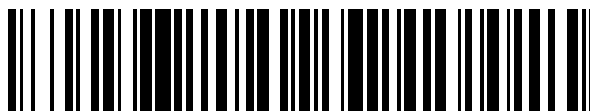


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 543**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2011** **PCT/US2011/058255**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012** **WO12061225**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011** **E 11838580 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 2635696**

54 Título: **Ensayo de Gardnerella vaginalis**

30 Prioridad:

**01.11.2010 US 408840 P**

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

**16.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STEVENS, JASON, P.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 659 543 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 *Gardnerella vaginalis*

5 **Lista de secuencias**

La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha enviado en formato ASCII a través de EFS-Web. Dicha copia ASCII, creada el 19 de octubre, 2011, se denomina Lista de secuencias para *Gardnerella vaginalis*\_ST25.txt y tiene 15,6 kilobytes de tamaño.

10

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de amplificación de ácidos nucleicos para la detección y/o cuantificación de secuencias de ácido nucleico de *Gardnerella vaginalis* (también denominada en el presente documento GV). La presente invención proporciona oligonucleótidos que son complementarios o que hibridan con secuencias de ácido nucleico de *Gardnerella vaginalis* para la amplificación y/o detección de la misma. La presente invención proporciona un ensayo de amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) o un ensayo de PCR para la amplificación y/o detección de secuencias de ácido nucleico de *Gardnerella vaginalis*. El ensayo de SDA puede ser opcionalmente un SDA dúplex que incluye controles de amplificación internos (IAC).

20

**Antecedentes de la invención**

*Gardnerella vaginalis* (GV) es un cocobailo gram variable que se ha discutido que es el único agente causante de vaginitis no específica. Kretzschmar U, et al. "Purification and Characterization of *Gardnerella vaginalis* Hemolysin *Curr. Microbiol.* 23(1):7 13 (1991). El diagnóstico y detección de este organismo con frecuencia se basa en los descubrimientos patológicos o clínicos y se puede confirmar por técnicas de aislamiento y tinción. Por ejemplo, en Kretzschmar et al., la base para la detección y caracterización de GV fue la hemolisina extracelular producida por el organismo. Gelber S., et al. "Functional and Phylogenetic Characterization of Vaginolysin, the Human Specific Cytolysin from *Gardnerella vaginalis*" *J. Bacteriol.* 190(11):3896 3903 (2008) identificó otra de las hemolisinas extracelulares producidas por GV como vaginolisina. Rottini, G., et al. "Identification and Partial Characterization of a Cytolytic Toxin Produced by *Gardnerella vaginalis*" *Infect. and Immun.* 58(11):3751 3758 (1990) identifica la hemolisina producida por GV como citolisina. Las dificultades en aislar estas toxinas producidas por GV se describen en Cuaci S, et al. "Pore forming and haemolytic properties of the *Gardnerella vaginalis* cytolysin," *Mole. Microbio.* 9(6):1143 1155 (1993)

35

Se ha escrito mucho sobre la medida y detección de las toxinas producidas por GV para detectar GV. Sin embargo, se sigue buscando un método para detectar GV basado en el organismo mismo, en oposición a las toxinas que produce. Por tanto, hay una necesidad para un ensayo que disminuya la posibilidad de resultados negativos falsos.

40

La citación o discusión de una referencia en el presente documento no se debe interpretar como una admisión de que tal es estado de la técnica respecto a la presente invención.

**Compendio de la invención**

45

En el presente documento se describe un método para detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia o ausencia de *Gardnerella vaginalis* en una muestra, dicho método comprende: (a) amplificar la secuencia diana usando un primer cebador de amplificación que tiene una secuencia que consiste esencialmente en la secuencia de unión a diana de cualquier cebador de amplificación divulgado en el presente documento y (b) detectar la secuencia diana amplificada. En ciertas formas de realización, también se describe el uso de un segundo cebador de amplificación que consiste esencialmente en la secuencia de unión a diana de cualquier cebador de amplificación divulgado en el presente documento.

50

Los oligonucleótidos descritos en el presente documento se pueden usar para detectar la presencia de GV seleccionando para una secuencia de ácido nucleico amplificada encontrada en los genes que producen las toxinas vaginolisina y citolisina/hemolisina. A este respecto, los inventores han elegido referirse a esta diana como el gen vly. Sin embargo, la bibliografía también se refiere al gen de la citolisina y al gen de la hemolisina de GV. Si estos son genes diferentes o no o simplemente nombres diferentes para el mismo gen es irrelevante para la invención descrita en el presente documento. Mientras que la secuencia diana se denomina en el presente documento como el "gen vly" o la "diana vly" es la diana misma (es decir, un gen que produce una de las toxinas anteriormente mencionadas), y no el nombre de la diana génica la que es el foco de la presente invención. Aunque los solicitantes no quieren estar unidos a una teoría particular, los solicitantes creen que estas toxinas están todas producidas por el mismo gen. Sin embargo, la presente invención no se debe limitar al nombre del gen de GV en el que se localiza la secuencia diana.

60

65

En una forma de realización, se divulga en el presente documento un método para detectar una secuencia diana de *Gardnerella vaginalis*. En este método se proporciona al menos un cebador oligonucleotídico que amplificará al

menos alguna parte del gen vly de GV y, después de la amplificación, la secuencia diana amplificada se detecta. Los ejemplos del gen vly de GV incluyen SEQ ID NO. 1, 2, 23, 24 y 25.

Se han identificado regiones muy conservadas del gen vly. La secuencia muy conservada está en la localización entre aproximadamente los pares de bases 328-523 en el gen vly (para las cepas 14018, 14019 y 49145 descritas en el presente documento). En una forma de realización preferida, la secuencia diana es la región muy conservada del gen vly.

El gen vly diana muy conservado para las cepas 14018, 14019 y 49145 (que se corresponden a los respectivos números de acceso a Genbank EU522486, EU522487 y EU522488) son SEQ ID NO. 1, 23 y 24. SEQ ID NO. 2 y 25 son el gen vly diana muy conservado para dos clones (T10 y T11, respectivamente). Los clones tienen números de acceso a Genbank EU697811 y EU697812. La localización de la región muy conservada en los clones está en aproximadamente los pares de bases 331-526. El gen vly está muy conservado entre las cepas y clones, pero hay variaciones entre las cepas y clones.

Dentro del gen vly hay regiones diana ventajosas que ellas mismas están muy conservadas. Una de tales regiones diana se ilustra en la figura 1 y también se identifica como SEQ ID NO. 20. SEQ ID NO. 20 es los pares de bases 325-524 de SEQ ID NO. 1. Entre las tres cepas de vly, no hay variaciones en SEQ ID NO. 20. Sin embargo, la figura 1 ilustra que hay variaciones de secuencia menores en esta región diana entre las cepas y clones de GV. Aunque la secuencia es idéntica para las tres cepas, la secuencia para cada cepa se ilustra (como 100, 110 y 120) en la figura 1. SEQ ID NO. 21 es la secuencia de la región diana para los dos clones (T10 y T11) y es idéntica para cada uno de los dos clones. Sin embargo, hay alguna diferencia menor entre SEQ ID NO. 20 y SEQ ID NO. 21. Estas variaciones de SEQ ID NO. 21 (con respecto a SEQ ID NO. 20) se ilustran en 130 y 140 en la figura 1. Las variaciones son muy pequeñas: 7 pares de bases de los 196 pares de bases en la secuencia diana ventajosa. Además, las variaciones están en las mismas localizaciones para todas las secuencias. El experto en la materia puede diseñar cebadores y sondas que no se alinean respecto a las localizaciones en las regiones diana donde se encuentran variaciones.

Como se advierte de la figura 1, la región diana muy conservada del gen vly es sustancialmente idéntica para las varias cepas y clones identificados anteriormente. Solo se ilustra la hebra sentido de la región diana en la figura 1. Puesto que la hebra antisentido es el complemento de la hebra sentido, la hebra antisentido, aunque no se ilustra específicamente en la figura 1, se conoce de la secuencia enumerada en la figura 1. Las secuencias en la figura 1 son cuatro nucleótidos más largas que SEQ ID NO. 20 y 21, pero de otra manera son idénticas. Los nucleótidos adicionales se proporcionan en la figura 1 para ilustrar de forma más clara la relación entre los cebadores y la diana en los extremos de la secuencia diana.

Se describen conjuntos de sondas de oligonucleótidos en el presente documento que se diseñan para seleccionar para esta región muy conservada y ofrecen un mecanismo de detección. El diseño del conjunto de sondas se basa en un número de factores, entre los cuales es principal el ensayo en el que se usa en conjunto de sondas. Los ensayos para la detección de secuencias de ADN o ARN se conocen bien en la técnica. Estos ensayos típicamente usan algún tipo de amplificación o algún tipo de imagenología para confirmar la presencia del ADN diana. Los ejemplos de reacciones de amplificación incluyen PCR (reacción en cadena de la polimerasa), SDA (amplificación por desplazamiento de la hebra), TMA (amplificación mediada por transcripción) y LCR (reacción en cadena de la ligasa).

En una forma de realización, el mecanismo de amplificación seleccionado para detección es SDA. SDA es un mecanismo de amplificación isotérmica y por tanto no implica ciclos térmicos. Como tal, los conjuntos de sondas de SDA se diseñan para una temperatura de fusión diana ( $T_m$ ) en un intervalo estrecho predeterminado. La temperatura de fusión diana ( $T_m$ ) es la temperatura a la que al menos el cincuenta por ciento del oligonucleótido está hibridado con su complemento perfecto. El experto en la materia es consciente de que la  $T_m$  de una secuencia oligonucleotídica está determinada por el número de pares de bases en la secuencia, así como del tipo de bases en la secuencia. Estas directrices para diseñar oligonucleótidos las conoce bien el experto en la materia y no se explican en detalle en el presente documento.

En una forma de realización de la presente invención, partes de los cebadores y sondas para el ensayo SDA son complementarios a la región diana del gen vly representado por SEQ ID NO. 20. La diana primero se desnaturaliza. Los conjuntos de sondas se configuran de modo que los cebadores directos y la sonda se unen a (es decir, son complementarios a) la hebra antisentido de la diana desnaturalizada y los cebadores inversos se unen a la hebra sentido de la diana desnaturalizada. Las partes de los cebadores y sondas que se unen a la diana para una forma de realización de un conjunto de sondas de SDA se enumeran en la siguiente tabla 1 junto con su localización en la parte muy conservada del gen vly. Puesto que la región muy conservada del gen vly es virtualmente idéntica para las varias cepas de GV, la región muy conservada del gen vly de cada cepa o clon no se enumera por separado.

Los conjuntos de cebador/sonda oligonucleotídicos de SDA descritos en el presente documento son lo suficientemente complementarios a estas partes del gen para unirse de forma selectiva a estas partes.

**Tabla 1: Secuencias de unión a diana para conjunto de cebador y sonda de SDA**

Número de SEQ ID	SECUENCIA	Descripción	Localización* en la región muy conservada de vaginolisina (vly)
SEQ ID NO: 3	AAT ATG CCA AGC CTG A	(región del cebador de amplificación de vly de GV LP6 complementario a la hebra antisentido del gen vly (o gen gvh)) de GVH	388-403
SEQ ID NO: 4	GCA AAT CAA CGC TCA A	(región del cebador de amplificación de vly de GV RP7 complementario a la hebra sentido del gen vly (o gen gvh)) de GVH	430-445
SEQ ID NO: 5	GCA AAC CGC GCT CCA A	(región de sonda indicadora de vly de GV DT5 complementario a la hebra antisentido del gen vly (o gen gvh)) de GVH	409-424
SEQ ID NO: 6	GTA TAC CCA GGT GCT	(cebador de choque izquierdo o directo de vly de GV LB7 complementario a la hebra antisentido del gen vly (o gen gvh)) de GVH	343-357
SEQ ID NO: 7	GCG CTG AAC AGT TAC	(cebador de choque derecho o inverso de vly de GV RB8 complementario a la hebra antisentido del gen vly (o gen gvh)) de GVH	472-486

\* Número de acceso de Genbank EU522486

Para la forma de realización de SDA descrita en el presente documento, el conjunto de sondas oligonucleotídicas tiene cebadores de choque izquierdo y derecho, cebadores de amplificación izquierdo y derecho y una sonda. Como se ha indicado anteriormente, los cebadores izquierdos o directos y sondas se unen a la hebra antisentido del gen vly y los cebadores inversos o derechos se unen a las hebras sentido. Por tanto, las partes del gen vly a la que se unen estos cebadores y sondas son lo suficientemente complementarios a las secuencias de unión a diana SEQ ID NO. 3-7 para facilitar la hibridación de los cebadores y sondas a la misma.

