

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 810**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2016 PCT/US2016/028433**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16172204**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2016 E 16783760 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2023 EP 3286323**

54 Título: **Detección múltiple de la vaginosis bacteriana**

30 Prioridad:

24.04.2015 US 201562152754 P
15.01.2016 US 201662279220 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PAQUETTE, NANCY;
TREMBLAY, MARIE-HELENE;
TREMBLAY, SIMON;
TERRIEN, ROSELINE;
FORTIN, MARIE-CHRISTINE;
BELLEY-MONTFORT, LUCILE;
CANTIN, DANY y
ROGER-DALBERT, CELINE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 939 810 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 múltiple de la vaginosis bacteriana

5 Referencia al listado de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado SEQLISTING_GENOM.143WO.TXT, creado el 20 de abril de 2016, que tiene un tamaño de 36 Kb. La información en el formato electrónico del listado de secuencias se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

Antecedentes

Campo

La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para la detección de trastornos vaginales, por ejemplo, candidosis vulvovaginal (CVV), tricomoniasis y vaginosis bacteriana (VB). De manera más específica, la presente divulgación se refiere a la detección de especies de *Candida* asociadas a la CVV, de *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) y de una pluralidad de bacterias relacionadas con la VB en ejemplos biológicos, tales como muestras de hisopos vaginales de mujeres con síntomas clínicos de vaginitis y/o vaginosis, mediante métodos de prueba basados en ácidos nucleicos.

Descripción de la técnica relacionada

Candida es un género de levadura y es la causa más común de infecciones fúngicas en todo el mundo. Muchas especies de *Candida* se encuentran como un comensal inofensivo, forman parte de la flora normal de un hospedador y pueden ser endosimbiontes de hospedadores, incluidos los seres humanos. Sin embargo, en el caso de un desequilibrio o de un hospedador inmunodeprimido, se sabe que *Candida* invade y provoca enfermedades. Se sabe que algunas especies de *Candida*, tales como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, y *C. glabrata*, están asociadas con la candidosis vulvovaginal (CVV). *Trichomonas vaginalis* es parásito protozoario anaerobio flagelado, que es el microorganismo causal de la tricomoniasis. La vaginosis bacteriana (VB) es una infección de la vagina provocada por una alteración del equilibrio normal de las bacterias en la vagina.

Hasta la fecha, las pruebas convencionales para diagnosticar la CVV, la tricomoniasis y la VB se basan en múltiples métodos subjetivos que son métodos interpretativos. En general, estas pruebas implican el examen microscópico de la preparación en húmedo de muestras de pacientes (por ejemplo, flujo vaginal), incluida la observación de hifas fúngicas o levaduras en ciernes para la CVV y la observación de tricomonas móviles para la tricomoniasis. La puntuación de Nugent y los criterios de Amsel son las pruebas más utilizadas para diagnosticar la VB. La puntuación de Nugent es un sistema de puntuación de tinción de Gram que se calcula mediante la evaluación de la presencia de bacilos grampositivos grandes (morfotipos de *Lactobacillus*), bacilos gramvariables pequeños (morfotipos de *Gardnerella vaginalis*) y bacilos gramvariables curvos (morfotipos de *Mobiluncus* spp.). Los criterios de Amsel requieren que al menos tres de los cuatro criterios siguientes estén presentes para un diagnóstico confirmado: (1) flujo escaso, blanco, amarillo y homogéneo, (2) células clave de la vaginosis en la microscopía, (3) pH del líquido vaginal >4,5 y (4) liberación de un olor a pescado al añadir una solución alcalina de hidróxido de potasio (KOH) al 10 %. Estas pruebas convencionales pueden ser costosas, laboriosas y lentas, por ejemplo, *Candida* debe cultivarse durante 48 horas en medios cromogénicos o hasta 7 días en medios menos selectivos antes de que se pueda hacer un diagnóstico. Cartwright *et al.* (J. Clin. Microbiol. 50 (2012), 2321-2329) describe ensayos de PCR múltiples para detectar la VB basados en una combinación de diferentes organismos indicadores que incluyen *A. vaginae*, *BVAB-2*, *G. vaginalis*, *Megasphaera* y *L. crispatus*.

Sin embargo, aún existe la necesidad de desarrollar métodos más eficaces y rápidos para detectar la candidosis vulvovaginal, la tricomoniasis y la vaginosis bacteriana, por ejemplo, un método que permita la detección de los tres trastornos vaginales en un solo ensayo, con el fin de ofrecer tratamientos adecuados a los pacientes.

55 Sumario

Esta necesidad se aborda mediante la provisión de la materia objeto como se define en las reivindicaciones.

