <210> 9
 <211> 58
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Control de Amplificación Interna

 <400> 9
 5 aatcaaaagc gaatgcgtat gtctgaggca actagcaaag ctgcaaaaga tgaagaag

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

 <220>
 <223> Cebador de Amplificación

 15 <400> 10
 cgtctccagt ccagacttct cggaatcaa aagcgaatgc

 <210> 11
 <211> 42
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de Amplificación
 25
 <400> 11
 cgtctaccgt ccagacttct cggaatcaa aagcgaatgc gc

 <210> 12
 <211> 42
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de Amplificación
 35
 <400> 12
 actacgtcga atgcatgtct cgggacttct tcatcttttg cc

 40 <210> 13
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador de Amplificación

 <400> 13
 actacgtcga atgcatgtct cgggagcttc tcatctttt gcc
 50
 <210> 14
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador Amortiguador

 <400> 14
 60 ccgcagcata cg

 <210> 15
 <211> 14
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador Amortiguador

 <400> 15
 5 ccgcagcata cgcg

 <210> 16
 <211> 14
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Amortiguador

 <400> 16
 15 ttgcgcatat gctt

 <210> 17
 <211> 15
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Amortiguador

 <400> 17
 25 ctttgatgat ttgcg

 <210> 18
 <211> 42
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Adaptador

 <400> 18
 35 acgttagcca ccatactga gcaatgaaaa accgtcatc ac

 <210> 19
 <211> 59
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Control de Amplificación Interna

 <400> 19
 45 aatcaaaagc gaatcgtat gtctgaggca actagcaaag cagtgcaaaag atgaagaag
 50
 <210> 20
 <211> 41
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Adaptador

 <400> 20
 60 actgatccgc actaacgact gtgatgacgg ttttcattg c

 <210> 21
 <211> 44
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Adaptador

 <400> 21
 5 acgttagcca ccatactga gcttgctag ttgcctcag acat

 <210> 22
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda de Detección; T en la posición 1 está marcada con dabcil; A en la posición 10 está marcada con Rodamina
 15 tccccgagta cgtagccac catactga

 <210> 23
 <211> 29
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda de Detección; T en la posición 1 está marcada con fluorosceína; A en la posición 10 está marcada con dabcil
 25
 <400> 23
 tccccgagta ctgatccgca ctaacgact

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* que comprende:
 - (a) en una muestra, amplificar la secuencia diana usando un primer cebador de amplificación que tiene una secuencia que comprende la secuencia de unión a diana de al menos una de las SEQ ID NO: 1 o 2, en la que la secuencia de unión a diana para la SEQ ID NO:1 es AATCAAAAGCGAATGCG y la secuencia de unión a diana de la SEQ ID NO:2 es CTTCTTCATCTTTTGC, en presencia de cebadores amortiguadores que consisten en las SEQ ID NO:3 y 4; y
 - (b) detectar la secuencia diana amplificada.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la secuencia diana se amplifica usando un primer y un segundo cebador de amplificación, teniendo el primer cebador de amplificación una secuencia que comprende la secuencia de unión a diana de la SEQ ID NO:1, en la que la secuencia de unión a diana para la SEQ ID NO:1 es AATCAAAAGCGAATGCG, y comprendiendo el segundo cebador de amplificación la secuencia de unión a diana de la SEQ ID NO:2, en la que la secuencia de unión a diana de la SEQ ID NO:2 es CTTCTTCATCTTTTGC.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que:
 - (a) el primer cebador de amplificación comprende la secuencia de unión a diana de la SEQ ID NO:1, y
 - (b) el segundo cebador de amplificación comprende la secuencia de unión a diana de la SEQ ID NO:2.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha reacción de amplificación se selecciona del grupo que consiste en la detección directa, la reacción de amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación in situ, la amplificación mediada por transcripción (TMA), la replicación de secuencia autosostenida (SSR), la amplificación por círculo rodante o la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA).
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 comprende la secuencia de unión a diana de las SEQ ID NO: 1 o 2, en la que la secuencia de unión a diana para la SEQ ID NO:1 es AATCAAAAGCGAATGCG y la secuencia de unión a diana para la SEQ ID NO:2 es CTTCTTCATCTTTTGC, en presencia de un control de amplificación interno que consiste en las SEQ ID NO:9 o 19 y cebadores amortiguadores que consisten en las SEQ ID NO:3 y 4, y amplificar dicho control de amplificación interno; y
 - (b) detectar al menos uno de dichos cebador de amplificación hibridado y control de amplificación interno.