Los cebadores y sonda pueden tener nucleótidos o secuencias adicionales unidos a los mismos. La sonda también tiene fracciones de imagenología adicionales fijadas a la misma. Estas fracciones facilitan la detección de la secuencia de ADN diana. Usando tal conjunto de sondas oligonucleotídicas, se puede realizar un ensayo SDA en una muestra para determinar la presencia o ausencia de la mayoría de las cepas de GV. En una forma de realización ilustrativa, se amplifica una región de aproximadamente 144 pares de bases del gen vly entre una sección del gen vly aproximadamente en el par de bases 343 hasta aproximadamente el par de bases 486 del gen vly.

Otras formas de realización de la invención usan diferentes secuencias de oligonucleótidos que se unen a la región del gen vly descrita anteriormente. Los conjuntos de cebadores/sonda se configuran no solo para unirse selectivamente a esta región del gen vly, sino para amplificar alguna parte de la secuencia del gen vly para la detección. Los oligonucleótidos descritos en el presente documento tienen una secuencia que es lo suficientemente complementaria o bien la hebra sentido o a la antisentido de la secuencia de ácido nucleico diana desnaturalizada para hacerla capaz de unirse a la diana. Los oligonucleótidos descritos en el presente documento también se pueden usar, sea solo o en combinación, para facilitar la detección mediante amplificación de la secuencia de ácido nucleico del gen vly. En una forma de realización, las sondas se diseñan para realizar un ensayo de PCR en tiempo real Taqman® en la parte diana del gen. Los ejemplos de dos conjuntos de sondas usados para ensayos de PCR en tiempo real Taqman®, descritos en términos de sus secuencias de nucleótidos, son:

**Tabla 2: Conjuntos de cebadores/sonda para PCR en tiempo real cuantitativa**

SEQ ID NO.	Descripción	Oligonucleótidos 5' Secuencia 3'	Localización ORF (pb)*
SEQ ID NO: 8	GVvlyDirecto 1	GGC GGC GAA AGT GCT GTA	457-474
SEQ ID NO: 9	GVvlyInverso 1	AGC CGT TCA CTG CGG AAG T	505-523
SEQ ID NO: 10	GVvlySonda 1	(6FAM)-TTC AGC GCC CAA CCA AGA GCT CTG T-(TAMRA)	479-503
SEQ ID NO: 11	GVvlyDirecto 2	GCC AAC GAT GAT CGC GTA T	328-346
SEQ ID NO: 12	GVvlyInverso 2	CAG GCT TGG CAT ATT GTC CAT	382-402
SEQ ID NO: 13	GVvlySonda 2	(6FAM)-CCC AGG TGC TCT TTT CCG TGC TGA-(TAMRA)	348-371

\* Número de acceso EU522486

En los ensayos de PCR, los cebadores directos y las sondas son lo suficientemente complementarios para hibridar con la hebra antisentido del ácido nucleico diana (en condiciones apropiadas) y los cebadores inversos son lo suficientemente complementarios para hibridar con la hebra sentido del ácido nucleico diana (en condiciones apropiadas). La figura 2 ilustra la localización de unión de los cebadores y sondas descritos en la tabla 2 relativos a la hebra sentido de la secuencia diana (la parte en cajas de la secuencia indica la localización del cebador/sonda específico asociado con la caja).

En aún otra forma de realización, los oligonucleótidos se pueden usar en un método para detectar la presencia o ausencia de GV en una muestra. En una forma de realización adicional, el método incluye tratar una muestra usando uno o más oligonucleótidos específicos para la secuencia diana en una reacción de amplificación de ácido nucleico y detectar la presencia o ausencia del producto ácido nucleico amplificado.

En una forma de realización ilustrativa, se selecciona SDA como la reacción de amplificación. En el contexto de esta forma de realización, los oligonucleótidos descritos en el presente documento adecuados para su uso en el ensayo SDA se usan en combinación como cebadores de amplificación, cebadores de choque y un detector en ese ensayo.

En otra forma de realización, se proporciona un kit para la detección de GV. El kit incluye uno o más de los oligonucleótidos descritos en el presente documento que se unen selectivamente al gen vly de GV y son capaces de amplificar una secuencia diana que se puede usar para la detección de ese organismo. El kit se proporciona con uno o más de los oligonucleótidos y reactivos tampón para realizar ensayos de amplificación.

En un aspecto del kit, se pueden proporcionar oligonucleótidos y reactivos para fines de SDA. En este aspecto, dos oligonucleótidos se proporcionan como cebadores de amplificación, dos oligonucleótidos se proporcionan como cebadores de choque y un oligonucleótido se puede proporcionar para uso como un detector.

En aún otro aspecto del kit, los oligonucleótidos para fines de SDA se pueden proporcionar en formato seco o líquido. En formato seco, la composición se puede aplicar a un receptáculo apropiado donde se pueden añadir la muestra y tampón de SDA apropiado para realizar el ensayo.

En aún otro aspecto del kit, se pueden proporcionar oligonucleótidos y reactivos para fines de 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.

En formas de realización ejemplares, el kit para una reacción de amplificación o detección tiene un oligonucleótido que tiene una secuencia de unión a diana que es cualquiera de SEQ ID NO. 3 a 13 y complementos de las mismas, y secuencias que comparten al menos el 70% de similitud de secuencia con SEQ ID NO. 3 a 13 y complementos de las mismas. En otras formas de realización, el kit tiene un oligonucleótido que tiene una secuencia de unión a diana que es cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 13 y complementos de las mismas, y secuencias que comparten al menos el 80% de similitud de secuencia con SEQ ID NO. 3 a 13 y complementos de las mismas. En otras formas de realización, el kit tiene un oligonucleótido que tiene una secuencia de unión a diana que es cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 13 y complementos de las mismas, y secuencias que comparten al menos el 90% de similitud de secuencia con SEQ ID NO. 3 a 13 y complementos de las mismas. En otras formas de realización, el kit tiene un oligonucleótido que tiene una secuencia de unión a diana que es cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 13 y complementos de las mismas.

La presente invención también proporciona un método para detectar una secuencia diana de *Gardnerella vaginalis* que comprende: (a) hibridar uno o más de los cebadores de amplificación divulgados en el presente documento con una secuencia diana en el gen vly diana para GV y (b) detectar dicho cebador de amplificación hibridado. En el método al menos un cebador de amplificación es una sonda indicadora que comprende además un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen TAMRA, 6ROX, o 6FAM.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra la hebra sentido de la región diana del gen vly de GV y variaciones en la secuencia de la hebra sentido para varias cepas y clones de GV y las posiciones de hibridación de formas de realización de cebadores y sondas descritas en el presente documento relativo a la hebra sentido;

La figura 2 ilustra tanto la hebra sentido como la antisentido de los nt 328-523 de la región diana y las posiciones de hibridación relativas de dos conjuntos de sondas de PCR ejemplares en la región diana y con las posiciones de hibridación de los cebadores y sondas ilustradas además delineando en la hebra sentido;

La figura 3 ilustra tanto la hebra sentido como la antisentido de los nt 328-523 de la región diana y las posiciones de hibridación relativas de un conjunto de sondas cebador/sonda de SDA ejemplar en la región diana y con las posiciones de hibridación de los cebadores y sonda ilustradas además delineando en la hebra sentido de la región diana; y

La figura 4 ilustra tanto la hebra sentido como la antisentido de un IAC para el método descrito en el presente documento y las posiciones de hibridación relativas de un conjunto de sondas cebador/sonda de SDA ejemplar en la región diana y con las posiciones de hibridación de los cebadores y sonda.

## 5 Descripción detallada de la invención

Cualquier definición proporcionada es por razón de claridad y no se debe considerar como limitante. Excepto donde se indica, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento se pretende que tengan el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la pertenece la invención.

En el presente documento se describen métodos y ensayos de amplificación de ácido nucleico para la detección y/o cuantificación de secuencias de ácido nucleico de *Gardnerella vaginalis* (GV). La presente invención proporciona uno o más oligonucleótidos que son complementarios o que hibridan con secuencias de ácido nucleico de *Gardnerella vaginalis* para la amplificación y/o detección de dichas secuencias. En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un control de amplificación interno (IAC). El IAC se puede usar en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos de la invención para determinar si las condiciones del ensayo son permisibles para amplificación y/o detección de una secuencia diana. Los oligonucleótidos se pueden usar en todos los tipos de reacciones de amplificación tales como, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación mediada por QB replicasa.

Los métodos de la invención son particularmente ventajosos sobre métodos tradicionales usados para la detección de *Gardnerella vaginalis*, ya que detectan el organismo mismo, más que los métodos y kits de detección del estado de la técnica, que detectan las toxinas (por ejemplo, vaginolisina) que son producidas por el organismo más que el organismo mismo.

La sensibilidad de un ensayo se refiere a la tolerancia de negativos falsos. El resultado de una prueba es negativo falso si el resultado de la prueba es negativo, pero la muestra realmente contiene la secuencia diana. Cuanto menor sea la cantidad de la secuencia diana que un ensayo puede detectar, mayor es la sensibilidad que tiene el ensayo.

La especificidad de un ensayo se relaciona con la tolerancia de positivos falsos. Un resultado de prueba es positivo falso si el resultado de prueba es positivo, pero la muestra realmente no contiene la secuencia diana. Por tanto, cuanto más específico es un ensayo, menor es el nivel de resultados positivos falsos.

Según una forma de realización de la presente invención, un resultado de un ensayo para detectar *Gardnerella vaginalis* en una muestra que utiliza un IAC se puede interpretar como se describe en la tabla 3.

**Tabla 3. Interpretación de un ensayo SDA dúplex**

IAC	Resultado			
	+	-	+	-
Secuencia diana para <i>Gardnerella vaginalis</i>	-	+	+	-
Presencia o ausencia de <i>Gardnerella vaginalis</i>	Ausencia	Presencia	Presencia	Reacción inhibitoria, se necesita volver a realizar el ensayo o modificarlo

Un IAC se puede usar en lugar de, y/o además de, un control de amplificación convencional (AC). Un experto en la materia entiende que la reacción AC convencional se realiza en una mezcla de reacción separada de la muestra que se va 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, una indicación de que la secuencia diana está ausente de una muestra de prueba se puede atribuir a señales inhibitorias en la reacción. Mientras que esta forma de reacción control es eficaz, no es la más deseable. Puesto que la reacción AC se realiza por separado, no puede reflejar exactamente las condiciones de las reacciones que contienen la muestra de prueba. Los métodos de la invención son particularmente útiles en que tienen un IAC y la reacción control se realiza en condiciones espaciales y temporales idénticas que la amplificación y/o detección de la secuencia diana minimizando de esta manera el error humano.

En el presente documento se describen cebadores de amplificación que hibridan con una secuencia diana (es decir, una secuencia de *Gardnerella vaginalis*). En esas formas de realización donde se usa un IAC, se proporcionan cebadores de amplificación que hibridan con el IAC. En algunas formas de realización de la invención, un cebador de choque o su respectiva secuencia de unión a diana descrita en la tabla 1 o las figuras 1, 3 y 4, se puede usar como un cebador de amplificación. En algunas formas de realización de la invención, se elige un cebador de amplificación de los cebadores de amplificación descritos en las tablas 1 y 2 o las figuras 1-4 como se divulga en el

presente documento. En otra forma de realización de la invención, un cebador de amplificación se elige de las secuencias de unión a diana de los cebadores de amplificación descritos en las figuras 1-4 como se divulga en el presente documento.

## 5 Métodos de amplificación

Los oligonucleótidos divulgados en el presente documento se pueden usar en cualquier método de amplificación de ácidos nucleicos conocido en la técnica.

10 Los métodos de amplificación adecuados incluyen, pero no están limitados a reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"; véanse las patentes en EE UU No. 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; y 4.965.188), amplificación por desplazamiento de la hebra ("SDA"; véase Walker et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:392 (1992); Walker et al., *Nucl. Acids Res.* 20:1691 (1992); y la patente en EE UU No. 5.270.184), amplificación por desplazamiento de la hebra termofílica ("tSDA"; véase el documento EP 0 684 315), replicación de secuencia autosostenida ("3SR"; véase Guatelli et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:1874-78 (1990)), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico ("NASBA"; véase la patente en EE UU No. 5.130.238), sistema de replicasa Q $\beta$  (véase Lizardi et al., *BioTechnology* 6:1197 (1988)); reacción en cadena de la ligasa ("LCR"; véase la patente en EE UU No. 5.427.930); amplificación por círculo rodante (véase Lizardi et al., *Nat Genet* 19:225-232 (1998)) y amplificación basada en transcripción (véase Kwoh et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:1173-77 (1989)). Los cebadores de amplificación de la presente invención se pueden usar para llevar a cabo PCR, SDA o tSDA.