Por lo tanto, en un aspecto se divulga un método para detectar *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2* en una muestra biológica que comprende:

poner en contacto dicha muestra biológica con una pluralidad de pares de cebadores, en donde la pluralidad de pares de cebadores comprende:

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una

secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 14 o a la SEQ ID NO: 15,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *BVAB2*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 4 o a la SEQ ID NO: 5, al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 7 o a la SEQ ID NO: 8,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *Gardnerella vaginalis*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12 o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12, y

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 1 o a la SEQ ID NO: 2;

generar amplicones de las secuencias del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, *BVAB2*, *Megasphaera* de tipo 1, y/o *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii*, y/o amplicones de la secuencia del gen *vly* de *Gardnerella vaginalis* de dicha muestra biológica, si dicha muestra comprende uno o más de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2a*; y

determinar la presencia o la cantidad de uno o más productos amplificados como indicación de la presencia de uno o más de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2* en dicha muestra biológica.

En algunas realizaciones, la etapa de "poner en contacto" comprende además poner en contacto dicha muestra biológica y dichos cebadores con ADN polimerasa, una pluralidad de nucleótidos libres que comprenden adenina, timina, citosina y guanina, y/o un tampón para producir una mezcla de reacción. Los ácidos nucleicos extraídos de la muestra biológica pueden comprender o consistir en ADN bicatenario. De manera opcional, una mezcla de reacción puede contener además cationes biovalentes, iones potasio de catión monovalente, una o más sondas marcadas detectables y/o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la etapa de "generar amplicones" implica (a) calentar la mezcla de reacción a una primera temperatura predeterminada durante un primer período de tiempo predeterminado para separar las cadenas de ADN bicatenario presentes en la muestra biológica o en los ácidos nucleicos, (b) enfriar la mezcla de reacción a una segunda temperatura predeterminada durante un segundo período de tiempo predeterminado en condiciones que permitan que los cebadores se hibriden con sus secuencias complementarias y permitan que la ADN polimerasa extienda los cebadores, y (c) repetir las etapas (a) y (b) al menos 10 a 12 veces. En algunas realizaciones, las etapas (a) y (b) se repiten al menos 15, 20, 22 o 25 veces.

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 ADN, ARN o ácidos nucleicos totales extraídos de una muestra clínica.

La pluralidad de pares de cebadores puede comprender un primer cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1, un segundo cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2, un tercer cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 4, un cuarto cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 5, un quinto cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7, un sexto cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8, un séptimo cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10, un octavo cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 11, un noveno cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12, un décimo cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14 y un undécimo cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones, el par de cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii* son las SEQ ID NO: 1 y 2; el par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *BVAB2* son las SEQ ID NO: 4 y 5; el par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1 son las SEQ ID NO: 7 y 8; el par de cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *Gardnerella vaginalis* son: a) las SEQ ID NO: 10 y 12 o b) las SEQ ID NO: 11 y 12; y el par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae* son las SEQ ID NO: 1 y 2.

En algunas realizaciones, la amplificación se lleva a cabo utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por replicasa, inmunoamplificación, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación de círculo rodante y amplificación mediada por transcripción (TMA). Por ejemplo, la PCR puede ser PCR en tiempo real. En algunas realizaciones, la PCR es PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-

PCR). En algunas realizaciones, cada cebador comprende una secuencia de nucleótidos exógena que permite una manipulación posterior a la amplificación de los productos de amplificación sin un efecto significativo sobre la propia amplificación. En algunas realizaciones, cada cebador está flanqueado por secuencias complementarias que comprenden un fluoróforo en el extremo 5' y un inactivador de fluorescencia en el extremo 3'.

En algunas realizaciones, determinar la presencia o la cantidad de uno o más productos amplificados comprende poner en contacto los productos amplificados con una pluralidad de sondas oligonucleotídicas, en donde cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16. En algunas realizaciones, cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16. En algunas realizaciones, al menos una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende una fracción emisora de fluorescencia y una fracción inactivadora de fluorescencia.

La presente divulgación también proporciona una composición para la detección de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2 que comprende:

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 14 o a la SEQ ID NO: 15,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de BVAB2, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 4 o a la SEQ ID NO: 5,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 7 o a la SEQ ID NO: 8,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *Gardnerella vaginalis*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12 o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12, y

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 1 o a la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii* comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2; el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de BVAB2a comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 4 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 5; el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1 comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8; el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *Gardnerella vaginalis* comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 11; y el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae* comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15.

