

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 745**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/US2014/021949**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14150037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14713718 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2971083**

54 Título: **Detección de Neisseria gonorrhoeae**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361798757 P

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

08.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**THORNTON, KEITH, EDWARD;
MADEPOGU, PAUL y
KOFFENBERGER, DANIELLE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 671 745 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

Detección de *Neisseria gonorrhoeae*

5 **Antecedentes****Campo**

10 La presente divulgación se refiere a métodos, composiciones, cebadores, y sondas para la detección de *Neisseria gonorrhoeae*. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a la detección de *N. gonorrhoeae* mediante métodos de ensayo basados en ácido nucleico que utilizan cebadores y/o sondas que se unen a la región del gen *opcA* de proteínas externas principales de *N. gonorrhoeae*. Por ejemplo, estos cebadores y sondas se pueden utilizar para amplificar los ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* en muestras biológicas para determinar la presencia de *N. gonorrhoeae* o para determinar la presencia de ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae*.

15

Descripción de la técnica relacionada

20 La *Neisseria gonorrhoeae* es una especie de bacteria diplocócica Gram-negativa, no móvil que no forma esporas, responsable de la gonorrea, una infección bacteriana del tracto genital inferior que se transmite principalmente por contacto sexual. Los síntomas de la infección con *N. gonorrhoeae* es diferente dependiendo del sitio de la infección, y a menudo, las infecciones son asintomáticas. La infección gonorreica puede producir conjuntivitis, faringitis, proctitis o uretritis, prostatitis y orquitis. La infección ascendente en mujeres también puede dar lugar al desarrollo de enfermedad inflamatoria pélvica aguda, una de las causas que dan lugar a infertilidad femenina. La infección gonorreica puede pasar de una madre infectada a su bebé durante el suministro vaginal y puede dar lugar a conjuntivitis gonocócica en los ojos del recién nacido.

25

30 La *N. gonorrhoeae* está estrechamente relacionada con la *N. meningitidis* (meningococos) que es el agente causal de un tipo de meningitis bacteriana, y ligeramente menos relacionada con *N. lactamica*, un patógeno humano ocasional. Tanto la *N. gonorrhoeae* como la *N. meningitidis* solamente infectan seres humanos. Hay distintas especies adicionales de *Neisseria* que se pueden considerar como flora normal en seres humanos incluyendo *N. cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. mucosa*, *N. sicca*, y *N. subflava*.

35

40 Se habían desarrollado varios ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) para la evaluación clínica de infecciones por *N. gonorrhoeae*, que incluyen el ensayo Amplicón® CT/NG que se dirige al gen de la citosina ADN metiltransferasa (Roche Diagnostic Corporation, Basel, Suiza); Ensayo de Amplificación ProbeTec® Qx que se dirige a multi-copias de genes de pilina (Becton, Dickinson y Company, Franklin Lakes, New Jersey); el ensayo LCx® que se dirige a los genes de opacidad (*opa*) (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois); y la versión Combo 2 de GenProbe APTIMA™ de direccionamiento de TMA al gen de ARN ribosómica 16S (Gen-Probe, Incorporated, San Diego, California). Los NAAT tienen la ventaja de detectar la *N. gonorrhoeae* sin un examen pélvico ni un espécimen por hisopo intrauretral (masculino) (por ejemplo, mediante análisis urinario). Sin embargo, los cebadores empleados por ciertos NAAT para *N. gonorrhoeae* pueden reaccionar de manera cruzada con especies gonocócicas de *Neisseria*. Por lo tanto, exista la necesidad de un ensayo que puede detectar *N. gonorrhoeae* con alta sensibilidad y reducción de resultados falsos positivos debido a la reactividad cruzada con otras especies bacterianas, tales como especies de *Neisseria*.

45

Sumario

50 Un aspecto de la presente divulgación se refiere a sondas y cebadores capaces de hibridarse al gen de proteínas externas principales (*opcA*). La presente invención proporciona una sonda o cebador oligonucleotídicos de hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud que sean capaces de hibridarse al gen de proteínas externas principales (*opcA*) de *Neisseria gonorrhoeae*, donde la sonda o cebador comprenden una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6, o una secuencia que presenta al menos aproximadamente un 85 % de identidad con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6.

55

60 En algunas realizaciones, la sonda o cebador consisten en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6, o una secuencia que presente al menos aproximadamente un 85 % de identidad respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6. En algunas realizaciones, la sonda o cebador consisten en una secuencia que presenta al menos aproximadamente un 95 % de identidad respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6. En algunas realizaciones, la sonda o cebador consisten en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6.

65

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con métodos para la detección de la presencia de la secuencia de *opcA* de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra biológica. La presente invención por lo tanto proporciona un método para determinar la presencia de una secuencia genética de las proteínas externas principales (*opcA*) de

Neisseria gonorrhoeae en una muestra biológica, donde el método comprende: poner en contacto la muestra biológica con al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen de proteínas externas principales (*opcA*) de *Neisseria gonorrhoeae*, donde cada cebador del al menos un par de cebadores comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5 o la secuencia que presenta al menos aproximadamente un 85 % de identidad con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5, y donde el al menos un par de cebadores se configura para generar un amplicón de una secuencia *opcA* en condiciones de amplificación de ácidos nucleicos convencionales; generar un amplicón de la secuencia *opcA* a partir de la muestra biológica, si la muestra comprende *Neisseria gonorrhoeae*; y determinar la presencia o cantidad de uno o más productos amplificados como indicador de la presencia de la secuencia *opcA* en la muestra biológica.

En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra clínica. En algunas realizaciones, la muestra biológica se recoge de la uretra, pene, ano, garganta, cuello uterino, o vagina. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra vaginal.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se pone en contacto con un par de cebadores. En algunas realizaciones, el par de cebadores es: a) SEQ ID NO: 1 y 2; o b) SEQ ID NO: 4 y 5.

En algunas realizaciones, la amplificación se lleva a cabo utilizando un método seleccionado de entre el grupo que consiste en una reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por replicasa, Inmuno-amplificación, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación en círculo rodante, y amplificación mediada por transcripción (TMA).

En algunas realizaciones, la PCR se selecciona de entre el grupo que consiste en PCR en tiempo real, PCR de punto final, Alu-PCR, PCR asimétrica, PCR de colonias, DD-PCR, PCR de inicio caliente, PCR *in situ*, PCR inversa, PCR larga, PCR múltiplex, PCR anidada, PCR-ELISA, PCR-RFLP, PCR de polimorfismo de conformación de cadenas sencillas (PCR-SSCP), PCR cuantitativa competitiva (QC-PCR), PCR de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE-PCR), PCR de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR), PCR palindrómica repetitiva extragenómica (Rep-PCR), PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR), TAIL-PCR, PCR de rampa decreciente y PCR de Vektorette. En algunas realizaciones, la PCR es una PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR).

En algunas realizaciones, cada cebador comprende una secuencia de nucleótidos externa que permite la modificación posterior a la amplificación de los productos de amplificación sin un efecto significativo sobre la propia amplificación.

En algunas realizaciones, cada cebador del primer par está flanqueado por secuencias complementarias que comprende un fluoróforo en el extremo 5', y un interruptor de fluorescencia en el extremo 3'.

Otro aspecto más de la presente divulgación se relaciona con las composiciones para la detección de las secuencias de *Neisseria gonorrhoeae*. La presente invención proporciona por lo tanto una composición para la detección de *Neisseria gonorrhoeae*, donde la composición comprende: un primer y segundo cebadores de amplificación que se hibridan específicamente con la secuencia del gen de proteínas externas principales (*opcA*) de *Neisseria gonorrhoeae* o la complementaria de la misma, donde el primer y segundo cebadores de amplificación comprenden una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad con las SEQ ID NO: 1, 2, 4 o 5 y tienen aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, y donde el *opcA* tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, la composición comprende adicionalmente una sonda, donde la sonda se hibrida específicamente a un amplicón de *opcA*.

En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o 6, o la secuencia que presenta al menos aproximadamente un 85 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 3 o 6. En algunas realizaciones, la sonda tiene una secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, la sonda comprende un resto emisor de fluorescencia y un resto interruptor de fluorescencia.

El sumario anterior es solamente ilustrativo y no pretende ser limitante de ninguna manera. Además de los aspectos, realizaciones y características ilustrativos descritos anteriormente, aspectos, realizaciones y características adicionales se volverán evidentes en referencia a los dibujos y la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la secuencia de una región genética *opcA* en la cepa de *N. gonorrhoeae* FA1090. También

se muestran las localizaciones de distintos cebadores y sondas desvelados en las realizaciones descritas en el presente documento.

La **Figura 2** muestra los resultados de detección de 72 aislados clínicos de *N. gonorrhoeae* utilizando el sistema de qPCR de *opcA-6*.

5 Las **Figuras 3A-B** muestra los resultados del ensayo de especificidad del sistema de qPCR de *opcA-6* para *Neisseria* no gonorreica.

La **Figura 4** muestra los resultados del ensayo de especificidad del sistema de qPCR de *opcA-6* para organismos que se encuentran comúnmente en muestras clínicas vaginales.

10 La **Figura 5** muestra histogramas que ilustran los límites de detección del sistema de PCR de *opcA-6* en la detección de *N. gonorrhoeae* en muestras clínicas urinarias y de matriz vaginal utilizando métodos de extracción BD MAX y Viper XT.

Descripción detallada

15 Las cabeceras de sección que se utilizan en el presente documento son con fines de organización solamente y no se consideran como limitantes de la materia objeto descrita de ninguna manera.

20 Cualquier intervalo de valores que se proporciona en el presente documento, se quiere decir que el intervalo incluye el valor de partida y el valor de finalización y cualquier valor o intervalo de valores entre ellos a menos de que se establezca específicamente otra cosa. Por ejemplo, “de 0,2 a 0,5” significa 0,2, 0,3, 0,4, 0,5; intervalos entre ellos tales como 0,2-0,3, 0,3-0,4, 0,2-0,4; incrementos entre ellos tales como 0,25, 0,35, 0,225, 0,335, 0,49; intervalos de incrementos entre ellos tales como 0.26-0,39; y similares.

25 Se proporcionan en el presente documento métodos y composiciones para la detección de *N. gonorrhoeae* utilizando cebadores y/o sondas que se unen al gen de proteínas externas principales *opcA* de *N. gonorrhoeae*. Estos cebadores y sondas se pueden utilizar para amplificar ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* en muestras biológicas para determinar la presencia o ausencia de *N. gonorrhoeae* en una muestra, tal como una muestra biológica. Además, estos cebadores y sondas se pueden utilizar para cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos de *N. gonorrhoeae* en la muestra.