25 Las técnicas de amplificación de ácido nucleico se clasifican tradicionalmente según los requisitos de temperatura del proceso de amplificación. Las amplificaciones isotérmicas se realizan a una temperatura constante, en contraste con amplificaciones que requieren realizar ciclos entre temperaturas altas y bajas. Los ejemplos de técnicas de amplificación isotérmicas son: SDA; 3SR; el sistema de replicasa Q $\beta$ ; y la técnica divulgada en los documentos WO 90/10064 y WO 91/03573. Los ejemplos que requieren ciclos de temperatura son: PCR; LCR; amplificación basada en transcripción, y amplificación de restricción (patente en EE UU No. 5.102.784).

30 La SDA en general procede a lo largo de la siguiente ruta. Primero, los cebadores de amplificación se unen a una secuencia diana o a un producto de extensión monocatenario desplazado que se ha polimerizado previamente. Segundo, una polimerasa deficiente en exonucleasa 5'-3' incorpora un  $\alpha$ -tiodesoxinucleósido trifosfato (" $\alpha$ -tio dNTP") en un producto de extensión. Si el  $\alpha$ -tio dNTP es  $\alpha$ -tio dCTP, por ejemplo, se incorpora en el producto de extensión siempre que hay un residuo de G complementario en el molde. La incorporación de un  $\alpha$ -tio dNTP en el producto de extensión en un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción crea un sitio hemimodificado, es decir, un sitio modificado solo en la hebra del producto de extensión. Una endonucleasa de restricción mella el sitio de restricción hemimodificado bicatenario. A continuación, la endonucleasa de restricción se disocia del sitio de la mella. Por último, una polimerasa que es deficiente en actividad exonucleasa 5'-3' extiende desde el extremo 3' de la mella y desplaza la hebra de ADN posterior. Hacer mellas, extensión de la hebra y desplazamiento de la hebra se producen al mismo tiempo y de forma continua porque la extensión desde la mella regenera otro sitio de restricción que se puede mellar. Cuando se usa un par de cebadores de amplificación que hibrida cada uno con una de las dos hebras de un dúplex bicatenario que comprende una secuencia diana, la amplificación es exponencial porque tanto la hebra sentido como la antisentido sirven como molde 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 mellan sus sitios de reconocimiento bicatenarios cuando se incorpora un  $\alpha$ -tio dNTP y que son adecuadas para SDA incluyen *BsoB1I*, *Bsrl*, *BstNI*, *BsmAI*, *BstOI*, *Bsll*, *AvaI*, *HincII* y *NciI*. Se describe SDA adicionalmente en las patentes en EE UU No. 5.270.184, No. 5.455.166 y No. 5.648.211. Un ensayo SDA puede ser, pero no está limitado a, un SDA tradicional (o convencional) (como se describe en Walker et al., *PNAS* (1992) 89:392-396; patentes en EE UU No. 5.962.273, 5.712.124 y 5.744.311), un SDA termofílico (+ SDA como se describe en Walker et al., *Nucl. Acids Res.* (1992) 20:1691-1696, patentes en EE UU No. 5.648.211 y 5.744.311), y un SDA termofílico fluorescente en tiempo real homogéneo (como se describe en la patente en EE UU No. 6.379.888).

55 La contaminación cruzada con productos de amplificación transmitidos de reacciones de amplificación previas en reactivos, dispositivos de pipeteo y superficies de laboratorio, se puede reducir incorporando varios residuos en productos de extensión. Por ejemplo, se puede sustituir timina con 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato ("dU"), como se enseña en el documento EP 0 624 643. La escisión de dU que se incorpora en productos de amplificación está catalizada por uracilo ADN glicosilasa ("UDG"), que hace los productos de amplificación que contienen dU incapaces de amplificación adicional. La UDG misma se puede inactivar cuando sea apropiado para seguir la amplificación.

60 En el caso de tSDA, los cebadores y sus secuencias diana preferiblemente se seleccionan de modo que su contenido en GC sea menor del 70% de la composición de nucleótidos totales para minimizar la estructura secundaria e interacciones cebador-cebador que pueden limitar la eficacia de amplificación diana. Un cebador de amplificación adecuado para tSDA comprende, en orden desde el extremo 3' de la sonda al extremo 5', una secuencia de unión a diana, un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción, y una "cola". La secuencia de unión a diana hibrida específicamente con una secuencia complementaria del ácido nucleico diana. El sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción está reconocido por una endonucleasa de restricción que mella

una hebra de un dúplex de ADN cuando el sitio de reconocimiento está hemimodificado, como se describe por Walker et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:392 (1992) y Walker et al., *Nucl. Acids Res.* 20:1691 (1992). La cola 5' funciona como un sitio de re-cebado de la polimerasa cuando el resto del cebador de amplificación se mella y desplaza durante tSDA. La función de re-cebado de la cola sostiene la reacción de tSDA y permite la síntesis de múltiples amplicones a partir de una única molécula diana. La longitud y secuencia de la región de la cola puede variar, siempre que la cola permanezca hibridada con la diana después del mellado y que la cola no contenga secuencias que hibriden con la secuencia de unión a diana o con otros cebadores.

Algunos métodos de amplificación, tal como tSDA, usan un "cebador de choque" o "cebador externo" para desplazar los productos de extensión del cebador. Un "cebador de choque" o "cebador externo" es un cebador usado para desplazar un cebador de amplificación y su producto de extensión en una reacción de amplificación. Un cebador de choque hibrida con una secuencia diana antes de un cebador de amplificación de modo que la extensión del cebador de choque desplaza el cebador de amplificación posterior y su producto de extensión. Los productos de extensión de cebador alternativamente se pueden desplazar calentando. Los cebadores de choque pueden hibridar con cualquier secuencia diana que sea anterior de los cebadores de amplificación y que esté lo suficientemente cerca al sitio de unión del cebador de amplificación para desplazar el producto de amplificación del cebador de amplificación tras la extensión del cebador de choque. Los malos emparejamientos entre la secuencia del cebador de choque y la secuencia diana generalmente no afectan la eficacia de amplificación, siempre que el cebador de choque aún hibride con la secuencia diana. Además, la especificidad del sistema SDA para la amplificación de la secuencia diana en preferencia a otros ácidos nucleicos no depende de la especificidad del/los cebador(es) de choque para hibridar con el ácido nucleico diana. La especificidad de un sistema SDA para la secuencia diana deriva de la fidelidad de hibridación de los cebadores y sondas de SDA u oligonucleótidos usados para la detección de productos amplificados.

Cuando una reacción de amplificación usada según la invención es una reacción tSDA, las polimerasas que se pueden usar incluyen, pero no están limitadas a, *exo*<sup>-</sup> Vent (New England Biolabs), *exo*<sup>-</sup> Deep Vent (New England Biolabs), Bst (BioRad), *exo*<sup>-</sup> Pfu (Stratagene), Bca (Panvera), y Taq calidad de secuenciación (Promega). Se pueden identificar otras rutinariamente usando el ensayo de extensión anterior. Las polimerasas Tth (Boehringer), Tfi (Epicentre), REPLINASE (DuPont) y REPLITHERM (Epicentre) son capaces de desplazar una hebra de una mella, pero también tienen actividad exonucleasa 5'-3'. Estas polimerasas son útiles en los métodos de la invención después de la eliminación de la actividad exonucleasa, por ejemplo, por ingeniería genética. Como la termoestabilidad de las endonucleasas de restricción termoestables en general está limitada a menos de 65°C, las polimerasas termofílicas con actividad óptima a aproximadamente esta temperatura o menor (por ejemplo, Bst y Bca) son más compatibles con endonucleasas de restricción termofílicas en la reacción.

Los componentes de la presente invención se pueden optimizar a una forma donde cada componente se podría secar y rehidratar cuando se necesite usando cualquier método conocido en la técnica. (Véase Little et al., *Clinical Chemistry* 45(6):777-784 (1999)).

#### Diseño de cebadores

Un "cebador de amplificación" es un oligonucleótido para la amplificación de una secuencia diana por extensión del oligonucleótido después de hibridar con una secuencia diana o por ligación de múltiples oligonucleótidos que están adyacentes cuando hibridan con la secuencia diana. Al menos una parte del cebador de amplificación hibrida con la secuencia diana. Esta parte se denomina la secuencia de unión a diana y determina la especificidad por la diana del cebador. Se debe entender que las secuencias de unión a diana ejemplificadas en la presente invención también se pueden usar en una variedad de otras maneras para la detección de GV. Por ejemplo, las secuencias de unión a diana divulgadas en el presente documento se pueden usar alternativamente como sondas de hibridación para la detección directa de GV, sea sin amplificación anterior o en un ensayo tras la amplificación. Tales métodos de hibridación se conocen bien en la técnica y típicamente emplean un marcador detectable asociado con o unido a la secuencia de unión a diana para facilitar la detección o hibridación.

El diseño de los cebadores de amplificación se puede optimizar para cada método de amplificación. Como no se requieren secuencias o estructuras especiales para dirigir la reacción de amplificación, los cebadores de amplificación para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden consistir solo en secuencias de unión al molde. Sin embargo, otras reacciones de amplificación requieren secuencias de nucleótidos especializadas, además de la secuencia de unión a diana, para que la reacción siga. Por ejemplo, un cebador de amplificación para usar en un ensayo SDA comprende además un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción 5' respecto de la secuencia de unión a diana (véase las patentes en EE UU No. 5.455.166 y 5.270.184). El cebador de amplificación también puede comprender un grupo 3'-OH, que es extensible por ADN polimerasa cuando la secuencia de unión al molde del cebador de amplificación está hibridada con la secuencia diana. Los cebadores de amplificación para replicación de secuencia autosostenida (3SR) y ensayo basado en secuencia de ácido nucleico (NASBA), en contraste, comprenden un promotor de ARN polimerasa cerca del extremo 5'. (Se describen ensayos 3SR en Guatelli et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878). El promotor está unido a la secuencia de unión a diana y sirve para dirigir la reacción de amplificación dirigiendo la transcripción de múltiples copias de ARN del



molde. Tales secuencias además de la secuencia de unión a diana que son necesarias para una reacción de amplificación particular, se conocen bien en la técnica.

Al diseñar los cebadores de amplificación y los cebadores de choque de la presente invención, se deben considerar problemas generales conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando una secuencia diana que comprende un gran número de repeticiones GC y AT se usa para diseñar un cebador, se debe tener cuidado para minimizar las potenciales interacciones diméricas para evitar la autohibridación de los cebadores. Los cebadores que pueden formar cuatro o más enlaces consecutivos consigo mismos, u ocho o más enlaces inter-hebra con otros cebadores, en general se deben evitar. Los cebadores que pueden formar dímeros 3' se deben evitar especialmente, porque hibridar en los extremos 3' del cebador, incluso de forma transitoria, producirá extensión del cebador debido a la acción de la polimerasa y la ruina del cebador. Se pueden usar ciertos programas de software informático (por ejemplo, Oligo™, National Biosciences, Inc., Plymouth, Minn) en el diseño de los cebadores para evitar los problemas. Las combinaciones de cebadores también se criban para condiciones óptimas.

Como se sabe en la técnica, el apareamiento o hibridación de secuencias de ácido nucleico complementarias y parcialmente complementarias también se puede obtener por ajuste de las condiciones de reacción para aumentar o disminuir la rigurosidad (por ejemplo, ajuste de la temperatura o contenido en sal del tampón). Tales modificaciones de las secuencias divulgadas y cualquier ajuste necesario de condiciones están abarcadas por la presente invención. Se puede encontrar información en referencia a las condiciones de tampón en Experimental Design in Biotechnology por Dr. Perry Haaland (Marcell Dekker, NY, 1989).

En las formas de realización que utilizan un IAC, una reacción de amplificación dúplex, se diseña un cebador de amplificación para que sea capaz de hibridar tanto con una secuencia diana de GV como una secuencia IAC y amplificar la secuencia con la que hibrida. Esto se logra usando una secuencia de ácido nucleico compartida entre la secuencia diana de GV y una secuencia IAC para diseñar un cebador de amplificación. Se pueden añadir opcionalmente otras secuencias, según se requiera para la realización de una reacción de amplificación seleccionada, a un cebador de amplificación como se divulga en el presente documento.

A modo de ejemplo, pero no limitación, los cebadores de amplificación para uso en un ensayo SDA en general comprenden una secuencia de unión al molde 3', un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción que se puede mellar 5' respecto a la secuencia de unión al molde, y una secuencia cola de aproximadamente 10-25 nucleótidos de longitud 5' respecto al sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. Tal cebador de amplificación puede contener un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BsoBI, que se mella durante la reacción SDA. Será aparente para el experto en la materia que otros sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que se pueden mellar se pueden sustituir por el sitio de reconocimiento de BsoBI. La secuencia cola no debe contener el sitio de restricción usado para SDA y secuencias que hibriden con su propia secuencia de unión a diana o con los otros cebadores (por ejemplo, cebadores de choque).