La composición puede, en algunas realizaciones, comprender además una pluralidad de sondas oligonucleotídicas, en donde cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16. En algunas realizaciones, cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16. En algunas realizaciones, al menos una de la pluralidad de sondas comprende una fracción emisora de fluorescencia y una fracción inactivadora de fluorescencia.

Descripción detallada

Los títulos de las secciones que se utilizan en el presente documento solo tienen una finalidad organizativa y no deben interpretarse como limitantes de la materia descrita. En el caso de que uno o más de los materiales bibliográficos y similares citados definan o utilicen un término de tal manera que contradiga la definición de ese término en esta solicitud, la presente solicitud será la determinante. Aunque las presentes enseñanzas se describen junto con diversas realizaciones, no se pretende que las presentes enseñanzas estén limitadas a dichas realizaciones. Por el contrario, las presentes enseñanzas abarcan varias alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán los expertos en la materia.

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, un "ácido nucleico" se refiere a un compuesto polimérico que comprende nucleósidos o análogos de nucleósidos que tienen bases heterocíclicas nitrogenadas, o análogos de bases, unidas entre sí por enlaces de la cadena principal del ácido nucleico (por ejemplo, enlaces fosfodiéster) para formar un polinucleótido. Los ejemplos no limitantes de ácido nucleico incluyen ARN, ADN y análogos de los mismos. La cadena principal del ácido nucleico puede incluir una variedad de enlaces, por ejemplo, uno o más de los enlaces azúcar-fosfodiéster, enlaces péptido-ácido nucleico, enlaces fosforotioato o metilfosfonato o mezclas de dichos enlaces en un único oligonucleótido. Las fracciones de azúcar en el ácido nucleico pueden ser ribosa o desoxirribosa, o compuestos similares con sustituciones conocidas. Se incluyen en el término ácido nucleico las bases nitrogenadas convencionales (por ejemplo, A, G, C, T y U), los análogos de bases conocidas (por ejemplo, inosina), los derivados de bases de purina o pirimidina y los restos "abásicos" (es decir, sin base nitrogenada para una o más posiciones de la cadena principal). Es decir, un ácido nucleico puede incluir solo azúcares convencionales, bases y enlaces que se encuentran en el ARN y el ADN, o incluyen componentes y sustituciones convencionales (por ejemplo, bases y análogos convencionales unidos a través de una cadena principal de metoxi, o bases convencionales y uno o más análogos de bases unidos a través de una cadena principal de ARN o ADN).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ácidos nucleicos aislados" se refiere a la purificación de ácidos nucleicos a partir de uno o más componentes celulares. Un experto en la materia apreciará que las muestras procesadas para "aislar los ácidos nucleicos" de las mismas pueden incluir componentes e impurezas distintas de los ácidos nucleicos. Las muestras que comprenden ácidos nucleicos aislados se pueden preparar a partir de muestras utilizando cualquier método aceptable conocido en la materia. Por ejemplo, las células se pueden lisar mediante agentes de lisis conocidos, y los ácidos nucleicos se pueden purificar total o parcialmente a partir de otros componentes celulares. Los reactivos y protocolos adecuados para las extracciones de ADN y ARN se pueden encontrar en, por ejemplo, las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos n.º US 2010-0009351 y US 2009-0131650, respectivamente (cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). En las pruebas de ácidos nucleicos (por ejemplo, los métodos de amplificación e hibridación que se analizan con más detalle a continuación), la solución de ácido nucleico extraída se puede añadir directamente a un reactivo (por ejemplo, ya sea en líquido, unido a un sustrato, en forma liofilizada, o similar, como se analiza con más detalle a continuación), necesario para realizar una prueba de acuerdo con las realizaciones divulgadas en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, "plantilla" se refiere a todo o parte de un polinucleótido que contiene al menos una secuencia de nucleótidos diana.

Como se utiliza en el presente documento, un "cebador" se refiere a un polinucleótido que puede servir para iniciar una reacción de extensión de la cadena del ácido nucleico. La longitud de un cebador puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. La longitud de un cebador puede ser de aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 35 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 75 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, 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. En algunas realizaciones, el cebador tiene una longitud de 18 a 32 nucleótidos.