30

Definiciones

35 Como se utiliza en el presente documento, un “ácido nucleico” se refiere a un compuesto polimérico que comprende nucleósidos o análogos de nucleótidos que tienen bases nitrogenadas heterocíclicas, o análogos de bases, unidas entre ellas mediante enlaces del armazón del ácido nucleico (por ejemplo, enlaces fosfodiéster) para formar un polinucleótido. Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos incluyen ARN, ADN, y análogos de los mismos. El armazón de ácido nucleico puede incluir una variedad de enlaces, por ejemplo, uno o más enlaces azúcar-fosfodiéster, enlaces de ácido nucleico-péptido, enlaces fosforotioato o metilfosfonato o mezclas de dichos enlaces en un único oligonucleótido. Los restos de azúcares del ácido nucleico pueden ser ribosa o desoxirribosa, o compuestos similares con sustituciones conocidas. Las bases nitrogenadas convencionales (por ejemplo, A, G, C, T, U), análogos de bases conocidos (por ejemplo, inosina), derivados de bases purínicas o pirimidínicas y restos “abásicos” (es decir, bases no nitrogenadas para una o más posiciones del armazón) se incluyen en la expresión ácido nucleico. Es decir, un ácido nucleico puede incluir solo azúcares, bases y enlaces convencionales que se encuentran en el ARN y ADN, o incluir tanto componentes convencionales como sustituciones (por ejemplo, bases convencionales y análogos unidos mediante un armazón metoxi, o bases convencionales y uno o más análogos de bases unidos mediante un armazón de ARN o ADN).

50 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “aislar ácidos nucleicos” se refiere a la purificación de ácidos nucleicos de uno o más componentes celulares. El experto apreciará que las muestras procesadas para “aislar ácidos nucleicos” de las mismas pueden incluir componentes e impurezas distintas de ácidos nucleicos. Las muestras que comprenden ácidos nucleicos aislados se pueden preparar a partir de especímenes utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden lisar las células utilizando agentes de lisis conocidos y se pueden purificar o purificar parcialmente los ácidos nucleicos de otros componentes celulares. Los reactivos y protocolos adecuados para las extracciones de ADN y ARN se pueden encontrar, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º US 2010-0009351, y US 2009-0131650, respectivamente. En el ensayo de ácidos nucleicos (por ejemplo, los métodos de amplificación y purificación expuestos con mayor detalle posteriormente), se puede añadir la solución de ácidos nucleicos extraída directamente a los reactivos (por ejemplo, sea en forma de líquido, unido a un sustrato, liofilizada, o similares, como se expone con más detalle posteriormente), se necesita para llevar a cabo un ensayo de acuerdo con las realizaciones desveladas en el presente documento.

60

Como se utiliza en el presente documento, “matriz” se refiere a parte de un polinucleótido que contiene al menos una secuencia de nucleótidos diana.

65 Como se utiliza en el presente documento, un “cebador” se refiere a un polinucleótido que puede servir para iniciar una reacción de extensión de una cadena de ácido nucleico. La longitud de un cebador puede variar, por ejemplo,

desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos, desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, desde aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, o desde aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. La longitud de un cebador puede ser aproximadamente de 10 nucleótidos, aproximadamente de 20 nucleótidos, aproximadamente de 25 nucleótidos, aproximadamente de 30 nucleótidos, aproximadamente de 35 nucleótidos, aproximadamente de 40 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 75 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, o un intervalo entre cualquiera de dos de estos valores. En algunas realizaciones, el cebador, el cebador tiene una longitud de 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, es decir, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, o más nucleótidos.

Como se utiliza en el presente documento, una "sonda" se refiere a un ácido nucleico oligomérico que se hibrida específicamente con una secuencia diana de un ácido nucleico, en condiciones que permitan la hibridación, permitiendo de esta manera la detección de la secuencia diana o el ácido nucleico amplificado. Una "diana" de la sonda generalmente se refiere a una secuencia en o un subconjunto de una secuencia de ácido nucleico amplificada que se hibrida específicamente a al menos una parte de una sonda oligomérica mediante enlaces de hidrógeno convencionales (es decir, por emparejamiento de bases). Una sonda puede comprender secuencias específicas de la diana y otras secuencias que contribuyen a la conformación tridimensional de la sonda. Las secuencias son "suficientemente complementarias" si permiten la hibridación estable en condiciones de hibridación adecuadas de una sonda oligomérica a una secuencia diana que no es completamente complementaria a la secuencia específica de diana de la sonda. La longitud de la sonda puede variar, por ejemplo desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos, desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, desde aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, o desde aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. La longitud de una sonda puede ser aproximadamente de 10 nucleótidos, aproximadamente de 20 nucleótidos, aproximadamente de 25 nucleótidos, aproximadamente de 30 nucleótidos, aproximadamente de 35 nucleótidos, aproximadamente de 40 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 75 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, o un intervalo entre cualquiera de dos de estos valores. En algunas realizaciones, la sonda tiene una longitud de 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, es decir, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, o más nucleótidos.

En algunas realizaciones, la sonda puede no ser específica de secuencia. Por ejemplo, en algunas realizaciones.

Preferentemente, los cebadores oligonucleotídicos y/o sondas desvelados en el presente documento pueden tener entre 8 y 45 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, los cebadores y/o sondas pueden tener al menos , 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, o más nucleótidos de longitud.

Las secuencias de cebador y sonda desveladas en el presente documento se pueden modificar para que contengan nucleótidos adicionales en el extremo 5' o el 3', o en ambos. El experto apreciará que las bases adicionales en el extremo 3' de cebadores de amplificación (no necesariamente en las sondas) son complementarios en general a la secuencia de la matriz. Las secuencias de cebador y de sonda desveladas en el presente documento también se pueden modificar eliminando nucleótidos de los extremos 5' y 3'. El experto apreciará que con el fin de que funcionen para la amplificación, los cebadores o sondas tendrán una longitud mínima y una temperatura de hibridación como se expone en el presente documento.

Los cebadores y sondas oligonucleotídicos se pueden unir a sus dianas a una temperatura de hibridación, que es una temperatura menor de la temperatura de fusión (T_m). Como se utiliza en el presente documento " T_m " y "temperatura de fusión" son términos intercambiables que se refieren a la temperatura a la que el 50 % de la población de moléculas de polinucleótido de doble cadena se disocian en cadenas sencillas. La fórmula para calcular la T_m de los polinucleótidos es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, se puede calcular la T_m por la siguiente ecuación: $T_m = 69,3 + 0,41 \times (G+C) \% - 50/L$, donde L es la longitud de la sonda en nucleótidos. La T_m de un polinucleótido híbrido también se puede estimar utilizando una fórmula adoptada de los ensayos de hibridación en 1 M de sal, y se utiliza comúnmente para calcular la T_m para los cebadores de PCR: $[(\text{número de A+T}) \times 2 + (\text{número de C+G}) \times 4] \text{ } ^\circ\text{C}$. Véase, por ejemplo, C. R. Newton et al. PCR, 2ª ed., Springer-Verlag (New York: 1997), p. 24. Existen otras computaciones más sofisticadas en la técnica, que toman en cuenta características estructurales así como de secuencia para el cálculo de la T_m . La temperatura de fusión de un oligonucleótido puede depender de la complementariedad entre el cebador o sonda oligonucleotídicos y la secuencia de unión, y de las condiciones salinas. En algunas realizaciones, un cebador o sonda oligonucleotídicos que se proporcionan en el presente documento tienen una T_m de menos de aproximadamente 90 °C en 50 mM de KCl, 10 mM de tampón Tris-HCl, por ejemplo, de aproximadamente 89 °C, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39 °C o menos, incluyendo los intervalos entre dos cualquiera de los valores enumerados.

En algunas realizaciones, los cebadores desvelados en el presente documento, por ejemplo, los cebadores de amplificación se pueden proporcionar como un par de cebadores de amplificación, que comprenden un cebador directo y un cebador inverso (primer cebador de amplificación y segundo cebador de amplificación).

Preferentemente, los cebadores directo e inverso tienen T_m que no se diferencian más de 10 °C, por ejemplo, que difieren menos de 10 °C, menos de 9 °C, menos de 8 °C, menos de 7 °C, menos de 6 °C, menos de 5 °C, menos de 4 °C, menos de 3 °C, menos de 2 °C, o menos de 1 °C.

5 Las secuencias de cebador y sonda se pueden modificar para que tengan sustituciones de nucleótidos (con respecto a la secuencia diana) en la secuencia de oligonucleótido, a condición de que el oligonucleótido contenga suficiente complementariedad para hibridarse específicamente a la secuencia de ácido nucleico diana. De esta manera, se pueden sustituir al menos 1, 2, 3, 4, o hasta aproximadamente 5 nucleótidos. Como se utiliza en el presente documento, el término “complementario” se refiere a la complementariedad de secuencia entre regiones de dos cadenas de polinucleótido o entre dos regiones de la misma cadena de polinucleótido. Una primera región de un polinucleótido es complementaria de una segunda región del mismo polinucleótido u otro diferente, si, cuando las dos regiones se disponen de manera antiparalela, al menos un nucleótido de la primera región es capaz de hacer un emparejamiento de bases con una base de la segunda región. Por lo tanto, no se necesita que dos polinucleótidos complementarios se emparejen por sus bases en cada posición de nucleótido. “Complementario totalmente” se refiere a un primer polinucleótido que es un 100 % o “completamente” complementario con un segundo polinucleótido y forma de esta manera un emparejamiento de bases en cada posición de nucleótido. “Parcialmente complementario” también se refiere a un primer polinucleótido que no es complementario al 100 % (por ejemplo, un 90 %, o un 80 % o 70 % complementario) y contiene nucleótidos no coincidentes en una o más posiciones de nucleótido. En algunas realizaciones, un oligonucleótido incluye una base universal.

10 Como se utiliza en el presente documento, una “secuencia de nucleótido exógena” se refiere a una secuencia introducida por cebadores o sondas que se utilizan para la amplificación, de manera que los productos de amplificación contendrán una secuencia de nucleótidos exógena y una secuencia diana en una disposición que no se encuentra en la matriz original a partir de la que se ha copiado la secuencia de nucleótidos diana.

25 Como se utiliza en el presente documento, “identidad de secuencia” o “porcentaje idéntico” como se aplica a las moléculas de ácido nucleico es el porcentaje de restos de ácido nucleico en una secuencia de molécula de ácido nucleico que es idéntico respecto a una secuencia de ácido nucleico objeto, después de alinear las secuencias para conseguir el máximo porcentaje de identidad, y no se considera cualquier sustitución de un resto de ácido nucleico como parte de la identidad de secuencia. La identidad de secuencia de ácidos nucleicos se puede determinar utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo CLUSTALW, T-COFFEE, BLASTN.