En algunas formas de realización, se usa un par de cebadores de amplificación, cada uno de los cuales hibrida con una de las dos hebras de una secuencia diana bicatenaria o secuencia IAC. En este caso, la amplificación es exponencial porque tanto la hebra sentido como la antisentido 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.

En algunas formas de realización, los métodos de la presente invención abarcan un cebador de amplificación que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 3 y 4 o sus respectivas secuencias de unión a diana. En otras formas de realización, los métodos de la presente invención abarcan al menos dos cebadores de amplificación, en donde un primer cebador de amplificación comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 3 o sus respectivas secuencias de unión a diana; y un segundo cebador de amplificación comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 4 o sus respectivas secuencias de unión a diana.

En algunas formas de realización, los métodos de la presente invención abarcan uno más cebadores de choque. Un cebador de choque es un cebador usado para desplazar un cebador de amplificación y su producto de extensión en una reacción de amplificación. Un cebador de choque hibrida con una secuencia diana antes de un cebador de amplificación, de modo que la extensión del cebador de choque desplaza el cebador de amplificación posterior y su producto de extensión. Un cebador de choque también puede funcionar como un cebador de amplificación. En algunas formas de realización, los métodos de la presente invención abarcan uno o más cebadores de choque. En ciertas formas de realización, el cebador de choque comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia que comprende SEQ ID NO: 6 o 7. En una forma de realización, un cebador de choque comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia parcial o completa de SEQ ID NO: 6 o 7. En otra forma de realización, los métodos de la presente invención abarcan al menos dos cebadores de choque, en donde un primer cebador comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 6 y un segundo cebador que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 7.

Los cebadores/sondas descritos en el presente documento se describen en términos de ser el 100% complementarios a sus secuencias de unión a diana. Sin embargo, basado en las condiciones de diseño de cebadores descritas anteriormente, los cebadores y sondas se pueden unir a las secuencias diana incluso aunque sean menos del 100% complementarios con esas regiones. El grado de complementariedad necesario depende de una variedad de factores incluyendo la rigurosidad de las condiciones de unión. Dependiendo de las condiciones de rigurosidad empleadas, los cebadores y sondas se pueden modificar para incluir diferentes bases en su secuencia y todavía ser suficientemente complementarios para unirse a la región diana. Suficientemente complementarios, como se usa en el presente documento incluye complementariedad del 70% o más. En formas de realización preferidas, la complementariedad de los cebadores/sondas respecto a su secuencia diana es al menos el 80% sobre la longitud de la parte de unión de los cebadores/sondas. Más preferiblemente, la complementariedad de los cebadores y sondas hacia sus secuencias diana es del 90% o más.

#### Secuencias dianas

“Diana” o “secuencia diana” se refiere a una secuencia de ácido nucleico de GV que se va a amplificar y/o detectar. Una diana o secuencia diana incluye la secuencia de ácido nucleico de GV que se va a amplificar y cualquier segunda hebra complementaria. En algunas formas de realización, una secuencia diana puede ser monocatenaria o bicatenaria, en cuyo caso, una o ambas hebras se pueden unir a un cebador de amplificación. Una diana o secuencia diana también puede comprender una secuencia de nucleótidos que es reconocida por un oligonucleótido adaptador (es decir, secuencia de unión al adaptador). Los cebadores de la presente invención se diseñan para que hibriden con una región del gen vly de GV identificada en SEQ ID NO. 1, 2 y 23-25. La secuencia diana es preferiblemente las regiones diana identificadas en SEQ ID NO. 20 y 21.

#### Control de amplificación interno

“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 por separado de la secuencia diana. Se puede emplear cualquier método de detección conocido en la técnica.

Según la presente invención, una secuencia IAC se diseña para compartir secuencias de ácido nucleico con una secuencia diana de GV, por tanto, el/los mismo(s) cebador(es) de amplificación pueden amplificar tanto una secuencia IAC como una secuencia diana si está presente en la muestra. Una secuencia IAC también se diseña para tener algunas secuencias de ácido nucleico que se diferencian de una secuencia diana de GV, de modo que la detección de la secuencia IAC y la secuencia diana se puedan diferenciar. Puesto que una secuencia IAC se amplifica y/o detecta en la misma mezcla de reacción que una secuencia diana, los ensayos dúplex tienen la ventaja de detectar error humano o una condición de reacción inhibitoria, por ejemplo, la presencia de un inhibidor o la ausencia de un reactivo crítico. La presencia de un IAC en la misma reacción que la muestra que se va a ensayar elimina la necesidad para reacciones de control de amplificación separadas como se requiere por los ensayos SDA monoplex actuales.

Aunque sin pretender estar unido por un mecanismo de acción particular, la presencia de un IAC en la misma reacción que la secuencia diana permite que el ensayo de amplificación de la presente invención detecte la presencia de inhibidores de la reacción y/o condiciones que pueden indicar un resultado negativo falso. Como se usa en el presente documento, un resultado negativo falso 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 error humano o una condición de reacción, por ejemplo, la falta de un elemento de reacción crítico, o la existencia de un inhibidor de la reacción, o un error en la realización del ensayo.

Se usa un método de detección en donde tal método diferencia productos de amplificación de una secuencia diana de productos de amplificación de una secuencia IAC. En una forma de realización, los productos de amplificación de la secuencia diana y el IAC se pueden detectar por sondas de detección marcadas con colorantes diferentes. En un ejemplo, se usa fluoresceína para detectar productos de amplificación de la secuencia diana y se usa fluorescencia de rodamina para detectar los productos de amplificación del IAC.

En algunas formas de realización, se diseña una secuencia IAC de modo que bien su extremo 3' o 5' contenga una secuencia en común con una secuencia de ADN de GV. En algunas otras formas de realización, se diseña un IAC de modo que tanto el extremo 3' como 5' contengan secuencias en común con una secuencia de ADN para que se una un cebador de amplificación.

También se puede diseñar una secuencia IAC para que comprenda una secuencia de ácido nucleico que es diferente de la secuencia diana de GV que se va a amplificar, de modo que la detección de los productos de amplificación del IAC y la secuencia diana se pueda diferenciar.

En algunas formas de realización, los métodos de la presente invención utilizan un IAC que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 19. Nótese que SEQ ID NO: 19 es bastante similar a SEQ ID NO. 20 y 21 (las secuencias de unión a diana preferidas) excepto para la región donde el detector

(GVvlyACD2b) se une a la diana IAC. GVvlyACD2b se identifica en el presente documento como SEQ ID NO: 22. Aparte del detector, los cebadores de choque y cebadores para la diana IAC son los mismos cebadores de choque y cebadores para SDA (SEQ ID NO. 14-17).

Los cebadores descritos anteriormente se describen en términos de ser el 100% complementarios a sus secuencias de unión a diana. Como se describe posteriormente, los cebadores y sondas se pueden unir a secuencias diana incluso aunque sean menos del 100% complementarios con esas regiones. El grado de complementariedad necesario depende de una variedad de factores incluyendo la rigurosidad de las condiciones de unión. Dependiendo de las condiciones de rigurosidad empleadas, los cebadores y sondas se pueden modificar para incluir diferentes bases en su secuencia y todavía ser suficientemente complementarios para unirse al gen vly diana. Suficientemente complementarios, como se usa en el presente documento incluye complementariedad del 70% o más. En formas de realización preferidas, la complementariedad de los cebadores/sondas respecto a su secuencia diana es al menos el 80% sobre la longitud de la parte de unión de los cebadores/sondas. Más preferiblemente, la complementariedad de los cebadores y sondas hacia sus secuencias diana es del 90% o más.

Mientras que los oligonucleótidos descritos en el presente documento deben ser suficientemente complementarios para unirse a sus respectivas partes de la diana, se reconoce en algún punto que la secuencia de oligonucleótido se vuelve menos complementaria a la secuencia diana y se puede unir a otras secuencias de ácido nucleico. Por tanto, es deseable que las sondas oligonucleotídicas permanezcan lo suficientemente complementarias con su parte respectiva de la diana, y no pierdan selectividad para su respectivo sitio de unión diana.

#### Detección de ácidos nucleicos

Los productos de amplificación generados usando uno o más cebadores de la invención se pueden detectar por cualquier método conocido en la técnica. Como se usa en el presente documento, productos de amplificación incluye tanto las secuencias diana amplificadas como las secuencias IAC amplificadas. Los productos de amplificación se pueden detectar por hibridación con una sonda marcada usando técnicas convencionales, por ejemplo, una que hibrida con ácidos nucleicos amplificados en una secuencia que está entre los cebadores de amplificación. Alternativamente, los productos de amplificación se pueden detectar por su tamaño característico, por ejemplo, por electroforesis seguido por tinción con bromuro de etidio para visualizar los ácidos nucleicos. En una alternativa adicional, se usa un cebador de amplificación marcado. En aún una alternativa adicional, un cebador de amplificación/sonda interna marcada se extiende en la secuencia diana como describen Walker et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:392 (1992); o Walker et al., *Nucl. Acids Res.* 20:1691 (1992). En otra forma de realización, la detección se logra directamente mediante hibridación y extensión de una sonda indicadora marcada como se describe en la patente en EE UU No. 5.928.869 y la patente en EE UU No. 5.958.700. Los métodos de detección también incluyen un método quimioluminiscente en el que los productos amplificados se detectan usando una sonda de captura biotinilada y una sonda detectora conjugada a una enzima, como se describe en la patente en EE UU No. 5.470.723. Después de la hibridación de estas dos sondas en diferentes sitios entre los dos sitios de unión de los cebadores de amplificación, el complejo es capturado en una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina, y la señal quimioluminiscente se desarrolla y lee en un luminómetro.

En una forma de realización de la presente invención, el método de detección debe detectar tanto los productos de amplificación diana como los productos de amplificación IAC (si están presentes), y diferenciar entre los productos de amplificación detectados. Se puede usar cualquier método conocido en la técnica capaz de alcanzar este fin. Por ejemplo, los métodos de detección que se divulgan en Walker et al., *Nucl. Acids Res.*, (1992) 20:1691-1696, las patentes en EE UU Nos. 5.648.211, 5.962.273, 5.814.490, 5.928.869, 6.316.200, y la patente europea EP 0 678 582 se pueden usar según la presente invención. En otra forma de realización, se usan sondas y métodos universales para la detección de ácidos nucleicos (véase la patente en EE UU No. 6.379.888).

Muchos pares de colorantes donante/desactivadores conocidos en la técnica son útiles en la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC)/isotiocianato de tetrametilrodamina (TRICT), FITC/Texas Red (Molecular Probes), FITC/rodamina X, FITC/tetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxifluoresceína (6-FAM)/TAMRA y otros. La selección de un par donante/desactivador particular no es crítica. Para mecanismos de desactivación de transferencia de energía solo es necesario que las longitudes de onda de emisión del fluoróforo donante solapen con las longitudes de onda de excitación del desactivador, es decir, debe haber suficiente solapamiento espectral entre los dos colorantes para permitir transferencia de energía eficaz, transferencia de carga o desactivación de fluorescencia. El ácido p-(dimetilaminofenilazo) benzoico (DABCYL) es un colorante desactivador no fluorescente que desactiva eficazmente la fluorescencia de un fluoróforo adyacente, por ejemplo, fluoresceína o 5-(2'-aminoetil) aminonaftaleno (EDANS). Cualquier par de colorantes que produzca desactivación de fluorescencia en la sonda de detección de la invención se puede usar en los métodos de la invención, independientemente del mecanismo por el que se produzca la desactivación. También se conocen en la técnica métodos de marcaje terminal e interno y se pueden usar rutinariamente para unir los colorantes donante y desactivador en sus sitios respectivos en la sonda de detección.

La presente invención proporciona sondas de detección que son oligonucleótidos monocatenarios que comprenden SEQ IS NO: 5, 10 o 13 y un marcador. En ciertas formas de realización, el marcador comprende al menos un par

donante/desactivador fluorescente unido al oligonucleótido, en donde la fracción fluorescente es TAMRA o 6-FAM. Para el IAC la fracción fluorescente es ROX.