Como se utiliza en el presente documento, una "sonda" se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse (por ejemplo, de manera específica) con una secuencia diana en un ácido nucleico, en condiciones que permitan la hibridación, permitiendo así la detección de la secuencia diana o del ácido nucleico amplificado. En general, la "diana" de una sonda se refiere a una secuencia dentro o un subconjunto de una secuencia de ácido nucleico amplificada que se hibrida de manera específica con al menos una parte de un oligómero de sonda mediante enlaces de hidrógeno convencionales (es decir, emparejamiento de bases). Una sonda puede comprender secuencias específicas de diana y otras secuencias que contribuyen a la conformación tridimensional de la sonda. Las secuencias son "suficientemente complementarias" si permiten una hibridación estable en condiciones de hibridación adecuadas de un oligómero de sonda con una secuencia diana que no es completamente complementaria a la secuencia específica de diana de la sonda. La longitud de una sonda puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. La longitud de una sonda puede ser de aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 35 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la sonda tiene una longitud de 10 a aproximadamente 50 nucleótidos. Por ejemplo, los cebadores y/o las sondas pueden tener al menos 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 ser no específica de secuencia.

Preferentemente, los cebadores y/o las sondas pueden tener entre 8 y 45 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, los cebadores y/o sondas pueden tener al menos 8, 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. El cebador y la sonda se pueden modificar para que contengan nucleótidos adicionales en el extremo 5' o 3', o en ambos. Un experto en la materia apreciará que las bases adicionales al extremo 3' de los cebadores de amplificación (no necesariamente las sondas) son generalmente complementarias a la secuencia molde. Las secuencias del cebador y de la sonda también se pueden modificar para eliminar los nucleótidos en el extremo 5' o 3'. Un experto en la materia apreciará que para que funcionen para la amplificación, los cebadores o las sondas tendrán una longitud mínima y una temperatura de hibridación como las divulgadas en el presente documento.

Los cebadores y las sondas pueden unirse a sus dianas a una temperatura de hibridación que es una temperatura menor que la temperatura de fusión (T_f). Como se utiliza en el presente documento, " T_f " y "temperatura de fusión" son términos intercambiables que se refieren a la temperatura a la que el 50 % de una población de moléculas polinucleotídicas bicatenarias se disocia en cadenas sencillas. Las fórmulas para calcular la T_f de los polinucleótidos son bien conocidas en la materia. Por ejemplo, la T_f puede calcularse mediante la siguiente ecuación: $T_f = 69,3 + 0,41 \times (G + C)\% - 6 - 50/L$, donde L es la longitud de la sonda en nucleótidos. La T_f de un polinucleótido híbrido también se puede estimar mediante una fórmula adoptada de ensayos de hibridación en sal 1 M y normalmente utilizada para calcular la T_f para cebadores de PCR: $[(\text{número de A} + \text{T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{número de G} + \text{C}) \times 4^\circ\text{C}]$. Véase, por ejemplo, C. R. Newton *et al.* PCR, 2.^a ed., Springer-Verlag (Nueva York: 1997), pág. 24. Existen en la materia otros cálculos más sofisticados, que tienen en cuenta las características estructurales y de secuencia para el cálculo de la T_f . La temperatura de fusión de un oligonucleótido puede depender de la complementariedad entre el cebador o la sonda oligonucleotídica y la secuencia de unión, y de las condiciones de la sal. En algunas realizaciones, una sonda o cebador oligonucleotídico proporcionado en el presente documento tiene una T_f inferior a aproximadamente 90 °C en tampón KCl 50 mM y Tris-HCl 10 mM, por ejemplo, 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 inferior, incluidos los intervalos entre dos cualesquiera de los valores enumerados.

En algunas realizaciones, los cebadores divulgados en el presente documento, por ejemplo, los cebadores de amplificación, se pueden proporcionar como un par de cebadores de amplificación, por ejemplo, que comprende un cebador directo y un cebador inverso (primer cebador de amplificación y segundo cebador de amplificación). Preferentemente, los cebadores directo e inverso tienen unas T_f que no difieren en más de 10 °C, por ejemplo, que difieren en menos de 10 °C, en menos de 9 °C, en menos de 8 °C, en menos de 7 °C, en menos de 6 °C, en menos de 5 °C, en menos de 4 °C, en menos de 3 °C, en menos de 2 °C o en menos de 1 °C.

Las secuencias del cebador y de la sonda pueden modificarse mediante sustituciones de nucleótidos (con respecto a la secuencia diana) dentro de la secuencia oligonucleotídica, siempre que el oligonucleótido contenga suficiente complementariedad para hibridarse de manera específica con la secuencia de ácido nucleico diana. De este modo, 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 secuencias entre regiones de dos cadenas polinucleotídicas o entre dos regiones de la misma cadena polinucleotídica. Una primera región de un polinucleótido es complementaria a una segunda región del mismo polinucleótido o de uno diferente si, cuando las dos regiones están dispuestas en forma antiparalela, al menos un nucleótido de la primera región es capaz de emparejarse con una base de la segunda región. Por lo tanto, no se necesita que dos polinucleótidos complementarios se emparejen en cada posición nucleotídica. "Totalmente complementario" se refiere a un primer polinucleótido que es 100 % o "totalmente" complementario a un segundo polinucleótido y, por lo tanto, forma un par de bases en cada posición de nucleótido. "Parcialmente complementario" también se refiere a un primer polinucleótido que no es 100 % complementario (por ejemplo, 90 %, u 80 % o 70 % complementarios) y que contiene nucleótidos no emparejados en una o más posiciones nucleotídicas. En algunas realizaciones, un oligonucleótido incluye una base universal.