30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “suficientemente complementario” se refiere a una secuencia de bases de ácido nucleico contigua que es capaz de hibridarse con otra secuencia de bases mediante enlaces de hidrógeno entre una serie de bases complementarias. Las secuencias de bases complementarias pueden ser complementarias en cada posición de la secuencia oligomérica utilizando emparejamiento de bases convencional (por ejemplo, G:C, A:T o A:U) o puede contener uno o más restos que no son complementarios (incluyendo posiciones abásicas), pero en la que la secuencia de bases complementaria completa es capaz de hibridarse específicamente con otra secuencia de bases en condiciones de hibridación adecuadas. Las bases contiguas pueden ser al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 99 %, o el 100 % complementaria a una secuencia a la que se pretende hibridar un oligómero. Secuencias sustancialmente complementarias se puede referir a secuencias que varían en porcentaje de identidad de entre 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75, 70 o menos, o cualquier número entre ellos, en comparación con la secuencia de referencia. Un experto puede escoger fácilmente las condiciones de hibridación apropiadas que se pueden prever basándose en la composición de la secuencia de bases, o determinarse utilizando ensayos de rutina (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

50 Oligonucleótidos

El *opcA* es un gen de proteínas externas principales presente en *N. gonorrhoeae*. En la *N. gonorrhoeae*, las secuencias de nucleótidos del gen *opcA* se determinaron por primera vez a partir de dos cepas de referencia FA1090 y MS11 (Zhu et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol. 193-200 (2002)). Se diferenciaban tres sitios polimórficos, dos mutaciones sinónimas y una mutación no sinónima entre las dos cepas gonocócicas, y se descubrió una eliminación de codón en *opcA* de MS11. Se examinaron veintiséis cepas de *N. gonorrhoeae* mediante PCR utilizando pares de cebadores de *opcA* gonocócico, y se descubrió que el *opcA* estaba presente en todas estas veintiséis cepas (Zhu et al., J. Clin. Microbiol., 458-62 (1995); Zhu et al., 2002). También se examinaron cincuenta y una cepas en cuanto al *opcA* mediante PCR e hibridación de ADN, y todas las cepas presentaban la presencia de *opcA* en sus genomas. Zhu et al., FEMS Microbiol. Lett. 173-77 (2001). Los productos de la PCR del gen *opcA* se digirieron utilizando cuatro endonucleasas de restricción de corte frecuente (PCR-RFLP). Los mismos patrones PCR-RFLP que los de la cepa de referencia FA1090 se observaron en todas las cepas gonocócicas ensayadas, mostrando una secuencia conservada del *opcA* en *N. gonorrhoeae*.

65 Algunas realizaciones desveladas en el presente documento proporcionan oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores de amplificación y sondas) que son capaces de hibridarse específicamente (por ejemplo, bajo condiciones de

amplificación de ácido nucleico convencionales, por ejemplo, condiciones de PCR convencionales, y/o condiciones de hibridación rigurosas) con la región del gen *opcA* en *N. gonorrhoeae*, o una complementaria de la misma. Una secuencia ejemplar de la región del gen *opcA* relacionada con las realizaciones desveladas en el presente documento se proporciona en el N.º de registro AJ242839. Una secuencia ejemplar de la región del gen *opcA* se proporciona en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, los cebadores y las sondas que se unen específicamente a la región del gen *opcA* de *N. gonorrhoeae* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 7) se utilizan en la detección de la presencia o cantidad de ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* en una muestra biológica. En algunas realizaciones, se proporciona un cebador que se hibrida con la SEQ ID NO: 7 en condiciones convencionales para la amplificación de ácidos nucleicos. Ejemplos de oligonucleótidos capaces de hibridarse específicamente a la región del gen *opcA* de *N. gonorrhoeae* incluyen, pero no se limitan a, SEQ ID NO: 1-6 como se proporcionan en la Tabla 1. En la Tabla 1, "localización de oligo" se refiere a la localización de cada oligonucleótido en la SEQ ID NO: 7.

Tabla 1

Nombre del sistema	Nombre del oligo	Tamaño del oligo	Localización del oligo	Tamaño del amplicón (pb)	Secuencia (5'-3')	Oligo
opcA-6	GC.opcA.FP6	19	572-590	74	TACGTGTGCGGATGTGGAA(SEQ ID NO: 1)	58
	GC.opcA.RP6	27	616-642		TTAGCCTTTCTATGTCCCTAACATCTC (SEQ ID NO: 2)	58
	GC.opcA.D6	21	592-612		CTCGGTGGGCAAACGGAGCAA (SEQ ID NO: 3)	68
opcA-5	GC.opcA.FP5	20	221-240	102	CCTTTCCTGTCCCTTCTG(SEQ ID NO: 4)	55
	GC.opcA.RP5	21	302-322		GTTGTGATAAAGGCTTCGCTG (SEQ ID NO: 5)	54
	GC.opcA.D5	24	266-289	CCCTCGGAGAGTCCCTCGACAAAA (SEQ ID NO: 6)	62	

También se proporcionan en el presente documento oligonucleótidos que contienen 1, 2, 3, 4, o más faltas de coincidencias o nucleótidos universales respecto a las SEQ ID NO: 1-6 o complementarios de los mismos, que incluyen oligonucleótidos que son al menos un 80 % idénticos (por ejemplo, al menos un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos) con las SEQ ID NO: 1-6 o complementarios de los mismos. En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende una secuencia que se selecciona de entre las SEQ ID NO: 1-6. En algunas realizaciones el oligonucleótido comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 85 % de identidad con una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1-6. En algunas realizaciones, el oligonucleótido consiste en una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1-6. En algunas realizaciones, el oligonucleótido consiste en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 85 % de identidad o al menos aproximadamente un 95 % de identidad con una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1-6.

También se desvelan en el presente documento composiciones que comprende los oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores de amplificación y/o sondas que son capaces de hibridarse específicamente a la secuencia de la región del gen *opcA* de *N. gonorrhoeae*. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más cebadores de amplificación y/o una o más sondas capaces de hibridarse específicamente a la secuencia de la región del gen *opcA* de *N. gonorrhoeae*. En algunas realizaciones, la composición comprende un primer y segundo cebadores de amplificación capaces de hibridarse específicamente con la secuencia de la región del gen *opcA* de *N. gonorrhoeae*. En algunas realizaciones, el cebador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1, 2, 4, o 5. En algunas realizaciones, el cebador comprende una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad o al menos aproximadamente un 95 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 1, 2, 4, o 5. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 1, 2, 4 o 5. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad o al menos aproximadamente un 95 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 1, 2, 4 o 5.

En algunas realizaciones, la composición comprende adicionalmente una sonda capaz de hibridarse específicamente con un amplicón de *opcA*. En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o 6. En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 85 % de identidad o al menos aproximadamente un 95 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 3 o 6. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 3 o 6. En algunas realizaciones, la sonda

consiste en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 85 % de identidad o al menos aproximadamente un 95 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 3 o 6.

5 En algunas realizaciones, las sondas oligonucleotídicas pueden incluir un resto detectable. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas oligonucleotídicas que se desvelan en el presente documento pueden comprender un marcador radioactivo. Ejemplos no limitantes de marcadores radioactivos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{32}P , y ^{35}S . En algunas realizaciones, las sondas oligonucleotídicas pueden incluir uno o más marcadores o restos detectables no radiactivos, que incluyen pero no se limitan a ligandos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas, y anticuerpos. Otros marcadores detectables para su uso con sondas, que pueden ser capaces de aumentar la sensibilidad del método de la invención, incluyen biotina y radionucleótidos. Será evidente para el experto habituado que la elección de un marcador particular dicta la manera en la que se une a la sonda. Por ejemplo, sondas oligonucleotídicas marcadas con uno o más colorantes, de manera que cuando se hibridan con una matriz de ácido nucleico, se genera un cambio detectable de fluorescencia. Aunque pueden ser deseables colorantes no específicos para algunas aplicaciones, las sondas específicas de secuencia pueden proporcionar mediciones más precisas de amplificación. Una configuración de la sonda específica de secuencia puede incluir un extremo de la sonda unido a un fluoróforo, y el otro extremo de la sonda unido a un interruptor. Cuando la sonda no está hibridada, puede mantener una configuración tallo-lazo, en el que el fluoróforo es interrumpido por el interruptor, evitando de esta manera que el fluoróforo tenga fluorescencia. Cuando la sonda se hibrida a una secuencia de ácido nucleico matriz, se linealiza distanciando el fluoróforo del interruptor, y de esta manera se permite al fluoróforo que tenga fluorescencia. Otra configuración de la sonda específica de secuencia puede incluir una primera sonda unida a un primer fluoróforo de un par FRET, y una segunda sonda unida a un segundo fluoróforo de un par FRET. La primera sonda y la segunda sonda se puede configurar para que se hibride a secuencias de un amplicón que es que estén suficientemente próximas para permitir la transferencia energética mediante el FRET cuando la primera sonda y la segunda sonda se hibridan con el mismo amplicón.

25 En algunas realizaciones, la sonda específica de secuencia comprende un oligonucleótido que se desvela en el presente documento conjugado con un fluoróforo. En algunas realizaciones, la sonda se conjuga con dos o más fluoróforos. Ejemplos de fluoróforos incluyen: colorantes de xanteno, por ejemplo, colorantes de fluoresceína y rodamina, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), éster etílico monohidrócloruro del ácido 2-[etil-amino]-3-(etilimino)-2-7-dimetil-3H-xanteno-9-il] benzoico (R6G) (emite una radiación de respuesta en la longitud de onda que varía desde aproximadamente 500 a 560 nm), yoduro de 1,1,3,3,3',3'-hexametilindodicarbocianina (HIDC) (emite una radiación de respuesta en la longitud de onda que varía de aproximadamente 600 a 660 nm), 6-carboxifluoresceína (comúnmente conocida por las abreviaturas FAM y F), 6-carboxi-2',4',7,4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE o J), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA o T), 6-carboxi-X-rodamina (ROX o R), 5-carboxirodamina-6G (R6G5 o G5), 6-carboxirodamina-6G (R6G6 o G6), y rodamina 110; colorantes cianina, por ejemplo colorantes Cy3, Cy5, y Cy7; cumarinas, por ejemplo, umbeliferona; colorantes benzimida, por ejemplo, Hoechst 33258; colorantes fenantridina, por ejemplo, Rojo Texas; colorantes de etidio; colorantes de acridina; colorantes de carbazol; colorantes de fenozacina; colorantes de porfirina; colorantes de polimetina; por ejemplo, colorantes de cianina tales como Cy3 (emite una respuesta de radiación en la longitud de ondas que varía desde aproximadamente 640 a 680 nm), etc.; colorantes BODIPY y colorantes de quinolina. Los fluoróforos específicos de interés incluyen: Pireno, Cumarina, Dietilaminocumarina, FAM, Clorotriazinil fluoresceína, R110, Eosina, JOE, R6G, HIDC Tetrametilrodamina, TAMRA, Lisamina, ROX, Naftofluoresceína, Rojo Texas, Naftofluoresceína, Cy3, y Cy5, CAL, naranja flúor, y similares.