En algunas formas de realización, la presente invención proporciona SDA termofílica (tSDA) fluorescente en tiempo real homogénea dúplex. La SDA termofílica fluorescente en tiempo real homogénea es una tSDA modificada que detecta secuencias diana de ácido nucleico por mecanismos desactivadores de fluorescencia (véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 6.379.888). Por ejemplo, en una forma de realización, una sonda de detección puede comprender un par donante/aceptor fluorescente de modo que se produce desactivación fluorescente en ausencia de una secuencia diana. Aunque sin pretender estar unido por un mecanismo de acción particular, en ausencia de hibridación de la sonda de detección con un segundo oligonucleótido (que se produce por amplificación de una secuencia diana), la sonda adopta una conformación que pone al donante y el desactivador en proximidad espacial cercana y produce desactivación de la fluorescencia del donante. La sonda se puede plegar en una estructura secundaria ordenada (por ejemplo, un cuarteto G, horquilla o triple hélice), en un ovillo estadístico, o cualquier otra conformación que lleve al donante y desactivador en proximidad lo suficientemente cercana para producir desactivación de fluorescencia. Sin embargo, cuando la sonda de detección hibrida con un segundo oligonucleótido, la estructura secundaria de bases apareadas intramolecularmente de la sonda de detección se desnaturaliza o linealiza, lo que aumenta la distancia entre el donante y el desactivador y de esta manera reduce o elimina la desactivación de fluorescencia. De forma alternativa, la sonda de detección se puede diseñar como una sonda de detección lineal (es decir, no se pliega en una estructura secundaria), en donde la distancia entre el donante y el desactivador es lo suficientemente corta para producir desactivación de fluorescencia. En este caso (y opcionalmente en casos donde se usa una sonda de detección no lineal descrita en el presente documento), la sonda de detección también contiene un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción (RERS) entre el par donante/desactivador fluorescente. El emparejamiento de bases intermolecular entre la sonda de detección y un segundo oligonucleótido hace el RERS bicatenario y por tanto puede cortarse o mellarse por una endonucleasa de restricción. Aunque sin pretender estar unido por un mecanismo de acción particular, el corte o mellado por la endonucleasa de restricción separa el donante y aceptor en fragmentos de ácido nucleico separados, lo que produce desactivación disminuida.

Se puede seguir un cambio asociado en un parámetro de fluorescencia (por ejemplo, un aumento en intensidad de fluorescencia del donante, una disminución en la intensidad de fluorescencia del aceptor o una proporción de las intensidades de fluorescencia del donante y/o aceptor) según los métodos de la invención para detectar y/o seguir la presencia de la secuencia diana. Habitualmente se prefiere seguir un cambio en la intensidad de fluorescencia del donante, ya que este cambio es típicamente mayor que el cambio en la intensidad de fluorescencia del aceptor. También se pueden seguir otros parámetros de fluorescencia tal como un cambio en la vida de fluorescencia según la invención.

#### Kits

La presente invención también proporciona kits para la amplificación y/o detección de ácidos nucleicos de GV que comprenden uno o más cebadores de amplificación que consisten esencialmente en SEQ ID NO: 8-18 o sus respectivas secuencias de unión a diana y al menos un envase que contiene tales cebadores. El kit puede incluir opcionalmente uno cualquiera o más de: un IAC, oligonucleótidos adaptadores, o sondas de detección. El kit puede incluir además otros componentes y reactivos para realizar una reacción de hibridación o amplificación, tal como hibridación Southern, hibridación por transferencia de manchas, PCR, o SDA. Para la detección por 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%. También se pueden incluir en el kit componentes para métodos 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 con un método de amplificación de ácido nucleico. Los componentes del kit se embalan juntos en un envase común, que típicamente incluye instrucciones para realizar formas de realización específicas seleccionadas de los métodos divulgados en el presente documento.

#### **Ejemplos**

##### Ejemplo 1: Diseño de conjuntos de cebadores de SDA

Una parte del gen vly para GV se ha secuenciado y caracterizado para que sea diana por ensayos de amplificación. Para el fin de este ensayo, se seleccionó una parte del genoma de GV (es decir, el gen vly) que previamente no había sido diana para ensayos de amplificación. Esta subregión del genoma de GV se analizó en bases de datos de GenBank actuales para especificidad de GV. El gen vly para GV se representa mediante SEQ ID NO. 1, 2 y 23-25.

Los cebadores de amplificación se diseñaron para amplificar secuencias diana de GV como se describe en la tabla 1. Las posiciones de las regiones del gen vly de GV con las que hibridan los oligonucleótidos seleccionados (cebadores de amplificación, cebadores de choque, y oligonucleótidos adaptadores) se ilustran en las figuras 1, 3 y 4. Un ejemplo de un conjunto de cebadores y sondas de SDA se describe en la tabla 4 a continuación. Las partes subrayadas de las secuencias del cebador/sonda representan las secuencias de unión a diana. Los sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción (RERS) están en negrita.

**Tabla 4. Oligonucleótidos primarios de ensayos SDA para amplificación y/o detección de GV**

SEQ ID	Descripción	Oligonucleótidos 5' secuencia 3'	Localización ORF (bp)*
SEQ ID NO: 14	Choque izquierdo (anterior)	<u>GTA TAC CCA GGT GCT</u>	343-357
SEQ ID NO: 15	Cebador de amplificación izquierdo (anterior)	ACC GCA TCG AAT GCA TGT <b>CTC GGG</b> AAT <u>ATG CCA AGC CTG A</u>	388-403
SEQ ID NO: 16	Choque derecho (posterior)	<u>GCG CTG AAC AGT TAC</u>	472-486
SEQ ID NO: 17	Cebador de amplificación derecho (posterior)	CGA TTC CGC TCC AGA CTT <b>CTC GGG</b> <u>GCA</u> <u>AAT CAA CGC TCA A</u>	430-445
SEQ ID NO:18	Sonda-vly/gen de GV (detector)	(6FAM) TCC <b>CCG AG</b> (dT-DabcyI) <u>GCA AAC CGC</u> <u>GCT CCA A</u>	409-424

\* No. de acceso EU522486

5

Ejemplo 2: Ensayo de sensibilidad con tres cepas de GV

Se determinó la sensibilidad del ensayo de vly de GV realizando un experimento de límite de detección (LOD). Se ensayó ADN genómico, aislado de tres cepas de GV, y se calculó un LOD para cada cepa. Se corrieron veinticuatro repeticiones para cada nivel de diana y los datos se analizaron usando el calculador de LOD de Becton Dickinson & Co. Los datos muestran que el ensayo es tanto sensible como específico para GV.

10

El ADN para las tres cepas se diluyó en Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 y se hirvió durante cinco minutos y se dejó enfriar durante 10 minutos. El ADN se diluyó a una dilución de trabajo apropiada en el eluato descrito en la tabla 5 a continuación. Los niveles de diana ensayados fueron 100, 50, 20, 5 1 y 0 copias/reacción (c/rxn). Se añadió la muestra (159 µl) a los micropocillos de cebado apropiados.

15

**Tabla 5: Eluato**

Reactivo	Concentración
KOH	75,000 mM
Bicina	125,500 mM
Glicerol	8,550%
DMSO	9,810%
Proclin	0,015%
Tween-20	0,005%

20

Las placas de micropocillos se transfirieron a un bloque de calor de 72°C. Las placas de micropocillos de amplificación correspondientes se colocaron en un bloque de calor a 54°C. Los micropocillos se incubaron después durante 10 minutos. Se transfirieron alícuotas (100 µl) del contenido de los micropocillos de la reacción de cebado al micropocillo de amplificación.

25

Los contenidos de los micropocillos de amplificación se mezclaron 3x50 µl. Los micropocillos de amplificación se sellaron y las placas de micropocillos se transfirieron a un instrumento BD ProbeTec™ ET suministrado por Becton Dickinson & Co. de Franklin Lakes, Nueva Jersey.

30

Las condiciones de reacción finales fueron:

**Tabla 6: Condiciones de reacción de SDA finales**

Reactivo	[Rnx SDA final]
KOH	75,000 mM
Bicina	125,500 mM
Glicerol	8,550%
DMSO	9,810%
Proclin	0,015%
Tween-20	0,005%
KPO4	40,000 mM
Trehalosa	1,853%
BSA	0,1007 µg/µl
DTT	0,360 mM

dATP	0,100 mM
dGTP	0,125 mM
dTTP	0,125 mM
dCsTP	0,125 mM
GV vly LB7	0,050 µM
GV vly LP6	0,100 µM
GV vly RP7	0,500 µM
GV vly RB8	0,050 µM
GV vly DT5	0,200 µM
Bst	25,0 unidades
BsoBI	62,0 unidades
MgOAc	4,943 mM

Los niveles de detección (LOD) calculados para cada cepa en un sistema limpio, no extraído, sin ADN humano ajeno, fueron:

5 **Tabla 7: LOD**

Cepa	LOD (c/rxn)	IC (c/rxn)
<i>G. vaginalis</i> 14018	40	(36, 43)
<i>G. vaginalis</i> 14019	58	(55, 61)
<i>G. vaginalis</i> 49145	19	(18, 21)

Nota: IC es el intervalo de confianza al 95%.

10 La sensibilidad del ensayo de vly de GV se da en la tabla 7. Este ensayo es capaz de detectar las tres cepas de GV ensayadas. Los datos indican que el ensayo SDA descrito en la presente invención puede detectar al menos 58 copias genómicas de *Gardnerella vaginalis* por reacción, en el que el LOD al 95% sería 55 copias genómicas por reacción.

#### 15 Ejemplo 3: Ensayo de reactividad cruzada

Se realizó un cribado de reactividad cruzada. Se extrajeron ácidos nucleicos de treinta y cuatro organismos y se ensayaron en el instrumento Viper XTR. Se obtuvo un resultado negativo para cada uno.

20 Los organismos se cultivaron en cultivo líquido hasta 1 McFarland y se cuantificaron por recuento directo en placa. Se prepararon precipitados celulares centrifugando alícuotas del cultivo líquido para recoger las células. Después de desechar el sobrenadante, los precipitados celulares se almacenaron a -70°C. Para este experimento, los precipitados celulares se resuspendieron en 1 ml de diluyente de muestra. Después de procesar en el instrumento Viper XTR, cada muestra se ensayó a aproximadamente  $2 \times 10^7$  UFC/reacción. Los organismos enumerados en la tabla 9 se ensayaron a esa concentración, con dos excepciones. *T. vaginalis* se cultivó en cultivo líquido, se cuantificó por recuento directo, y se ensayó a  $2 \times 10^5$  células/reacción. *C. trachomatis* se cultivó en células BGMK, se recogió por sonicación y centrifugación diferencial y se cuantificó por inmunocitoquímica. *C. trachomatis* se ensayó a  $5 \times 10^6$  EB/reacción. Se prepararon muestras de control positivo diluyendo ADN genómico de GV a una concentración de 1000 copias/ml para su uso como control positivo. Se usó diluyente de muestra sin añadidos (tabla 8) como control negativo.

30 **Tabla 8: Diluyente de muestra**

Reactivo	Concentración
Bis tris propano	10 mM
KPO <sub>4</sub>	15 mM
Triton X-100	2%
Dodecil sulfato de sodio	1%

35 Las gradillas de muestras se precalentaron a 114°C durante 15 minutos, después se enfriaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las muestras preparadas se transfirieron al instrumento Viper™ XTR de Becton Dickinson & Co. de Franklin Lakes, Nueva Jersey para extracción y análisis. En el sistema Viper XTR, los ácidos nucleicos se extraen de la muestra usando partículas magnéticas. La separación de partículas magnéticas elimina constituyentes no ácido nucleico de la muestra. El ácido nucleico se eluye después de las partículas magnéticas usando la solución descrita en la tabla 5. El eluato se ensayó después usando SDA, con conjuntos de sondas descritos en la tabla 4 anteriormente.

40 El panel de reactividad cruzada incluía los organismos en la tabla 9. Los resultados demuestran que los únicos organismos detectados eran los controles positivos de GV. No se detectó ningún otro organismo, lo que demuestra

que el conjunto de cebadores y sonda de SDA descrito anteriormente en la tabla 4 tiene una reactividad cruzada muy baja con otros organismos.

**Tabla 9: Resultados de la prueba de reactividad cruzada**

Organismo	ID	Resultado de la prueba <sup>1</sup>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ATCC 19001	Negativo
<i>Alcaligenes faecalis</i>	ATCC 8750	Negativo
<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC 15700	Negativo
<i>Bifidobacterium dentium</i>	ATCC 27534	Negativo
<i>Chlamydia trachomatis</i> (H)	ATCC VR-879	Negativo
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV2)	ATCC VR-902B	Negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124	Negativo
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 36556	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Negativo
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434	Negativo
<i>Escherichia coli</i> (cepa K1)	ATCC 700973	Negativo
<i>Gamella haemolysans</i>	ATCC 10379	Negativo
<i>Haemophilus ducreyi</i>	ATCC 33940	Negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 33533	Negativo
<i>Kingella kingae</i>	ATCC 23330	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	Negativo
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	Negativo
<i>Lactobacillus iners</i>	ATCC 55195	Negativo
<i>Lactobacillus jensenii</i>	ANR 3670	Negativo
<i>Mobiluncus mulieris</i>	ATCC 35239	Negativo
<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17967	Negativo
<i>Mycoplasma genitalium</i>	ATCC 33530	Negativo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 19424	Negativo
<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13077	Negativo
<i>Peptostreptococcus productus</i>	ATCC 27340	Negativo
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	E155	Negativo
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 12386	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6303	Negativo
<i>Trichomonas vaginalis</i>	ATCC 30001	Negativo

<sup>1</sup> Según el algoritmo GNE

Muestras control	Resultado de la prueba
Control positivo de ADNg de <i>G. vaginalis</i>	Positivo
Control positivo de ADNg de <i>G. vaginalis</i>	Positivo
Control positivo de ADNg de <i>G. vaginalis</i>	Positivo
Control positivo de ADNg de <i>G. vaginalis</i>	Positivo
Control negativo (sin molde)	Negativo
Control negativo (sin molde)	Negativo
Control negativo (sin molde)	Negativo
Control negativo (sin molde)	Negativo

#### Ejemplo 4: Prueba de reactividad cruzada adicional contra seis especies de *Candida*

En un marco clínico, es importante para el médico ser capaz de diferenciar entre vaginosis bacteriana y candidiasis vaginal. Para demostrar la utilidad del ensayo SDA de GV para hacer esto, el ensayo se evaluó con ADN genómico de seis especies medicamente relevantes de *Candida*. El ensayo SDA de GV no dio reactividad cruzada con ninguna de las especies de *Candida* ensayadas. Específicamente, se ensayó ADN genómico de seis especies de *Candida* en el ensayo vly de GV descrito en el ejemplo 1 anteriormente. Se corrieron seis replicados para cada diana.