Como se utiliza en el presente documento, una "secuencia de nucleótidos exógena" se refiere a una secuencia introducida por cebadores o sondas utilizadas para la amplificación, de manera que los productos de amplificación contendrán una secuencia de nucleótidos exógena y una secuencia de nucleótidos diana en una disposición que no se encuentra en la plantilla original a partir de la cual se copió la secuencia de nucleótidos diana.

Como se utiliza en el presente documento, "identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad", tal 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 candidata que son idénticos a una secuencia de molécula de ácido nucleico en cuestión, después de alinear las secuencias para lograr el máximo porcentaje de identidad, y sin considerar ninguna sustitución de restos de ácido nucleico como parte de la identidad de la secuencia. La identidad de la secuencia de ácido nucleico se puede determinar mediante cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, CLUSTALW, T-COFFEE y BLASTN.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "suficientemente complementario" se refiere a una secuencia de bases de ácido nucleico contiguas que es capaz de hibridarse con otra secuencia de bases mediante puentes de hidrógeno entre una serie de bases complementarias. Las secuencias de bases complementarias pueden ser

complementarias en cada posición de la secuencia del oligómero mediante el uso de emparejamiento de bases convencional (por ejemplo, G:C, A:T o A:U) o pueden contener uno o más restos que no son complementarios (incluidas las posiciones abásicas), pero en la que la secuencia de bases complementaria completa es capaz de hibridarse de manera específica 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 % complementarias a una secuencia con la que se pretende hibridar un oligómero. Las secuencias sustancialmente complementarias pueden referirse a secuencias que varían en porcentaje de identidad del 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 valor intermedio, en comparación con la secuencia de referencia. Un experto en la materia puede elegir fácilmente las condiciones de hibridación adecuadas que pueden predecirse en función de la composición de la secuencia de bases, o determinarse mediante el uso de pruebas de rutina (véase, por ejemplo, Green y Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4.^a ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "PCR múltiple" se refiere a un tipo de PCR en la que se incluye más de un conjunto de cebadores en una reacción que permite amplificar una sola diana o dos o más dianas diferentes en un solo tubo de reacción. La PCR múltiple puede ser, por ejemplo, PCR en tiempo real.

Oligonucleótidos y composiciones que los contienen

Como se describe en el presente documento, se pueden realizar amplificaciones de ácidos nucleicos para determinar la presencia, la ausencia y/o el nivel de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2 en una muestra. En algunas realizaciones, la presencia, la ausencia y/o el nivel de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2 se determina mediante la detección de uno o más genes diana de cada uno de los organismos diana mediante métodos conocidos en la materia, tales como amplificaciones de ADN. En algunas realizaciones, se puede realizar una PCR múltiple para detectar la presencia, la ausencia o el nivel para cada uno de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2.

Cada uno de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2 se puede detectar mediante canales separados en amplificaciones de ADN. En algunos casos, puede ser deseable utilizar un solo canal de fluorescencia para detectar la presencia, la ausencia y/o el nivel de dos o más de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2. Por ejemplo, se puede utilizar un solo canal de fluorescencia para detectar la presencia, la ausencia y/o el nivel de dos de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2 (por ejemplo, BVAB-2 y *Megasphaera*-1). Dicha combinación puede, en algunas realizaciones, reducir la cantidad de reactivo necesario para realizar el experimento y proporcionar una métrica cualitativa precisa sobre la cual se puede evaluar una determinación de la VB. Sin quedar ligados a ninguna teoría particular, se cree que el uso de marcadores combinados puede aumentar la sensibilidad y la especificidad del ensayo. En algunas realizaciones, se utilizan canales de fluorescencia separados para detectar la presencia, la ausencia y/o el nivel de cada uno de *Lactobacillus* spp. (por ejemplo *L. crispatus* y *L. jensenii*), *G. vaginalis*, y *Atopobium vaginae*, y se utiliza un solo canal de fluorescencia para detectar la presencia, la ausencia y/o el nivel de BVAB-2 y *Megasphaera*-1.