45 En algunas realizaciones, la sonda se conjuga con un interruptor. Un interruptor puede absorber la radiación electromagnética y disiparla como calor, manteniéndose de esta manera oscuro. Ejemplo de interruptores incluyen Dabcyl, NFQ, tales como BHQ-1 or BHQ-2 (Biosearch), IOWA BLACK FQ (IDT), y IOWA BLACK RQ (IDT). En algunas realizaciones, el interruptor se selecciona para emparejarse con un fluoróforo de manera que absorba la radiación electromagnética emitida por el fluoróforo. Los pares fluoróforo/interruptor útiles en las composiciones y métodos desvelados en el presente documento se conocen bien en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, descritos en S. Marras, "Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes" disponible en el sitio de internet molecular-beacons.org/download/marras.mmb06 %28335 %293.pdf.

55 En algunas realizaciones, se une un fluoróforo en el primer extremo de la sonda, y se une un interruptor en un segundo extremo de la sonda. La unión puede incluir un enlace covalente, y puede incluir opcionalmente al menos una molécula enlazadora posicionada entre la sonda y el fluoróforo o interruptor. En algunas realizaciones, se une un fluoróforo a un extremo 5' de la sonda, y se une un interruptor a un extremo 3' de la sonda. En algunas realizaciones, se une un fluoróforo en un extremo 3' de una sonda, y se une un interruptor en un extremo 5' de una sonda. Ejemplos de sondas que se pueden utilizar en la amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos incluyen balizas moleculares, sondas SCORPION™ (Sigma), sondas TAQMAN™ (Life Technologies) y similares. Otras tecnologías de detección que son útiles en las realizaciones desveladas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a tecnología de sondas de nanopartículas (véase, Elghanian, et al. (1997) Science 277:1078-1081) y tecnología de sondas Amplifluor (véase, Pat. de EE. UU. N.º: 5.866.366; 6.090.592; 6.117.635; y 6.117.986).

65 Los ácidos nucleicos que se proporcionan en el presente documento pueden estar de distintas formas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se disuelven (sea solos o en combinación con otros ácidos nucleicos distintos) en una solución, por ejemplo un tampón. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan,

sea solos o en combinación con otros ácidos nucleicos aislados, como una sal. En algunas realizaciones, se proporcionan los ácidos nucleicos en forma liofilizada que se puede reconstituir. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados desvelados en el presente documento se pueden proporcionar en un aglomerado liofilizado solos, o en un aglomerado liofilizado con otros ácidos nucleicos aislados. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan fijados en una sustancia sólida, tal como una perla, una membrana, o similares. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan en una célula huésped, por ejemplo una línea celular que alberga un plásmido, o una línea celular que alberga una secuencia integrada establemente.

10 Métodos

Se proporcionan en el presente documento métodos para la detección y/o cuantificación de *N. gonorrhoeae* en una muestra. En algunas realizaciones, el método incluye una etapa de puesta en contacto de la muestra que se va a analizar con uno o más oligonucleótidos que se hibridan específicamente a la secuencia de la región del gen *opcA* de *N. gonorrhoeae* en condiciones de amplificación de ácido nucleico convencionales y/o condiciones de hibridación rigurosas. En algunas realizaciones, el método incluye la generación de un amplicón de la secuencia *opcA* de la muestra, si la muestra comprende *N. gonorrhoeae*. El método puede incluir también una etapa de determinación de la presencia o cantidad de uno o más productos amplificados como indicativa de la presencia de la secuencia del *opcA* y/o *N. gonorrhoeae* en la muestra.

20 Ensayo de ácidos nucleicos

De acuerdo con las reivindicaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen el ensayo de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ensayo puede incluir ensayar las secuencias de ácido nucleico diana en una muestra. Se puede utilizar distintas formas de ensayo de ácidos nucleicos en las realizaciones desveladas en el presente documento, incluyendo pero sin limitarse al ensayo que implica la amplificación del ácido nucleico.

Como se utiliza en el presente documento, la amplificación de ácido nucleico se refiere a cualquier procedimiento conocido para obtener múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico diana o sus complementarias o fragmentos de la misma, utilizando métodos específicos de secuencia. Ejemplos de métodos de amplificación conocidos incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por replicasa, Inmuno-amplificación, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación en círculo rodante, y amplificación mediada por transcripción (TMA). Véase, por ejemplo, Mullis, "Process for Amplifying, Detecting, and/or Cloning Nucleic Acid Sequences," Patente de EE. UU. N° 4.683.195; Walker, "Strand Displacement Amplification," Patente de EE. UU. N° 5.455.166; Dean et al, "Multiple displacement amplification," Patente de EE. UU. N° 6.977.148; Notomi et al., "Process for Synthesizing Nucleic Acid," Patente de EE. UU. N° 6.410.278; Landegren et al. Patente de EE. UU. N° 4.988.617 "Method of detecting a nucleotide change in nucleic acids"; Birkenmeyer, "Amplification of Target Nucleic Acids Using Gap Filling Ligase Chain Reaction," Patente de EE. UU. N° 5.427.930; Cashman, "Blocked-Polymerase Polynucleotide Immunoassay Method and Kit," Patente de EE. UU. N° 5.849.478; Kacian et al., "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods," Patente de EE. UU. N° 5.399.491; Malek et al., "Enhanced Nucleic Acid Amplification Process," Patente de EE. UU. N° 5.130.238; Lizardi et al., BioTechnology, 6:1197 (1988); Lizardi et al., Patente de EE. UU. N° 5.854.033 "Rolling circle replication reporter systems". En algunas realizaciones, se pueden llevar a cabo dos o más de los métodos de amplificación de ácido nucleico mencionados anteriormente, por ejemplo, secuencialmente.

Por ejemplo, la amplificación por LCR utiliza al menos cuatro oligonucleótidos distintos para amplificar una diana y su cadena complementaria utilizando múltiples ciclos de hibridación, ligadura y desnaturalización (Patente EP N° 0 320 308). La SDA amplifica utilizando un cebador que contienen un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que nomina una cadena de un dúplex de ADN hemimodificación que incluye la secuencia diana, seguido por amplificación en una serie de extensión de cebador y etapas de desplazamiento de la cadena (Patente de EE. UU. N° 5.422.252 de Walker et al.).

La PCR es un método bien conocido en la técnica para la amplificación de ácidos nucleicos. La PCR implica la amplificación de una secuencia diana utilizando dos o más cebadores oligonucleotídicos específicos de secuencia extensibles que flanquean la secuencia diana. El ácido nucleico que contiene la secuencia de interés se somete a un programa de múltiples rondas de ciclado térmico (desnaturalización, hibridación y extensión) en presencia de los cebadores, una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, la polimerasa Taq) y distintos dNTP, dando como resultado la amplificación de la secuencia diana. La PCR utiliza múltiples rondas de reacciones de extensión del cebador en las que las cadenas complementarias de una región definida de la molécula de ADN se sintetizan simultáneamente por una ADN polimerasa termoestable. Al final de cada ciclo, cada molécula de ADN recién sintetizada actúa como matriz para el siguiente ciclo. Durante las rondas repetidas de estas reacciones, el número de cadenas de ADN recién sintetizadas aumentan exponencialmente de manera que después de 20 a 30 ciclos de reacción, la matriz de ADN inicial se habrá replicado varios cientos de veces o un millón de veces. Los métodos para llevar a cabo los diferentes tipos y modos de PCR están ampliamente descritos en la bibliografía, por ejemplo, en

"PCR Primer: A Laboratory Manual" Dieffenbach y Dveksler, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995, y por Mullis et al. en patentes (por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nº 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159) y publicaciones científicas (por ejemplo, Mullis et al. 1987, *Methods in Enzymology*, 155:335-350).

5 La PCR puede generar productos de amplificación de cadena doble adecuados para el procesamiento posterior a la amplificación. Si se desea, los productos de amplificación se pueden detectar por visualización con electroforesis en gel de agarosa, mediante un formato de inmunoensayo enzimático utilizando la detección colorimétrica basada en sonda, mediante tecnología de emisión de fluorescencia, o mediante otros medios de detección conocidos por el experto en la técnica.

10 Se ha descrito una amplia variedad de métodos de PCR en muchas fuentes, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Sección 15, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994). Ejemplos de un método de PCR incluye pero no se limita a, PCR en tiempo real, PCR de punto final, PCR de polimorfismo de longitud del fragmento amplificado (AFLP-PCR), Alu-PCR, PCR asimétrica, PCR de colonia, DD-PCR, PCR degenerada, PCR de inicio caliente, PCR *in situ*, PCR inversa, PCR larga, PCR múltiplex, PCR anidada, PCR-ELISA, PCR-RFLP, PCR de polimorfismo de conformación de cadena única (PCR-SSCP), PCR cuantitativa competitiva (QC-PCR), PCR de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE-PCR), PCR de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR), PCR en tiempo real, PCR palindrómica repetitiva extragenética (Rep-PCR), PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR), TAIL-PCR, PCR de rampa decreciente y PCR de Vectorette.