Las especies de organismos usadas se enumeran en la tabla 10 a continuación:

Tabla 10: Especies de organismos

Organismo	ID
ADN genómico (ADNg) de GV	ATCC 49145
<i>C. albicans</i>	ATCC 11006
<i>C. kefyr</i>	ATCC 66028
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019

El ADN se diluyó en Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 y se hirvió durante cinco minutos. La solución se dejó enfriar durante diez minutos. El ADN se diluyó después usando el eluato descrito en la tabla 5. Se añadió la muestra (159 µl) a los micropocillos de cebado apropiados. Las placas de micropocillos se transfirieron a un bloque de calor de 72°C. Las placas de micropocillos de amplificación correspondientes se colocaron en un bloque de calor a 54°C. Los micropocillos se incubaron después durante 10 minutos. Se transfirieron alícuotas (100 µl) del contenido de los micropocillos de la reacción de cebado al micropocillo de amplificación. Los micropocillos de amplificación se sellaron y las placas de micropocillos se transfirieron a un instrumento BD ProbeTec ET suministrado por Becton Dickinson & Co. de Franklin Lakes, Nueva Jersey.

#### Referencias citadas y equivalentes

Se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin separarse del su ámbito, como será aparente para los expertos en la materia. Las formas de realización específicas descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo solo, y la invención se debe limitar solo por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

#### Lista de secuencias

<110> Becton Dickinson

<120> Ensayo de Gardnerella vaginalis

<130> Becton 467

<140> a asignar

<141> a asignar

<150> US 61/408840

<151> 01-11-2010

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1551

<212> ADN

<213> Gardnerella vaginalis

<220>

<221> fuente

<222> (1)..(1551)

<223> cepa 14018 del gen vly de GV

<300>

<308> No. de acceso a GenBank de NCBI EU522486

<309> 19-05-2008

<313> (1)..(1551)

<400> 1



# ES 2 659 543 T3

```

atgaagagta caaagttcta ccgtaatgca gcaatgttgc tcctcgcggg cgcaactatt      60
gttcacaat gcttagcagc accagcaatg gccgctcctt ccgctaagga ttctgaacca      120
gctacatctt gcgcagctaa gaaagactcg ttgaataatt atttgtggga tttgcaatac      180
gataaaacaa acattctcgc ccgtcatggc gaaaccattg agaacaaatt ctccagcgac      240
agcttcaaca agaacggtga attcgttggt gttgagcatt agaagaagaa catcaccaat      300
acaacttcaa atttgtcggg tacttccgcc aacgatgac gccgtataccc aggtgctctt      360
ttcgtgctg ataagaattt gatggacaat atgccaaaggc tgatttctgc aaaccgcgct      420
ccaataacgt tgagcgttga tttgccggga ttccacggcg gcgaaagtgc tgtaactggt      480
cagcgcccaa ccaagagctc tgtaacttcc gcagtgaacg gcttagtttc taagtggaat      540
gcacaatatg gagcaagtca tcatgttgca gctcgcatgc agtacgattc tgcaagcgca      600
caaagcatga accagctcaa ggctaagttt ggtgctgatt ttgccaagat tgggtgttccg      660
ctgaagattg atttcgatgc agtacacaag ggtgagaagc agactcaaat tgtgaacttc      720
aagcaaaactt actacaccgt aagcgttgat gcaccagata gccacgcaga tttctttgct      780
ccttgcaacta cgccagacag cttgaagaac cgtggcggtg acaacaagcg cccaccagtt      840
tacgtgtcaa acgtagctta tggtcgctca atgtacgtaa agttcgatac caccagcaag      900
agcactgatt tccaggctgc ggtagaagca gcaattaagg gcgtagaaat caagccaaac      960
accgaattcc atcgattct ccagaatact tctgttactg cagtgattct tgggtggcagc     1020
gctaattggtg cagctaaagt tattacaggc aatatcgata cgcttaaggc tttgattcag     1080
gaagggtgcaa atttgagcac ctctagccca gcggttccaa ttgcatacac caattccttc     1140
gtcaaggata acgaagtagc aactttgcaa tccaacagcg attatattga aacgaagggt     1200
tcttcttctc gcaatggcta cttgactttg gaccaccgtg gagcttatgt agctcgctac     1260
tacatctact gggatgagta cggcaccgaa attgacggca ctccctacgt gcgttctcgc     1320
gcttggggaag gcaatggtaa gtatcgtaac gtcacttca acaccactat tcagttcaaa     1380
ggaaatgtac gcaatctacg aatcaagttg gttgaaaaga ctgggttggg ttgggaacca     1440
tggcgcacag tatatgaccg ttctgatttg ccactagttc gtcagcgtac tattagcaac     1500
tggggcacaa ccttggtggc tcgcgttgct gaaactgtaa agaacgactg a              1551

```

5 <210> 2  
 <211> 1554  
 <212> ADN  
 <213> Gardnerella vaginalis

10 <220>  
 <221> fuente  
 <222> (1)..(1554)  
 <223> clon T10

15 <300>  
 <308> No. de acceso a GenBank de NCBI EU697811  
 <309> 11-05-2010

# ES 2 659 543 T3

<313> (1)..(1554)

<400> 2

catatgaata acacaaagtt ctaccgtaat gcagcaatgt tgctcctcgc gggcgcaact	60
attattccac aatgcttagc agcaccagca atggccgctc ctgcagctaa ggattctgag	120
ccaaccgcat ctgcgcgagc caagaaggac tcgttgaata attatttggtg ggatttgcaa	180
tacgataaaa caaacattct cgcccgtcat ggcgaaacca ttgacaacaa attctctagc	240
gatagcttca acaagggcga tgaattcggt gttgttgagc atcagaagaa gaacatcaca	300
aatacaactt caaacttgtc ggttacttcc gccaacgatg atcgcgata cccaggtgct	360
cttttcgcgc ctgaccagaa tttgatggac aatatgccaa gcctgatttc cgcaaaccgc	420
gctccaatca cgttgagcgt tgatttgcca ggcttccacg gggcgaaag tgctgtaact	480
gttcagcgcc caaccaagag ctctgtaact tccgcagtga acggcttagt ttccaagtgg	540
aatgcacagt acgctgcaag ccatcatggt gcagctcgca tgcagtacga ttctgcaagc	600
gcacaaagca tgaaccagct caaggcaaag tttggtgctg atttcgccaa gattggcggt	660
ccgctgaaga ttgatttcca cgctgtgcac aagggcgaaa agcagactca aattgtgaac	720
ttcaagcaga cctactacac cgtaagtgtt gatgctccag atagcccagc tgacttcttc	780
gcaccatgca ctacgccaga aagcttgaag agccgcggag tagacagcaa gcgtccgcca	840
gtatatgtgt ccaacgtagc ttacggccgt tcaatgtacg taaagttcga caccgcgagc	900
aagagcaccg atttccaggc tgctgttgaa gctgcaatca aggggtgttg aatcaagcca	960
aataccgagt tccaccgcat tttgcagaac acttctgtaa ctgctgtaat tctcgggcgc	1020
agcgcagacg gtgcagccaa ggattattacc ggcaacgtcg acacgttgaa ggctttgatt	1080
caagaaggcg caaatttgag cacctccagc ccagcagttc cagttgctta caccacttcc	1140
ttcgccaagg ataacgaagt agcaactttg caaaccaata gcgattacgt tgaaaccaag	1200
gtttcttctt accgcgacgg ctacttgact ttggatcacc gtggagctta cgtagctcgc	1260
tactacatct actgggatga gtacggcacc gaaattgacg gcaactcctta cgtgcgttct	1320
cgcgcttggg aaggcaatgg caagtatcgt acagctcact tcaacaccac tattcagttc	1380
aaaggaaatg tacacaatct acgaaccaag ctgggtgaaa agactggctt agtttgggaa	1440
ccatggcgta cagtatatga ccgttccgat ttgccactgg ttcgccagcg cacaatcaag	1500
aactggggca caaccttggt gccacgcggt gctgaaactg taaagaacga ctaa	1554

5

<210> 3

<211> 16

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

15 <400> 3

aatatgccaa gcctga

16

5	<p>&lt;210&gt; 4          &lt;211&gt; 16          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
10	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cebador sintético</p> <p>&lt;400&gt; 4          gcaaatcaac gctcaa</p>	16
15	<p>&lt;210&gt; 5          &lt;211&gt; 16          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
20	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Sonda sintética</p> <p>&lt;400&gt; 5          gcaaaccgcg ctccaa</p>	16
25	<p>&lt;210&gt; 6          &lt;211&gt; 15          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
30	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cebador sintético</p> <p>&lt;400&gt; 6          gtatacccag gtgct</p>	15
35	<p>&lt;210&gt; 7          &lt;211&gt; 15          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
40	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cebador sintético</p> <p>&lt;400&gt; 7          gcgctgaaca gttac</p>	15
45	<p>&lt;210&gt; 8          &lt;211&gt; 18          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
50	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cebador sintético</p> <p>&lt;400&gt; 8          ggcggcgaaa gtgctgta</p>	18
55	<p>&lt;210&gt; 9          &lt;211&gt; 19          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
60	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	

	<400> 9 agccgttcac tgcggaagt	19
5	<210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sonda sintética	
	<400> 10 ttcagcgcgcc aaccaagagc tctgt	25
15	<210> 11 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 11 gcccaacgatg atcgcgtat	19
25	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador sintético	
35	<400> 12 caggcttggc atattgtcca t	21
40	<210> 13 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sonda sintética	
	<400> 13 cccaggtgct cttttcgetg ctga	24
50	<210> 14 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 14 gtatacccag gtgct	15
60	<210> 15 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

# ES 2 659 543 T3

	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 15		
5	accgcatcga atgcatgtct cgggaatatg ccaagcctga		40
	<210> 16		
	<211> 15		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sintético		
15	<400> 16		
	gcgctgaaca gttac		15
	<210> 17		
	<211> 40		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sintético		
25	<400> 17		
	cgatcccgct ccagacttct cggggcaaatt caacgctcaa		40
	<210> 18		
30	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Sonda sintética		
	<400> 18		
	tccccgagtg caaacgcgcg tccaa		25
40	<210> 19		
	<211> 144		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Muestra de control de amplificación interno		
	<400> 19		
	gtatacccag gtgctctttt ccgtgctgat aagaatttga tggacaatat gccaaagcctg		60
	atctctgcag tccgccacta tctaacgttg agcgttgatt tgccgggatt ccacggcggc		120
	gaaagtgctg taactgttca gcgc		144
50	<210> 20		
	<211> 196		
	<212> ADN		
	<213> Gardnerella vaginalis		
55	<400> 20		

# ES 2 659 543 T3

	gccaacgatg atcgcgataa cccaggtgct cttttccgtg ctgataagaa tttgatggac	60
	aatatgccaa gcctgatttc tgcaaaccgc gctccaataa cgttgagcgt tgatttgccg	120
	ggattccacg gcggcgaaaag tgctgtaact gttcagcgcc caaccaagag ctctgtaact	180
	tccgcagtga acggct	196
5	<210> 21 <211> 196 <212> ADN <213> Gardnerella vaginalis	
	<400> 21 gccaacgatg atcgcgataa cccaggtgct cttttccgct ctgaccagaa tttgatggac	60
	aatatgccaa gcctgatttc cgcaaaccgc gctccaatca cgttgagcgt tgatttgcca	120
	gcattccacg gcggcgaaaag tgctgtaact gttcagcgcc caaccaagag ctctgtaact	180
	tccgcagtga acggct	196
10	<210> 22 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sonda sintética	
20	<400> 22 tccccgagtg cagtccgcca ctatc	25
25	<210> 23 <211> 1551 <212> ADN <213> Gardnerella vaginalis	
30	<220> <221> fuente <222> (1)..(1551) <223> cepa 14019 del gen vly de GV	
35	<300> <308> No. de acceso a GenBank de NCBI EU522487 <309> 19-05-2008 <313> (1)..(1551)  <400> 23	