Se proporcionan los oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores y sondas de amplificación) que son capaces de hibridarse de manera específica (por ejemplo, en condiciones convencionales de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, condiciones de PCR convencionales y/o condiciones de hibridación estrictas) a una región génica diana, o complemento de la misma, en *L. crispatus*, *L. jensenii*, *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 (*Megasphaera*-1) y BVAB-2. La amplificación de la región génica diana de un organismo en una muestra (por ejemplo, una muestra de hisopado vaginal) puede, en algunas realizaciones, ser indicativo de la presencia, la ausencia y/o el nivel del organismo en la muestra.

La región génica diana puede variar. En algunas realizaciones, se proporcionan los oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores y sondas de amplificación) que son capaces de hibridarse de manera específica (por ejemplo, en condiciones convencionales de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, condiciones de PCR convencionales y/o condiciones de hibridación estrictas) a una región génica que codifica el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) en un organismo. En algunas realizaciones, el organismo es *Atopobium vaginae*. En algunas realizaciones, el organismo es BVAB2. En algunas realizaciones, el organismo es *Megasphaera* de tipo 1. En algunas realizaciones, el organismo es *L. crispatus*. En algunas realizaciones, el microorganismo es *L. jensenii*. El gen del ARNr 16S se utiliza como gen diana para la amplificación del ADN para detectar la presencia, la ausencia y/o el nivel de *Atopobium vaginae*, BVAB-2, *Megasphaera* de tipo 1, *L. crispatus* y/o *L. jensenii* en la muestra. Ejemplos de oligonucleótidos capaces de hibridarse de manera específica con la región génica del ARNr 16S en BVAB-2 son las SEQ ID NO: 4 a 6 como se proporciona en la tabla 1 y las secuencias que tienen un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4 a 6. Ejemplos de oligonucleótidos capaces de hibridarse de manera específica con la región del gen ARNr 16S en *Megasphaera* son las SEQ ID NO: 7 a 9 como se proporciona

En la tabla 1 y las secuencias que tienen un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7 a 9. En algunas realizaciones, los cebadores y las sondas que pueden unirse de manera específica a la región génica del ARNr 16S de *Atopobium vaginae* se utilizan en la detección de la presencia, la ausencia y/o el nivel de *Atopobium vaginae* en una muestra biológica. Ejemplos de oligonucleótidos capaces de hibridarse de manera específica con la región génica del ARNr 16S en *Atopobium vaginae* son las SEQ ID NO: 1 a 3 como se proporciona en la tabla 1 y las secuencias que tienen un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3. Ejemplos de oligonucleótidos capaces de hibridarse de manera específica con la región génica del ARNr 16S en *L. crispatus* y *L. jensenii* son las SEQ ID NO: 14 a 16 como se proporciona en la tabla 1 y las secuencias que tienen un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14 a 16.

La toxina vaginolisisina (VLY) es el principal factor de virulencia de *G. vaginalis*, codificada por el gen *vly*. La VLY pertenece a las citolisinas dependientes del colesterol, una familia de toxinas formadoras de poros que se sabe que alteran las membranas plasmáticas provocando lisis celular y que se cree que juegan un papel clave en la virulencia de *G. vaginalis*. En algunas realizaciones, se proporcionan los oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores y sondas de amplificación) que son capaces de hibridarse de manera específica (por ejemplo, en condiciones convencionales de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, condiciones de PCR convencionales y/o condiciones de hibridación estrictas) a una región génica que codifica *vly* en *G. vaginalis*. En algunas realizaciones, el gen *vaginolisina* (*vly*) se utiliza como gen diana para la amplificación del ADN para detectar la presencia, la ausencia y/o el nivel de *G. vaginalis* en la muestra. En algunas realizaciones, se utilizan cebadores y sondas que pueden unirse de manera específica a la región génica *vly* de *G. vaginalis* en la detección de la presencia, la ausencia y/o el nivel de *G. vaginalis* en una muestra biológica. Ejemplos de oligonucleótidos capaces de hibridarse de manera específica con la región del gen *vly* en *G. vaginalis* son las SEQ ID NO: 10 a 13 como se proporciona en la tabla 1 y las secuencias que tienen un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 13.