20 La PCR en tiempo real, también llamada reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR), se puede utilizar para cuantificar y amplificar simultáneamente una parte específica de una molécula de ácido nucleico determinada. Se puede utilizar para determinar si una secuencia específica está presente en la muestra; y si está presente, el número de copias de la secuencia que está presente. La expresión "en tiempo real" se refiere al control periódico durante la PCR. Ciertos sistemas tales como los sistemas de detección de secuencia ABI 7700 y 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) realiza el control durante cada ciclo térmico en un punto predeterminado o definido por el usuario. El análisis en tiempo real de PCR con resonancia de transferencia de energía de fluorescencia (FRET) de sondas mide los cambios de señal de colorante fluorescente de ciclo a ciclo, preferentemente menos cualquier señal de control interno. El procedimiento en tiempo real sigue el patrón general de PCR, pero el ácido nucleico se cuantifica después de cada ronda de amplificación. Dos ejemplos del método de cuantificación son el uso de colorantes fluorescentes (por ejemplo, SYBRGreen) que se intercalan en el ADN de doble cadena, y sondas de oligonucleótido de ADN modificado que tienen fluorescencia cuando se hibridan con un ADN complementario. Los agentes de intercalado tienen una fluorescencia relativamente baja cuando no están unidos, y una fluorescencia relativamente alta al unirse a los ácidos nucleicos de doble cadena. Como tal, se pueden utilizar agentes de intercalado para controlar la acumulación de ácidos nucleicos de doble cadena durante una reacción de amplificación de ácido nucleico. Ejemplos de dichos colorantes no específicos útiles en las realizaciones desveladas en el presente documento incluyen agentes de intercalado tales como SYBR Green (Molecular Probes), yoduro de propidio, bromuro de etidio, y similares.

40 Debido a las secuencias diana específicas, cebadores y sondas, se pueden utilizar los métodos desvelados en el presente documento para detectar la presencia/ausencia o cantidad de *N. gonorrhoeae* en una muestra con alta sensibilidad y precisión. Por ejemplo, puede detectar con precisión *N. gonorrhoeae* para la exclusión de especies de *Neisseria* no gonorreicas estrechamente relacionadas. Los métodos tienen una especificidad mejorada, es decir, una reactividad cruzada reducida o ninguna para las especies de *Neisseria* no gonorreicas (por ejemplo, *N. lactamica*, *N. cineria*, y *N. sicca*), en comparación con el sistema de detección basado en el gen de pilina (por ejemplo, el ensayo de Amplificación ProbeTec™ Qx).

50 Los cebadores desvelados en el presente documento se pueden emparejar con sistemas de PCR adicionales utilizando un perfil térmico o químico uniformes de PCR para proporcionar un panel de ensayos para la detección de organismos vaginales, para mejorar la sensibilidad total y la robustez del ensayo.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende un resto detectable, como se describe en el presente documento, y se puede detectar la hibridación específica del oligonucleótido de la región del gen *opcA*, por ejemplo, por medios directos o indirectos. En consecuencia, algunas realizaciones para la detección y/o la identificación de *N. gonorrhoeae* en una muestra incluyen las etapas de proporcionar una muestra de ensayo; y poner en contacto la muestra con una sonda oligonucleotídica que se hibrida específicamente a la región del gen *opcA* de *N. gonorrhoeae* en condiciones de amplificación de ácido nucleico convencionales y/o condiciones de hibridación rigurosas, donde la sonda oligonucleotídica tiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 45 nucleótidos de longitud, y comprende un resto detectable, donde la puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones que permitan la hibridación específica del cebador con la región del gen *opcA* si la *N. gonorrhoeae* está presente en la muestra. Se puede determinar la presencia y/o cantidad de sonda que está unida específicamente a la región del gen *opcA* (si está presente en la muestra que se va a ensayar), donde la sonda unida es indicativa de la presencia de *N. gonorrhoeae* en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de sonda unida se utiliza para determinar la cantidad de *N. gonorrhoeae* en la muestra.

65 La etapa de determinación se puede conseguir utilizando cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la

técnica, incluyendo pero sin limitarse a, hibridación *in situ* a continuación de la etapa de puesta en contacto. La detección de dúplex híbridos (es decir, de una sonda unida específicamente a la región del gen *opcA*) se puede llevar a cabo mediante varios métodos. Normalmente, los dúplex de hibridación se separan de los ácidos nucleicos no hibridados y los marcadores unidos a los dúplex se detectan entonces. Dichos marcadores se refieren a marcadores radioactivos, fluorescentes, biológicos o marcadores enzimáticos de uso convencional en la técnica. Un marcador se puede conjugar con cualquiera de las sondas oligonucleotídicas o los ácidos nucleicos derivados de la muestra biológica. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden emplear etapas de lavado para lavar el exceso de ácidos nucleicos diana/de la muestra o sonda oligonucleotídica (así como conjugados no unidos, si fuera aplicable). Adicionalmente, los formatos de ensayo heterogéneo convencionales son adecuados para detectar los híbridos utilizando los marcadores presentes en los cebadores y sondas oligonucleotídicas.

En algunas realizaciones, una muestra que se va a ensayar en cuanto a la presencia de *N. gonorrhoeae* se procesa antes de llevar a cabo los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la muestra se puede aislar, concentrar, o someterse a otras etapas de procesamiento distintas antes de llevar a cabo los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, en otras realizaciones, la muestra se puede procesar para aislar ácidos nucleicos de la muestra antes de poner en contacto la muestra con los oligonucleótidos, como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento se llevan a cabo en la muestra sin cultivar la muestra *in vitro*. En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento se llevan a cabo en la muestra sin aislar los ácidos nucleicos de la muestra antes de poner en contacto la muestra con los oligonucleótidos como se desvela en el presente documento.

Los métodos desvelados en el presente documento se pueden automatizar, proporcionando de esta manera una opción de alto rendimiento para la detección de *N. gonorrhoeae*. Se pueden utilizar distintas plataformas de PCR múltiple, por ejemplo, plataformas BD MAX™, Viper™, o Viper™, para llevar a cabo una o más etapas de los métodos desvelados. Los métodos se pueden llevar a cabo de manera múltiple. Por ejemplo, la amplificación de ácido nucleico, en algunas realizaciones, comprende llevar a cabo una PCR múltiple.

Muestras

Los métodos y composiciones desvelados en el presente documento se pueden utilizar para detectar la presencia/ausencia y cantidad de *N. gonorrhoeae* en una amplia variedad de muestras. Como se utiliza en el presente documento, una "muestra" se refiere a una muestra que se toma de un número o más de sujetos o fuentes que son sospechosos de contener o que contiene potencialmente un ácido nucleico de *N. gonorrhoeae*.

De acuerdo con las reivindicaciones, la muestra se puede tomar de una fuente biológica, tal como, un tejido, sangre, saliva, esputo, mucus, sudor, orina, uretra, hisopos uretrales, cuello uterino, hisopos de cuello uterino, pene, ano, garganta, vagina, hisopos urogenitales y anales, hisopos conjuntivales, fluido del cristalino ocular, líquido cefalorraquídeo, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, caldos de fermentación, cultivos celulares, mezclas de reacción química y similares. La muestra biológica se puede utilizar (i) directamente como se obtiene del sujeto o fuente, o (ii) a continuación un pre-tratamiento para modificar las características de la muestra. Por lo tanto, la muestra de ensayo se puede pre-tratar antes de su uso. por ejemplo, preparando el plasma o suero a partir de la sangre, destruyendo las células o partículas víricas, preparando líquidos a partir de materiales sólidos, diluyendo los fluidos viscosos, filtrando líquidos, concentrando líquidos, inactivando componentes de interferencia, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos, y similares. La preparación de la muestra puede incluir también el uso de una solución que contienen tampones, sales, detergentes, y/o similares que se utilizan para preparar la muestra para el análisis. En algunas realizaciones, la muestra se procesa antes del ensayo molecular. En algunas realizaciones la muestra se analiza directamente, y no se pre-procesa antes del ensayo.

La muestra puede ser una muestra biológica, por ejemplo, una muestra clínica. En algunas realizaciones, la muestra se puede recolectar de la uretra, pene, ano, garganta, cuello uterino, o vagina de un sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra vaginal.

Las muestras vaginales o urinarias a menudo se infectan con múltiples organismos. Los cebadores y sondas desvelados son tolerantes a infecciones mixtas de la matriz vaginal o urinaria.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar situaciones particulares y cuadros en los que se puede aplicar la presente tecnología y no pretenden que restrinjan el alcance de la invención y las reivindicaciones incluidas en la presente divulgación.

Ejemplo 1

Detección de setenta y dos aislados clínicos de *N. gonorrhoeae*

Los tampones de muestra se vertieron con 72 aislados clínicos/cepas y lisados por calor de *N. gonorrhoeae*.

respectivamente. Se utilizó el sistema BD MAX™ para extraer el ADN de cada solución de muestra, y el ADN extraído se amplificó utilizando un sistema de PCR opcA-6 que se muestra en la Tabla 1 para detectar la presencia de la secuencia de la región del gen *opcA* en *N. gonorrhoeae*. Como se muestra en la Figura 2, el sistema opcA-6 identificaba satisfactoriamente los 72 aislados clínicos de *N. gonorrhoeae* diferentes que se ensayaron.

Este ejemplo demuestra que el sistema de PCR opcA-6 se puede utilizar para detectar una amplia variedad de aislados clínicos de *N. gonorrhoeae*.

Ejemplo 2

Ensayo de especificidad del sistema de PCR opcA-6

Los tampones de muestra se vertieron con los organismos de *Neisseria* y se lisaron por calor. Se utilizó el sistema BD MAX™ para extraer el ADN de cada solución de muestra, y el ADN se amplificó utilizando el sistema de PCR opcA-6 que se muestra en la Tabla 1 o el sistema de qPCR Pilina para detectar la presencia de organismos de *Neisseria* en las soluciones de muestra. Como se muestra en la Figura 3A, el sistema opcA-6 daba como resultado un producto no amplificado en algunas muestras vertidas solamente con *Neisseria* no gonorreica y por lo tanto no daba lugar a falsos positivos en todas las especies de *Neisseria* no gonorreicas ensayadas. Como se muestra en la Figura 3B, el sistema qPCR basado en pilina reaccionaba de manera cruzada con varias especies de *Neisseria* no gonorreicas (por ejemplo, *N. cineria*, *N. sicca*, *N. lactamica*), mientras que el sistema opcA-6 solo generaba un producto de amplificación en la muestra con el vertido de *N. gonorrhoeae*.

Este ejemplo muestra que el sistema de PCR opcA-6 es altamente específico para *N. gonorrhoeae*, y no reacciona de manera cruzada con ninguna secuencia de *Neisseria* no gonorreica.

Ejemplo 3

Ensayo de especificidad el sistema de PCR opcA-6

Un tampón de muestra se vertió con organismos que se encuentran comúnmente en una muestra clínica vaginal y se lisaron por calor, respectivamente. Se utilizó el sistema BD MAX™ para extraer el ADN de la solución de muestra, y el ADN extraído se amplificó utilizando el sistema de PCR opcA-6 que se muestra en la Tabla 1. Como se muestra en la Figura 4, el sistema opcA-6 no reacciona de manera cruzada con ninguno de los 115 organismos vertidos en la muestra, y no daba como resultado un producto de amplificación.