# ES 2 659 543 T3

```

atgaagagta caaagttcta ccgtaatgca gcaatgttgc tctcgcggg cgcaactatt      60
gttcacacaat gcttagcagc accagcaatg gccgctcctt ccgctaagga ttctgaacca      120
gtacatcttt gcgcagctaa gaaagactcg ttgaataatt atttgtggga tttgcaatac      180
gataaaacaa acattctcgc ccgtcatggc gaaaccattg agaacaaatt ctccagcgac      240
agcttcaaca agaacggtga attcgttggt gttgagcatc agaagaagaa catcaccaat      300
acaacttcaa atttgtcggg tacttccgcc aacgatgatc gcgtataccc aggtgctctt      360
ttccgtgctg ataagaatth gatggacaat atgccaagcc tgattttctgc aaaccgcgct      420
ccaataacgt tgagcgttga tttgccggga ttccacggcg gcgaaagtgc tgtaactggt      480
cagcgcccaa ccaagagctc tgtaacttcc gcagtgaacg gcttagtttc taagtggaat      540
gcacaatatg gagcaagtca tcatgttgca gctcgcatgc agtacgattc tgcaagcgca      600
caaagcatga accagctcaa ggctaagttt ggtgctgatt ttgccaagat tgggtgtccg      660
ctgaagattg atttcgatgc agtacacaag ggtgagaagc agactcaaat tgtgaacttc      720
aagcaaactt actacaccgt aagcgttgat gcaccagata gccacagaga tttctttgct      780
ccttgcaacta cgccagacag cttgaagaac cgtggcggtt acaacaagcg cccaccagtt      840
tacgtgtcaa acgtagctta tggtcgctca atgtacgtaa agttcgatac caccagcaag      900
agcaactgatt tccaggetgc ggtagaagca gcaattaagg gcgtagaaat caagccaaac      960
accgaattcc atcgcatctt ccagaatact tctgttactg cagtgattct tgggtggcagc     1020
gctaattggtg cagctaaagt tattacaggc aatatcgata cgcttaaggc tttgattcag     1080
gaagggtgcaa atttgagcac ctctagccca gcggttccaa ttgcatacac cacttccttc     1140
gtcaaggata acgaagtagc aactttgcaa tccaacagcg attatatattga aacgaaggtt     1200
tcttcttctc gcaatggcta cttgactttg gaccaccgtg gagcttatgt agctcgctac     1260
tacatctact gggatgagta cggcacccga attgacggca ctctttacgt gcgttctcgc     1320
gcttggggaag gcaatggtaa gtatcgtaca gctcacttca acaccactat tcagttcaaaa     1380
ggaaatgtac gcaatctacg aatcaagttg gttgaaaaga ctgggtttggt ttgggaacca     1440
tggcgcacag tatatgaccg ttctgatttg ccactagttc gtcagcgtac tattagcaac     1500
tggggcacaa ccttgtggcc tcgcgttgct gaaactgtaa agaacgactg a                1551

```

<210> 24

5 <211> 1551

<212> ADN

<213> Gardnerella vaginalis

<220>

10 <221> fuente

<222> (1)..(1551)

<223> cepa 49145 del gen vly de GV

<300>

15 <308> No. de acceso a GenBank de NCBI EU522488

# ES 2 659 543 T3

<309> 19-05-2008

<313> (1)..(1551)

<400> 24

atgaagagta	caaagttcta	cogtaatgca	gcaatgttgc	tcctcgcggg	cgcaactatt	60
gttccacaat	gcttagcagc	accagcaatg	gccgctcett	cogctaagga	ttctgaacca	120
gctacatctt	gcgcagctaa	gaaagactcg	ttgaataatt	atctgtggga	tttgcaatac	180
gataaaacaa	acattctcgc	ccgtcatggc	gaaaccattg	agaacaaatt	ctccagcgac	240
agcttcaaca	agaacggtga	attcggttgt	gttgagcatc	agaagaagaa	catcaccaat	300
acaacttcaa	atctgtcggt	tacttccgcc	aacgatgatc	gcgtataccc	aggtgctctt	360
ttccgtgctg	ataagaatct	gatggacaat	atgccaagcc	tgatttctgc	aaaccgcgct	420
ccaataacgt	tgagcgttga	tttgccggga	ttccacggcg	gcgaaagtgc	tgtaactggt	480
cagcgcccaa	ccaagagctc	tgtaacttcc	gcagtgaacg	gcttagtttc	taagtggaat	540
gcacaatatg	gagcaagtca	tcatgttgca	gctcgcatgc	agtacgattc	tgcaagcgca	600
caaagcatga	accagctcaa	ggctaagttt	ggtgctgatt	ttgccaagat	tggtgttccg	660
ctgaagattg	atctcgatgc	agtacacaag	ggtgagaagc	agactcaaat	tgtgaacttc	720
aagcaaactt	actacaccgt	aagcgttgat	gcaccagata	gccacgcaga	tttctttgct	780
ccttgactca	cgccagacag	cttgaagaac	cgtggcggtt	acaacaagcg	cccaccagtt	840
tacgtgtcaa	acgtagctta	tggtcgctca	atgtacgtaa	agttcgatac	caccagcaag	900
agcactgatt	tccaggctgc	agtagaagca	gcaattaagg	gcgtagaaat	caagccaaac	960
accgaattcc	atcgattctt	ccaaaatact	tctgttactg	cagtgattct	tggtggcagc	1020
gctaattggt	cagctaaagt	tattacaggc	aacatcgata	cgttgaaggc	tttgattcag	1080
gaaggtgcaa	atctgagcac	ctctagccca	gcagttccaa	ttgcatacac	cacttctctc	1140
gtcaaggata	acgaagtagc	aactttgcaa	tccaacagcg	attatattga	aacgaagggt	1200
tcctcttacc	gcaatggcta	cttgactttg	gaccaccgtg	gagcttacgt	agctcgctac	1260
tacatctact	gggatgagta	cggcaccgaa	attgacggca	ctccttacgt	gcgttctcgc	1320
gcttggggaag	gcaatggtaa	gtatcgtaac	gctcacttca	ataccactat	tcagttcaaaa	1380
ggaaatgtac	gcaatctacg	aatcaagttg	gttgaaaaga	ctggtttagt	ttgggaacca	1440
tggcgcacag	tatatgaccg	ttctgatttg	ccactagttc	atcagcgtac	tattagcaac	1500
tggggcacaa	ccttgtggcc	tcgcgttget	gaaactgtaa	agaacgactg	a	1551

<210> 25

<211> 1554

<212> ADN

<213> Gardnerella vaginalis

<220>

<221> fuente



# ES 2 659 543 T3

<222> (1)..(1554)  
<223> clon T11

<300>

5 <308> No. de acceso a GenBank de NCBI EU697812

<309> 11-05-2010

<313> (1)..(1554)

<400> 25

	catatgaata acacaaagtt ctaccgtaat gcagcaatgt tgctcctcgc gggcgcaact	60
	attattccac aatgcttagc agcaccagca atggcgcgtc ctgcagctaa ggattctgag	120
	ccaaccgcat cttgcgcagc caagaaggac tcgttgaata attatttgtg ggatttgcaa	180
	tacgataaaa caaacattct cgcccgatcat ggcgaaacca ttgacaacaa attctctagc	240
	gatagcttca acaagggcga tgaattcggt gttgttgagc atcagaagaa gaacatcaca	300
	aatacaactt caaacttgct ggttacttcc gccaacgatg atcgcgataa cccaggtgct	360
	cttttcgcgc ctgaccagaa tttgatggac aatatgccaa gcctgatttc cgcaaaccgc	420
	gctccaatca cgttgagcgt tgatttgcca ggcttccacg gcggcgaaag tgetgtaact	480
	gttcagcgcc caaccaagag ctctgtaact tccgcagtga acggcttagt ttccaagtgg	540
	aatgcacagt acgctgcaag ccacatggtt gcagctcgca tgcagtacga ttctgcaagc	600
	gcacaaagca tgagccagct caaggcaaag tttggtgctg atttcgcaa gattggcggt	660
	ccgctgaaga ttgatttcga cgtgtgcac aaggcgaaa agcagactca aattgtgaac	720
10	ttcaagcaga cctactacac cgtaagtgtt gatgctccag atagcccagc tgacttcttc	780
	gcaccatgca ctacgcaga aagcttgaag agccgcggag tagacagcaa gcgtccgcca	840
	gtatatgtgt ccaacgtagc ttacggccgt tcaatgtacg taaagttcga caccgcagc	900
	aagagcaccg atttccaggc tgctgttgaa gctgcaatca aggtgttgga aatcaagcca	960
	aataccgagt tccaccgcat tttgcagaac acttctgtaa ctgctgtaat tctcggcggc	1020
	agcgcaaacg gtgcagccaa ggattattacc ggcaacgtcg acacgttgaa ggctttgatt	1080
	caagaaggcg caaatttgag caccctccagc ccagcagttc caattgctta caccacttcc	1140
	ttcgtcaagg ataacgaagt agcaactttg caaaccaata gcgattacgt tgagaccaag	1200
	gtttcttctt accgcgacgg ctacttgact ttggatcacc gtggagctta cgtagctcgc	1260
	tactacatct actgggatga gtacggcacc gaaattgacg gcaactctta cgtgcgttct	1320
	cgcgcttggg aaggcaatgg caagtatcgt acagctcact tcaacaccac tattcagttc	1380
	aaaggaaatg tacacaatct acgaatcaag ctggttgaaa agactggctt agtttgggaa	1440
	ccatggcgta cagtatatga ccgttccgat ttgccactgg ttcgccagcg cacaatcaag	1500
	aactggggca caaccttggt gccacgcgtt gctgaaactg taaagaacga ctaa	1554

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una secuencia diana de *Gardnerella vaginalis* si está presente en una muestra que comprende:
  - (a) proporcionar al menos un cebador oligonucleotídico que hibridará con al menos alguna parte de una región diana del gen vly de GV seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 20 y SEQ ID NO. 21;
  - (b) combinar el al menos un cebador oligonucleotídico con una muestra biológica;
  - (c) someter la muestra a condiciones que produzcan la amplificación de una parte de la secuencia diana, si está presente, en la muestra;
  - y
  - (d) determinar la presencia o ausencia de la secuencia diana amplificada.
2. El método de la reivindicación 1 en donde el al menos un cebador oligonucleotídico tiene una secuencia de unión a diana que se selecciona de una de SEQ ID NO. 3-13, complementos de SEQ ID NO. 3-13 y secuencias que comparten al menos el 70%, o al menos el 80% o al menos el 90% de similitud de secuencia con SEQ ID NO. 3-13 y complementos de las mismas.
3. El método de la reivindicación 1 en donde el al menos un cebador oligonucleotídico es un conjunto de cebadores oligonucleotídicos en donde:
  - (a) el primer cebador de amplificación tiene una secuencia de unión a diana que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 3, 6, 8 u 11; y
  - (b) el segundo cebador de amplificación tiene una secuencia de unión a diana que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 4, 7, 9 o 12.
4. El método de la reivindicación 1 en donde dicha amplificación se logra por una reacción de amplificación que se selecciona del grupo que consiste en una reacción de amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
5. El método de la reivindicación 1 en donde dicha amplificación se logra por una reacción de amplificación o detección que se selecciona del grupo que consiste en detección directa, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación in situ, amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia autosostenida (SSR), amplificación por círculo rodante o amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA).
6. El método de la reivindicación 1 en donde el cebador de amplificación comprende además una horquilla, cuarteto G, sitio de restricción o una secuencia que hibrida con una sonda indicadora.
7. El método de la reivindicación 6 en donde la sonda indicadora contiene además un marcador detectable.
8. El método de la reivindicación 7 en donde el marcador es un marcador fluorescente.
9. El método de la reivindicación 1 en donde el cebador de amplificación comprende además un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción o un promotor de ARN polimerasa.
10. El método de la reivindicación 1 que comprende además amplificar un control de amplificación interno (IAC).
11. Un método para detectar una secuencia diana de *Gardnerella vaginalis* (GV) que comprende:
  - (a) proporcionar una muestra biológica;
  - (b) combinar uno o más cebadores de amplificación para una región diana del gen vly de GV, en donde la región diana del gen vly de GV tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 21 y SEQ ID NO. 20 con la muestra biológica;
  - (c) someter la muestra biológica combinada con el uno o más cebadores de amplificación a condiciones que producen que el uno o más cebadores de amplificación hibriden con la región diana del gen vly de GV; y
  - (d) determinar la presencia o ausencia del cebador de amplificación hibridado en la muestra biológica.
12. El método de la reivindicación 11 en donde el uno o más cebadores de amplificación tienen una secuencia de unión a diana de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 13 y complementos de las mismas, y secuencias que comparten al menos el 70%, o al menos el 80% o al menos el 90% de similitud de secuencia con SEQ ID NO. 3 a 13 y complementos de las mismas.
13. El método de la reivindicación 11 en donde al menos un cebador de amplificación es una sonda indicadora que comprende además un marcador detectable.