Tabla 1. Cebador y sondas para la detección de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2

Organismo diana	Gen diana	Nombre del cebador/sonda	Secuencias del cebador/sonda (5'-3')
<i>Atopobium vaginae</i>	ARNr 16S	MenAv248fw	CCCTATCCGCTCCTGATACC (SEQ ID NO: 1)
	ARNr 16S	MenAv334rv	CCAAATATCTGCGCATTTC A (SEQ ID NO: 2)
	ARNr 16S	MCF-Av-T4	TCCCCTACCAGACTCAAGCCTGC (SEQ ID NO: 3) (fluoróforo en 5': FAM, fluoróforo en 3': BHQ1)
<i>BVAB2</i>	ARNr 16S	585F BVAB2	GCGGCTAGATAAGTGTGATGTTT (SEQ ID NO: 4)
	ARNr 16S	666R BVAB2	CTCTCCAGCACTCAAGCTAAA (SEQ ID NO: 5)
	ARNr 16S	BVAB2_613_641	CAAGGCTTAACCTTGGGGTTCATTACAA (SEQ ID NO: 6) (fluoróforo en 5': CFO, fluoróforo en 3': BHQ1)
<i>Megasphaera</i> de tipo 1	ARNr 16S	456F_MegaE	GATGCCAACAGTATCCGTCCG (SEQ ID NO: 7)
	ARNr 16S	667R_MegaE	CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA (SEQ ID NO: 8)
	ARNr 16S	Mega485-506-T	TACCGTAAGAGAAAAGCCACGG (SEQ ID NO: 9) (fluoróforo en 5': CFO, fluoróforo en 3': BHQ1)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	vly	GVvlyfW2	GCCAACGATGATCGCGTAT (SEQ ID NO: 10)
	vly	GVvlyfW2amod	GCCAATAATGACCGCGTAT (SEQ ID NO: 11)
	vly	GVvlyrv1	AGCCGTTCACTGCGGAAGT (SEQ ID NO: 12)
	vly	MCF-Gv-T3	ACAGCACTTTTCGCCGCC (SEQ ID NO: 13) (fluoróforo en 5': Quasar670, fluoróforo en 3': BHQ2)
<i>Lactobacillus crispatus</i> y <i>Lactobacillus jensenii</i>	ARNr 16S	MCF-Lj_Lc-F8	TTAAAAGGCGGCGTAAGC (SEQ ID NO: 14)
	ARNr 16S	MCF-Lsp-R6	GCCAGTTACTACCTCTATC (SEQ ID NO: 15)
	ARNr 16S	MCF-Lsp-T11	AAGTCTGATGGAGCAACGCC (SEQ ID NO: 16) (fluoróforo en 5': ROX, fluoróforo en 3': BHQ2)

(continuación)

Organismo diana	Gen diana	Nombre del cebador/sonda	Secuencias del cebador/sonda (5'-3')
Controles	DrosScaff2	DrosScaff2-LP	GGCATGGAGGTTGTCCCATTGTG (SEQ ID NO: 30)
	DrosScaff2	DrosScaff2-UP	GGATCTAGCCGTGTGCCCCGCT (SEQ ID NO: 31)
	DrosScaff2	Sign-T1	TTGATGCCTCTTCACATTGCTCCACCTTTCCT (SEQ ID NO: 32) (fluoróforo en 5': Quasar705, fluoróforo en 3': BHQ3)

En el presente documento también se proporcionan oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores o sondas de amplificación) que contienen 1 emparejamiento incorrecto con respecto a las SEQ ID NO: 1 a 16 o el complemento de las mismas.

Los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento pueden estar de varias formas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se disuelven (ya sea solos o en combinación con otros ácidos nucleicos) en solución, por ejemplo, en tampón. En algunas realizaciones, se proporcionan ácidos nucleicos, ya sean solos o en combinación con otros ácidos nucleicos aislados, como una sal. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan en forma liofilizada de manera que se pueden reconstituir. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados divulgados en el presente documento se pueden proporcionar solos en un sedimento liofilizado o en un sedimento liofilizado con otros ácidos nucleicos aislados. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan fijos a una sustancia sólida, tal como una perla, una membrana o similar. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan en una célula hospedadora, por ejemplo, una estirpe celular que lleva un plásmido, o una estirpe celular que lleva una secuencia integrada de forma estable.

También se divulgan en el presente documento composiciones, mezclas de reacción y kits que comprenden los oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores y/o sondas de amplificación) que son capaces de hibridarse de manera específica con la secuencia del gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, *BVAB-2*, *Megasphaera* de tipo 1, *L. crispatus*, y/o *L. jensenii*, o un complemento del mismo. La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más pares de cebadores de amplificación capaces de hibridarse de manera específica con la secuencia del ARNr 16S, o un complemento de la misma, de *Atopobium vaginae*. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 1 o 2. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 1 o 2. La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más sondas capaces de hibridarse de manera específica con la gen del ARNr 16S, o complemento de la misma, de *Atopobium vaginae*. En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 3.