Este ejemplo demuestra que el sistema de PCR opcA-6 es altamente específico para *N. gonorrhoeae*, y no reacciona de manera cruzada con secuencias de organismos que se encuentran comúnmente en las muestras vaginales.

Ejemplo 4

Límites de detección del sistema de PCR opcA-6

Las muestras clínicas urinarias y de matriz vaginal se vertieron con *N. gonorrhoeae* y se lisaron por calor. Se utilizaron los sistemas BD MAX™ y Viper™ XTR para extraer el ADN de las muestras, respectivamente, y el ADN extraído se amplificó utilizando el sistema de PCR opcA-6 que se muestra en la Tabla 1 para determinar los límites de detección del sistema. Los resultados se muestran en la Figura 5. Como se muestra en la Figura 5, el sistema de qPCR opcA-6 tenía una mayor proporción positiva en el sistema MAX™ que en el sistema de amplificación de utilizada actualmente en el sistema Viper™ XTR (marcado como GC Qx en la Figura 5).

Con respecto al uso de sustancialmente cualquiera de los términos en plural y/o singular del presente documento, puede ser traducido por los expertos en la técnica a partir del plural al singular y/o del singular al plural si es apropiado para el contexto y/o aplicación. Las distintas permutaciones del singular/plural pueden exponerse expresamente en el presente documento para salvaguardar la claridad.

Se entenderá por los expertos en la técnica que, en general, los términos utilizados en el presente documento, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (por ejemplo, cuerpos de las reivindicaciones adjuntas) se consideran en general como términos "abiertos" (por ejemplo, el término "incluye" debería interpretarse como "incluye pero no se limita a", el término "tiene" se debería interpretar como que "tiene al menos", el término "incluye" se debería interpretar como que "incluye pero no se limita a", etc.). Se debería entender adicionalmente por los expertos en la técnica que si se pretende enumerar un número específico de una Reivindicación introducida, tal como un intento se enumerará explícitamente en la Reivindicación, y la ausencia de dicha enumeración o dicho intento está presente. Por ejemplo, como ayuda para la comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de frases introductorias como "al menos uno" y "uno o más" para introducir las enumeraciones de la reivindicación. Sin embargo, el uso de dichas frases no se debería considerar que implican que la introducción de una enumeración en la reivindicación por los artículos indefinidos "un" o "una" limita cualquier

reivindicación particular que contiene dicha enumeración de la reivindicación introducida a las realizaciones que contienen solo una de dicha enumeración, incluso cuando la misma reivindicación incluye las frases introductoras “uno o más” o “al menos uno” y artículos indefinidos tales como “un” o “una” (por ejemplo, “un” y/o “una” se debería interpretar que significan “al menos uno” o “uno o más”); lo mismo sigue siendo cierto para el uso de los artículos definidos utilizados para introducir las enumeraciones de reivindicaciones. Además, incluso si se enumera un número específico de una reivindicación introducida, los expertos en la técnica reconocerán que dicha enumeración se debería interpretar para significar al menos el número enumerado (por ejemplo, la simple enumeración de “dos enumeraciones”, sin otros modificadores, significa al menos dos enumeraciones, o dos o más enumeraciones). Además, en algunos casos en los que se utiliza una convención análoga a “al menos uno de A, B, y C, etc.” se utiliza, en general dicha construcción se considera en el sentido que entendería un experto en la técnica por la convención (por ejemplo, un sistema que tiene al menos uno de A, B, y C” incluiría pero no se limitaría a los sistemas que tienen A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). En los casos en los que se utiliza una convención análoga a “al menos uno de A, B, o C, etc.”, en general dicha construcción se considera en el sentido que entendería un experto en la técnica como la convención (por ejemplo, “un sistema que tiene al menos uno de A, B, o C” incluiría pero no se limitaría a sistemas que tengan A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). Se debería entender adicionalmente por los expertos en la técnica que virtualmente cualquier palabra disyuntiva y/o frase que presenten dos o más términos alternativos, sea en la descripción, reivindicaciones o dibujos, se debería entender que contempla las posibilidades de incluir uno de los términos, cualquiera de los términos, o ambos términos. Por ejemplo, la frase “A o B” se entendería que incluyen las posibilidades de “A” o “B” o “A y B”.

Además, donde las características o aspectos de la divulgación se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la divulgación también se describe de esta manera en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los fines, tales como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos desvelados en el presente documento engloban también todos y cada uno de los subintervalos posibles y combinaciones de subintervalos del mismo. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como describe suficientemente y hace posible que el mismo intervalo se rompa en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como un ejemplo no limitante, cada intervalo expuesto en el presente documento se puede romper en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la técnica, cualquier expresión tal como “hasta”, “al menos”, y similares incluye el número enumerado y se refiere a intervalos que se pueden romper posteriormente en subintervalos como se ha expuesto anteriormente. Finalmente como entenderá un experto en la técnica, un intervalo incluye cada miembro individual. Por lo tanto, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, o 3 células. De manera similar, un grupo que tiene 1-5 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4, o 5 células y así.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kevin Thornton
Paul Madepogu
Danielle Koffenberger

<120> DETECCIÓN DE *NEISSERIA GONORRHOEA*

<130> GENOM.127WO

<150> 61/798757
<151> 15-03-2013

<160> 7

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
<400> 1
tacgtgtcgc gatgtggaa 19

<210> 2

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 2
 ttagcctttc tatgtcccta acatctc 27

10 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 3
 ctgggtggc aaacggagca a 21

25 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 4
 cctttccctg tcccttctg 20

35 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 5
 gtttgataa aggcttcgct g 21

45 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 6
 ccctcggaga gtcctcgac aaaa 24

55 <210> 7
 <211> 1400
 <212> ADN
 <213> *Neisseria gonorrhoeae*

60 <400> 7

ES 2 671 745 T3

```

gtccgaatct tgtcatgcac ttccatcctg ccctccaagg ttaattttca ccaactcaaac 60
aaccgtaacc ggtatcttca gttgatggtc ggatatttta aaaataaata atataacaca 120
atagtatfff gataaaaatt tacctaacga ggtacagaca tgtattcaga aaacaagcct 180
aaacgcaccg taaaaatgaa aaaatactgg cagcctgcac cctttccctg tccctttctg 240
cctgtacttc gactcaagta acttcttttg tcgagggact ctccgagga ctctgtagatg 300
tcagcgaagc ctttatcaca acaaaggcag aatcatattc tgccccgtct cttcaggata 360
agcaaatttt cataaatcgc gtctcagaac gagcacaana aaattacaaa gaaagaagga 420
aaaagaaaga agcagactta ctaaattcag catcgttatt aaatgaatca acatcagaag 480
ccctatctgc ccttaaaaac gctatcgtaa ttcctaaacg ccctaaacgc tccttgggca 540
aaaaatataa aaacggtttt catcctgtaa atacgtgtgc ggatgtgaa gctcgttggg 600
caaacggagc aatgagagat gttagggaca tagaaaggct aataagccga aacgtccctt 660
tacgtcgtat cggagacgcc attcaaaaca tgtgcatgga aaccaatgtg tcatttagga 720
tgtatcgcca ggagtgcogt tcagaatcgt cagattttta tgacgaaatg cttgagcctc 780
acgagaattt cataggatcc tccaaatcat tcgcatcctc acttcttccc cttagcgtta 840
caaactttac aacagacatg gcgtgtaact ccgaatttta atctaatac actccacaac 900
tcctatcaa tataactgct acttctctga gtagtatcaa ccaaccctta acaaaggact 960
aaaaaatgaa aaaagcactg cttgcactga ctattgcccg catctccggt actgctatgg 1020
cccagttgcc cgactttctg ggtaaaggcg aatataccgt ccgtacagac atctccaaac 1080
aaacgctgaa aatgcccgat ttgaaagaaa aacacaaagt acaaaaaaac atcggtttcc 1140
gtgcccgatat gcogtttgac gatattcacc acggcatgcg tttcgaagta tcacacagcc 1200
gagacaaaaa agacatgtac gttgtgaccg aaagtactac taaaccattc ggcaaagacg 1260
ttaaagaaaa acgcaccgac gtgtatgccc gttacaccta cactcaaccg atcagtgaag 1320
ccaccaaact gcgtgcccgt ttaggtttgg gctatgaaaa atacaaagat gcggtagcta 1380
atgagaaagg aacagtcagc