14. El método de la reivindicación 13 en donde dicho marcador detectable es TAMRA, 6ROX o 6FAM.
15. Un kit para una reacción de amplificación o detección para *Gardnerella vaginalis* que comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de unión a diana en donde la secuencia de unión a diana se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 13 o complementos de las mismas.

5

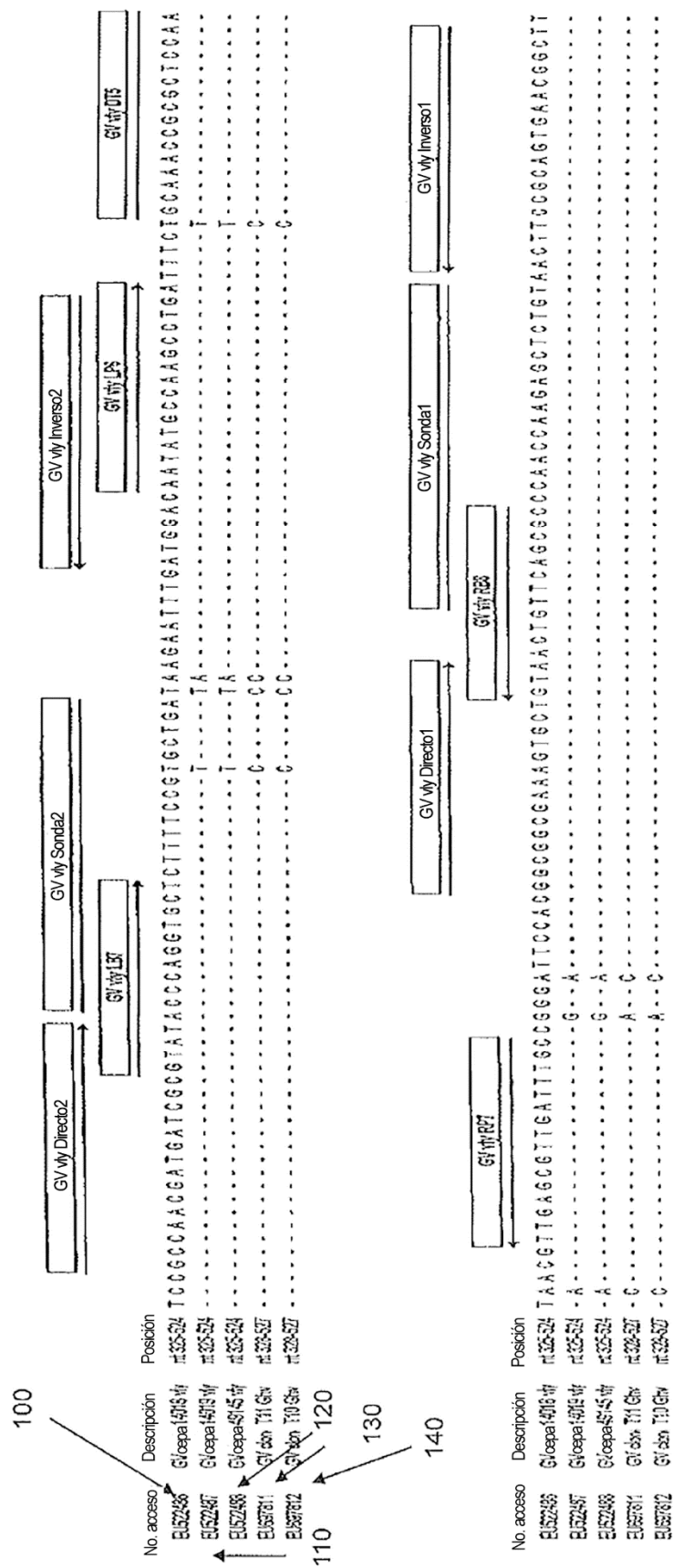


FIG. 1

Posiciones de las regiones de hibridación de oligonucleótidos que forman los ensayos de PCR de GV

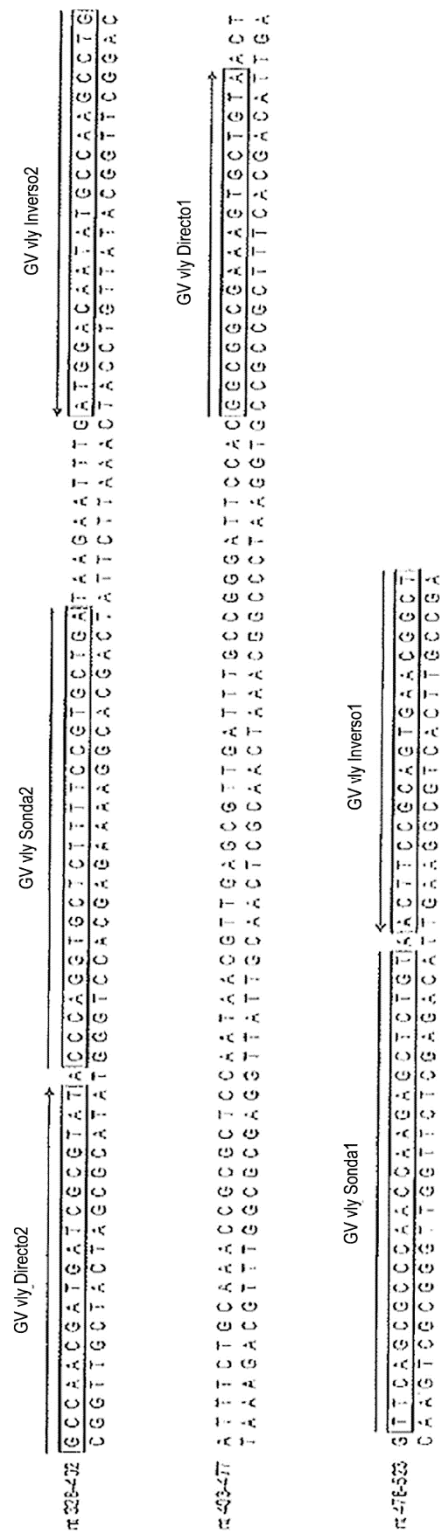


FIG. 2

Posiciones de las regiones de hibridación de oligonucleótidos que forman los ensayos de SDA de GV

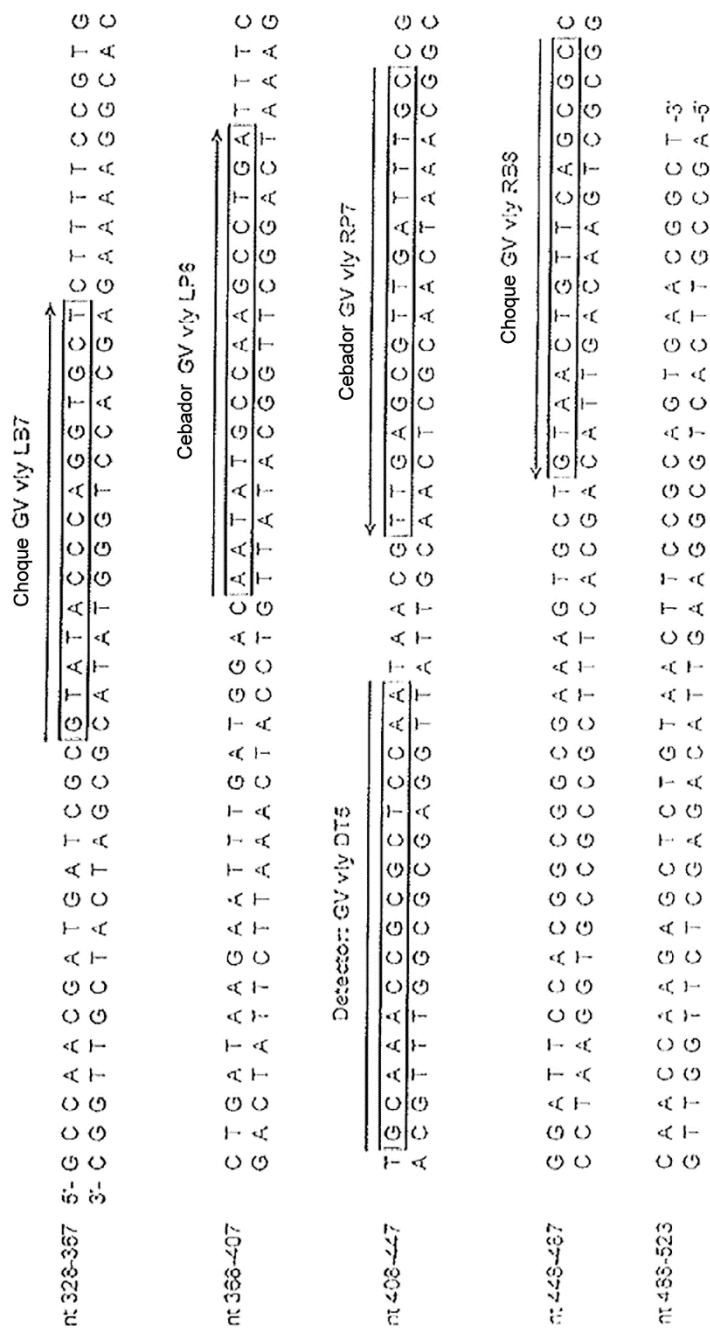


FIG. 3

# Posiciones de las regiones de hibridación de oligonucleótidos para IAC de GV

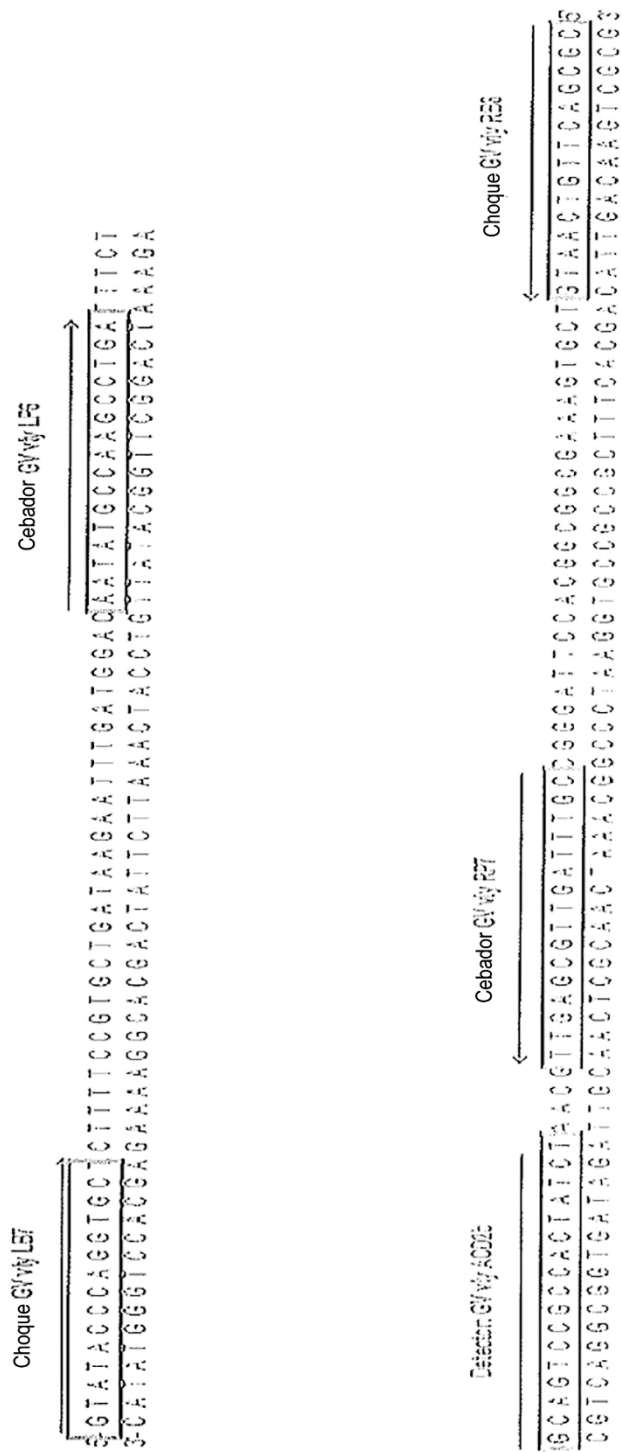


FIG. 4