```

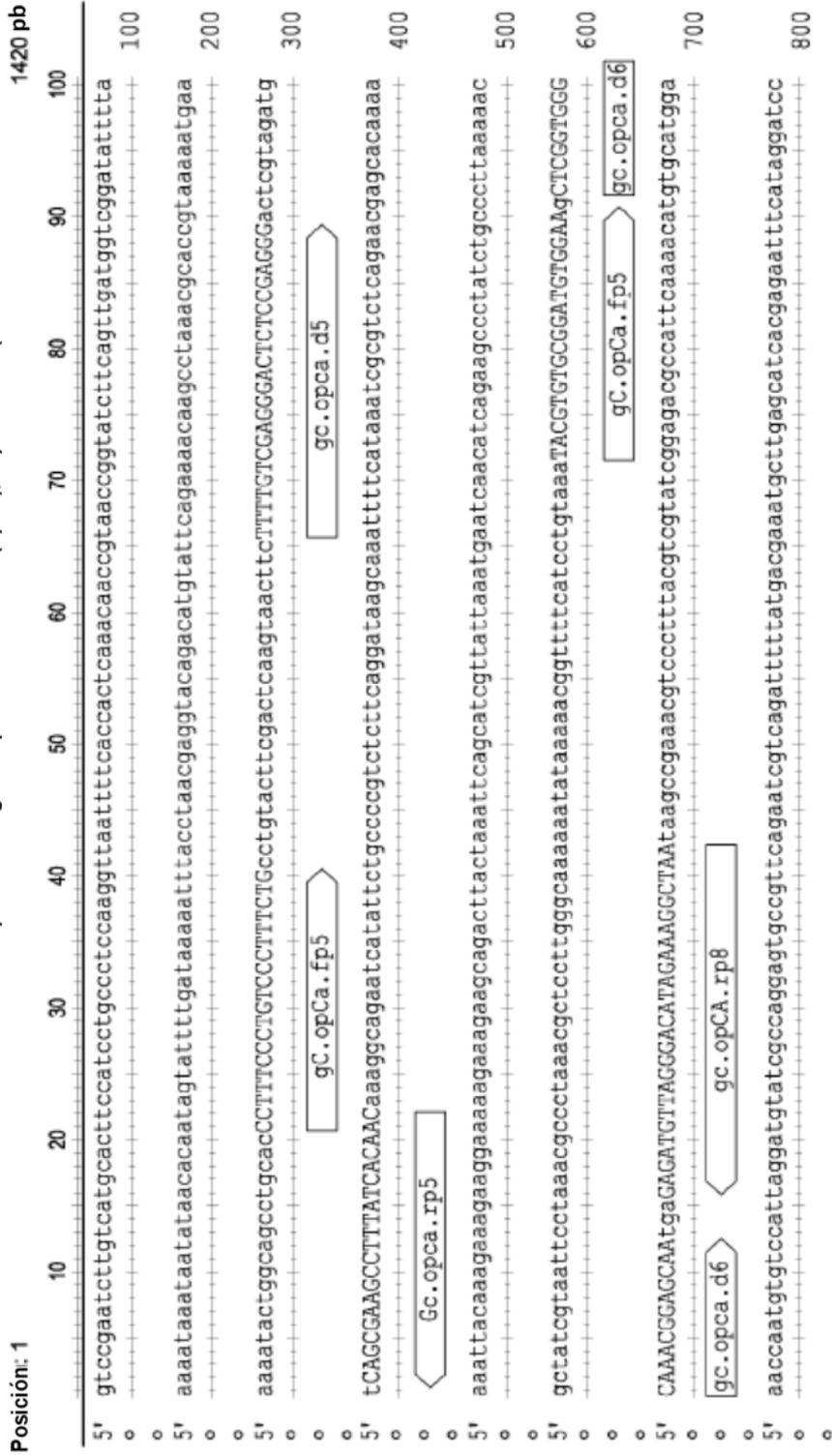
REIVINDICACIONES

1. Una sonda o cebador oligonucleotídicos de hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud que es capaz de hibridarse con el gen de las proteínas externas principales (*opcA*) de *Neisseria gonorrhoeae*, donde dicha sonda o
5 cebador comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6, o una secuencia que presenta al menos aproximadamente un 85 % de identidad respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6.
2. La sonda o cebador oligonucleotídicos de la Reivindicación 1, donde dicha sonda o cebador consiste en una
10 secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6, o una secuencia que presenta al menos aproximadamente un 85 % de identidad respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6.
3. La sonda o cebador oligonucleotídicos de la Reivindicación 1, donde dicha sonda o cebador consiste en una
15 secuencia que presenta al menos aproximadamente un 95 % de identidad respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6.
4. La sonda o cebador oligonucleotídicos de la Reivindicación 1, donde dicha sonda o cebador consiste en una
20 secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6.
5. Un método para determinar la presencia de una secuencia del gen de proteínas externas principales (*opcA*) de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra, que comprende:
- 25 poner en contacto dicha muestra biológica con al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen de proteínas externas principales (*opcA*) de *Neisseria gonorrhoeae*, donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5, o una secuencia que presenta al menos aproximadamente un 85 % de identidad respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5, y donde dicho al menos un
30 par de cebadores se configura para generar un amplicón de una secuencia de *opcA* en condiciones de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.
generar un amplicón de la secuencia *opcA* de dicha muestra biológica, si dicha muestra comprende *Neisseria gonorrhoeae*; y determinar la presencia o cantidad de uno o más productos amplificados como una indicación de la presencia de la secuencia *opcA* en dicha muestra biológica.
- 35 6. El método de la Reivindicación 5, donde dicha muestra biológica se pone en contacto con un par de cebadores seleccionados de entre el grupo de:
- 40 a) SEQ ID NO: 1 y 2; o
b) SEQ ID NO: 4 y 5.
7. El método de la Reivindicación 6, donde el par de cebadores es:
las SEQ ID NO: 1 y 2
- 45 8. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 7, donde dicha amplificación se lleva a cabo utilizando un método seleccionado de entre el grupo que consiste en una reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por replicasa, Inmuno-amplificación, amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación en círculo rodante, y
50 amplificación mediada por transcripción (TMA).
9. El método de la Reivindicación 8, donde dicha PCR es una PCR en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR).
10. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 9, donde cada cebador comprende una secuencia de
55 nucleótidos exógena que permite la modificación después de la amplificación de los productos de amplificación sin un efecto significativo sobre la propia amplificación.
11. Una composición para la detección de *Neisseria gonorrhoeae*, donde dicha composición comprende:
- 60 un primer y segundo cebadores de amplificación que se hibridan específicamente a la secuencia del gen de proteínas externas principales (*opcA*) de *Neisseria gonorrhoeae* o la complementaria del mismo, donde el primer y segundo cebador de amplificación tienen aproximadamente de 10 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, donde dichos primer y segundo cebadores de amplificación comprenden una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 85 % de identidad de SEQ ID NO: 1, 2, 4, o 5 y donde el *opcA* tiene la secuencia de
65 nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

ES 2 671 745 T3

12. La composición de la Reivindicación 11, que comprende adicionalmente una sonda, donde dicha sonda se hibrida específicamente a un amplicón del opcA.
- 5 13. La composición de la Reivindicación 12, donde la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o 6, o una secuencia que presenta al menos aproximadamente un 85 % de identidad con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 3 o 6.
14. La composición de la Reivindicación 12, donde la sonda tiene una secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6.
- 10 15. La composición de la Reivindicación 12, donde dicha sonda comprende un resto emisor de fluorescencia y un resto interruptor de fluorescencia.
- 15 16. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 15, donde dichos primero y segundo cebadores de amplificación comprenden una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad respecto a las SEQ ID NO: 1, 2, 4, o 5.
17. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 15, donde dichos primer y segundo cebadores comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1, 2, 4, o 5.
- 20 18. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 15, donde dichos primer y segundo cebadores de amplificación consisten en una secuencia de SEQ ID NO: 1, 2, 4, o 5.
19. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 15, donde dichos primer y segundo cebadores de amplificación son un par de cebadores seleccionado de entre el grupo de:
- 25 a) SEQ ID NO: 1 y 2; o
b) SEQ ID NO: 4 y 5.
- 30 20. La composición de una cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 15, donde dichos primer y segundo cebadores de amplificación son un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 2.

FIG. 1A Localizaciones del cebador opca-6 en el gen de proteínas externas (opcA), cepa FA1090 (GenBank AJ242839)



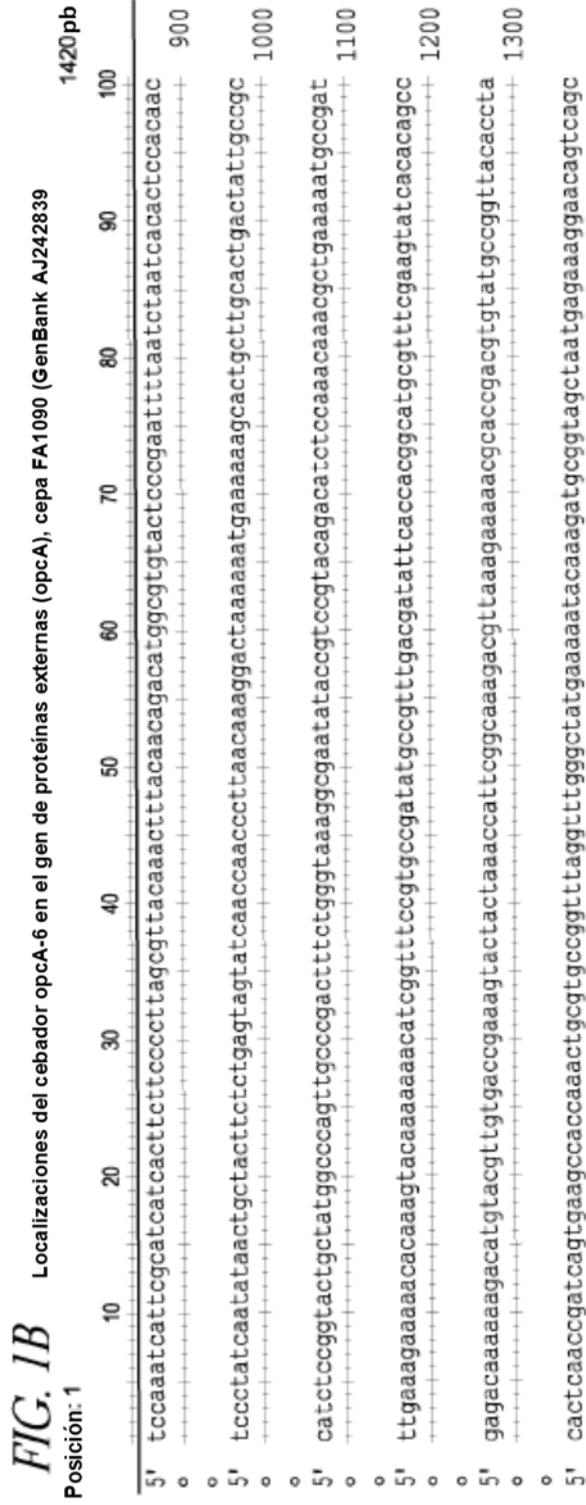


FIG. 1

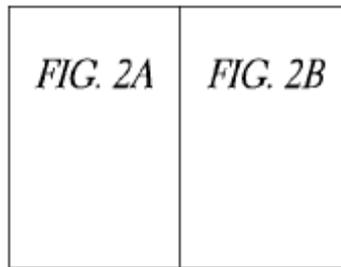


FIG. 2

ES 2 671 745 T3

FIG. 2A

Ensayo de especificidad de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>			
Muestra nº	Organismo	Cepa/nº de ATCC	Resultados
1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	53421	+
2	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	53424	+
3	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CHD5	+
4	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NGC0193	+
5	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NGC115	+
6	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NGC5	+
7	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NGC6	+
8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	700717	+
9	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	700718	+
10	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	19424	+
11	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	53425	+
12	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	10150	+
13	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43069	+
14	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	53423	+
15	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	23051	+
16	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	27628	+
17	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	27629	+
18	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	27633	+
19	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	31151	+
20	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	31397	+
21	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	31407	+
22	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	31953	+
23	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	53420	+
24	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	53422	+
25	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6016178	+
26	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	728SPR	+
27	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CLGJ4	+
28	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IU2254	+
29	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IU2265	+
30	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IU2266	+
31	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	TC548	+
32	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IU2273	+
33	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IU24929	+
34	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IU330576	+
35	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDSWE8658	+
36	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDAR13	+

ES 2 671 745 T3

FIG. 2B

Ensayo de especificidad de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>			
Muestra nº	Organismo	Cepa/nº de ATCC	Resultados
37	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDAR150	+
38	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDRGC3	+
39	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDRGC6	+
40	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDRGC9	+
41	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDRGC12	+
42	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDRGC13	+
43	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDF28	+
44	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	UCLA537	+
45	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BD4-11	+
46	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BD4-18	+
47	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	UCLA949	+
48	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	UCLA969	+
49	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	UCLA1020	+
50	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BD9	+
51	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BD15	+
52	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	35542	+
53	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BD7	+
54	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	27632	+
55	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	27631	+
56	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	35201	+
57	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	35541	+
58	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	27630	+
59	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	D4-05	+
60	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	D4-11	+
61	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	D4-17	+
62	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	D4-08	+
63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDF18	+
64	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDF45	+
65	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BD8658	+
66	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BD86-36238	+
67	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	MAY04844	+
68	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	MHD2900	+
69	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	WH03	+
70	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	WH05	+
71	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	WH07	+
72	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	UCLA493	+

FIG. 3 A

Ensayo de especificidad de Neisseria no gonorreica (GC-opcA- 6)		
Organismo	Cepas ensayadas	Nº de reacciones cruzadas
Branhamella catarrhalis	1	0
Neisseria cinerea	6	0
Neisseria elongata	1	0
Neisseria flava	2	0
Neisseria flavescens	3	0
Neisseria lactamica	9	0
Neisseria meningitidis	9	0
Neisseria meningitidis A	1	0
Neisseria meningitidis B	1	0
Neisseria meningitidis C	4	0
Neisseria meningitidis D	1	0
Neisseria meningitidis Y	1	0
Neisseria meningitidis W135	1	0
Neisseria mucosa	3	0
Neisseria perflava	1	0
Neisseria polysaccharea	1	0
Neisseria sicca	3	0
Neisseria subflava	14	0
Neisseria weaverii	1	0

FIG. 3B

Ensayo de especificidad de Neisseria no gonorreica (GC-opcA- 6)		
Organismo	Cepas ensayadas	Nº de reacciones cruzadas
Neisseria gonorrhoeae	SÍ	SÍ
Branhamella catarrhalis	NO	NO
Neisseria cinerea	SÍ	NO
Neisseria elongata	NO	NO
Neisseria flava	NO	NO
Neisseria flavescens	NO	NO
Neisseria lactamica	SÍ	NO
Neisseria meningitidis	NO	NO
Neisseria meningitidis A	NO	NO
Neisseria meningitidis B	NO	NO
Neisseria meningitidis C	NO	NO
Neisseria meningitidis D	NO	NO
Neisseria meningitidis Y	NO	NO
Neisseria meningitidis W135	NO	NO
Neisseria mucosa	NO	NO
Neisseria perflava	NO	NO
Neisseria polysaccharea	NO	NO
Neisseria sicca	SÍ	NO
Neisseria subflava	NO	NO
Neisseria weaverii	NO	NO

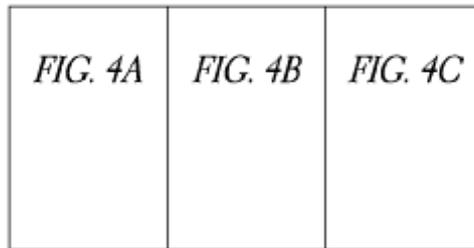


FIG. 4

ES 2 671 745 T3

FIG. 4A

Panel Vaginal		
Muestra nº	Organismo	Resultados
1	Rahnella aquatilis	-
2	Enterobacter aerogenes	-
3	Campylobacter coli	-
4	Eikenella corrodens	-
5	Chromobacterium violaceum	-
6	Agrobacterium radiobacter	-
7	Escherichia coli	-
8	Proteus vulgaris	-
9	Acinetobacter baumannii	-
10	Klebsiella oxytoca	-
11	Kingella dentrificans	-
12	Erysipelothrix rhusiopathiae	-
13	Actinomyces pyogenes	-
14	Corynebacterium genitalium biovar1	-
15	Aerococcus viridans	-
16	Streptococcus sanguis	-
17	Streptococcus salivarius	-
18	Staphylococcus saprophyticus	-
19	Listeria monocytogenes	-
20	Enterococcus avium	-
21	Crytococcus neoformans	-
22	Enterococcus faecalis	-
23	Enterococcus faecium	-
24	Klebsiella ozaeneae	-
25	Proteus mirabilis	-
26	Salmonella cholerasuis	-
27	Salmonella typhimurium	-
28	Staphylococcus aureus, no productor de proteína A	-
29	Staphylococcus aureus, no productor de proteína A	-
30	Staphylococcus epidermidis	-
31	Staphylococcus epidermidis	-
32	Streptococcus pyofenes (Grupo A)	-
33	Streptococcus mitis	-
34	Streptococcus mitis	-
35	Streptococcus mutans	-
36	Streptococcus pneumoniae	-
37	Streptomyces griseus	-
38	Vibrio parahaemolyticus	-
39	Yersinia enterocolitica	-
40	Acinetobacter calcoaceticus	-

FIG. 4B

Panel Vaginal		
Muestra nº	Organismo	Resultados
41	Acinetobacter lwoffii	-
42	Aeromonas hydrophilia	-
43	Alcaligenes faecalis	-
44	Bacillus subtilis	-
45	Candida albicans	-
46	Candida glabrata	-
47	Candida tropicalis	-
48	Citrobacter freundii	-
49	Corynebacterium renale	-
50	Edwardsiella tarda	-
51	Enterobacter cloacae	-
52	Flavobacterium meningosepticum	-
53	Gemella haemolysans	-
54	Haemophilus influenzae	-
55	Kingella kingae	-
56	Lactobacillus jensenii	-
57	Moraxella osloensis	-
58	Moraxella osloensis	-
59	Morganella morganii	-
60	Plesiomonas shigelloides	-
61	Providencia stuartii	-
62	Rhodococcus equi	-
63	Salmonella minnesota	-
64	Escherichia coli	-
65	Klebsiella pneumoniae	-
66	Streptococcus agalactiae (Group B)	-
67	Acinetobacter calcoaceticus	-
68	Candida glabrata	-
69	Gardnerella vaginalis	-
70	Serratia marcescens	-
71	Streptococcus bovis	-
72	Corynebacterium xerosis	-
73	Peptostreptococcus anaerobius	-
74	E coli HPV 6	-
75	E coli HPV 11	-
76	E coli HPV 16	-
77	E coli HPV 18	-
78	Veillonella parvula	-
79	Clostridium perfringens	-
80	Lactobacillus acidophilus	-

ES 2 671 745 T3

FIG. 4C

Panel Vaginal		
Muestra nº	Organismo	Resultados
81	Bacteroides fragilis	-
82	Peptostreptococcus anaerobius	-
83	Pseudomonas aeruginosa	-
84	Peptostreptococcus productus	-
85	Propionibacterium acnes	-
86	Pseudomonas fluorescens	-
87	Pseudomonas putida	-
88	Candida parapsilosis	-
89	Legionella pneumophila	-
90	Mycobacterium smegmatis	-
91	Campylobacter jejuni	-
92	Mobiluncus mulieris	-
93	Actinomyces israelii	-
94	Lactobacillus brevis	-
95	Bifidobacterium adolescentis	-
96	Clostridium difficile	-
97	Atopobium vaginae	-
98	Anaerococcus vaginalis	-
99	Bifidobacterium infantis	-
100	Bifidobacterium brevis	-
101	Saccharomyces cerevisiae	-
102	Micrococcus leutus	-
103	Leuconostoc paramensenteroides	-
104	Lactobacillus vaginalis	-
105	Bifidobacterium infantis	-
106	Bifidobacterium brevis	-
107	Saccharomyces cerevisiae	-
108	Micrococcus leutus	-
109	Leuconostoc paramensenteroides	-
110	Lactobacillus vaginalis	-
111	Bifidobacterium bifidum	-
112	Mobiluncus curtisii	-
113	Peptostreptococcus asaccharolyticus	-
114	Bacteroides ureolyticum	-
115	Achromobacter xerosis	-
116	Lactobacillus iners	-

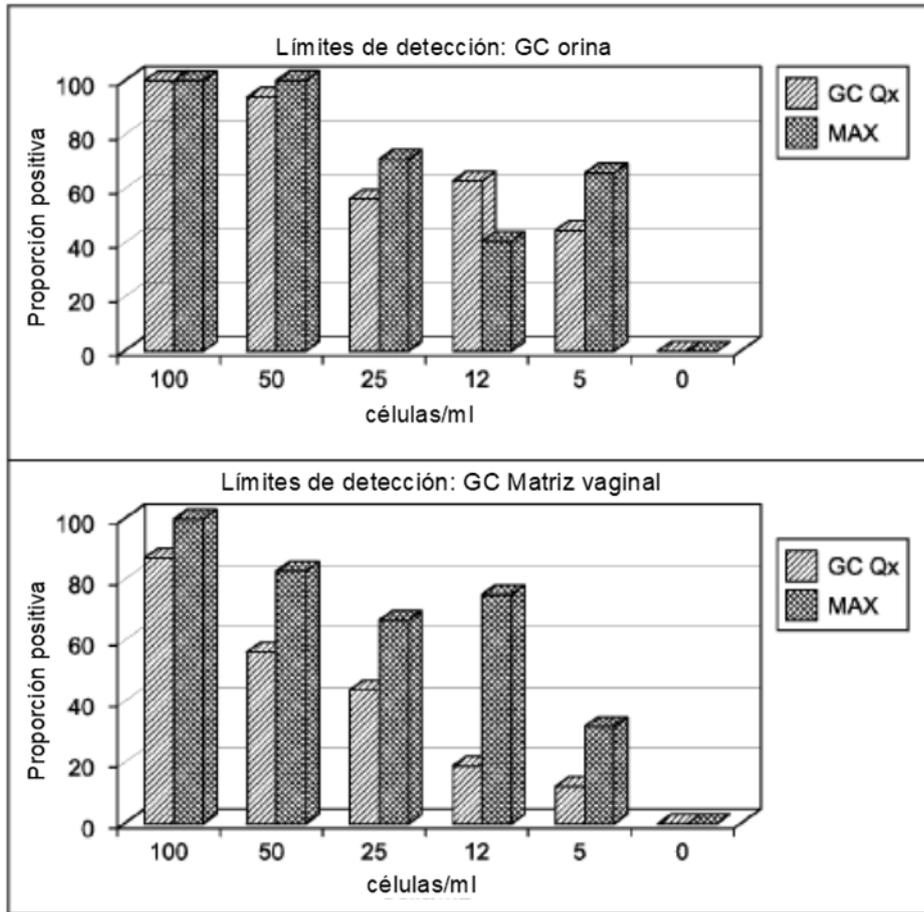


FIG. 5