La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más pares de cebadores de amplificación capaces de hibridarse de manera específica con la secuencia del ARNr 16S, o un complemento de la misma, de *BVAB-2*. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 4 o 5. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 4 o 5. La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más sondas capaces de hibridarse de manera específica con la gen del ARNr 16S, o complemento de la misma, de *BVAB-2*. En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 6.

La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más pares de cebadores de amplificación capaces de hibridarse de manera específica con la secuencia del ARNr 16S, o un complemento de la misma, de *Megasphaera* de tipo 1. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 7 u 8. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 7 u 8. La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más sondas capaces de hibridarse de manera específica con la gen del ARNr 16S, o complemento de la misma, de *Megasphaera* de tipo 1. En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 9.

La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más pares de cebadores de amplificación capaces de hibridarse de manera específica con la secuencia del ARNr 16S, o un complemento de la misma, de *L. crispatus* y/o *L. jensenii*. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 14 o 15. La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más sondas capaces de hibridarse de manera específica con la gen del ARNr 16S, o complemento de la misma, de *L. crispatus* y/o *L. jensenii*. En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 16.

Las composiciones, las mezclas de reacción y los kits también comprenden oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores y/o sondas de amplificación) que son capaces de hibridarse de manera específica con la secuencia del gen *vly* de *G. vaginalis*, o un complemento de la misma. La composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden uno o más pares de cebadores de amplificación capaces de hibridarse de manera específica con la secuencia del gen *vly* de *G. vaginalis*, o un complemento de la misma. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 10, 11 o 12. En algunas realizaciones, el cebador consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 10, 11 o 12. En algunas realizaciones, la composición, la mezcla de reacción y el kit comprenden una o más sondas adicionales capaces de hibridarse de manera específica con la secuencia del gen *vly* de *G. vaginalis*, o complemento de la misma. En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia de SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 13.

Las sondas oligonucleotídicas pueden, en algunas realizaciones, incluir una fracción detectable. Por ejemplo, las sondas oligonucleotídicas divulgadas en el presente documento pueden comprender un marcador radiactivo. Los ejemplos no limitantes de marcadores radiactivos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{32}P y ^{35}S . En algunas realizaciones, las sondas oligonucleotídicas pueden incluir uno o más marcadores o fracciones detectables no radiactivos, que incluyen, pero sin limitación, ligandos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y anticuerpos. Otros marcadores detectables para utilizar con sondas, que pueden permitir un aumento de la sensibilidad del método de la invención, incluyen biotina y radionucleótidos. Será evidente para el experto en la materia que la elección de un marcador particular dicta la manera en que se une a la sonda. Por ejemplo, las sondas oligonucleotídicas marcadas con uno o más colorantes, de modo que tras la hibridación con un ácido nucleico molde se genera un cambio detectable en la fluorescencia. Si bien los colorantes no específicos pueden ser deseables para algunas aplicaciones, las sondas específicas de secuencia pueden proporcionar mediciones de amplificación más precisas. Una configuración de 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 inactivador. Cuando la sonda no está hibridada, puede mantener una configuración de bucle-tallo, en la que el fluoróforo se inactiva por el inactivador, evitando así que el fluoróforo emita fluorescencia. Cuando la sonda se hibrida con una secuencia nucleica molde, se linealiza, lo que aleja el fluoróforo del inactivador y, por lo tanto, permite que el fluoróforo emita 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 pueden configurar para hibridarse con secuencias de un amplicón que están lo suficientemente cerca para permitir la transferencia de energía por FRET cuando la primera sonda y la segunda sonda se hibridan con el mismo amplicón.

En algunas realizaciones, la sonda específica de secuencia comprende un oligonucleótido como se divulga en el presente documento conjugado con un fluoróforo. En algunas realizaciones, la sonda se conjuga con dos o más fluoróforos. Los ejemplos de fluoróforos incluyen: colorantes de xanteno, por ejemplo, colorantes de fluoresceína y rodamina, tales como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), el monoclóhidrato de éster etílico del ácido 2-[etilamino]-3-(etilimino)-2,7-dimetil-3H-xanten-9-il]benzoico (R6G) (emite una radiación de respuesta en la longitud de onda que varía entre aproximadamente 500 y 560 nm), el yoduro de 1,1,3,3,3',3'-hexametilindodicarbocianina (HIDC) (emite una radiación de respuesta en la longitud de onda que varía entre aproximadamente 600 y 660 nm), la 6-carboxifluoresceína (normalmente conocida por las abreviaturas FAM y F), la 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), la 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE o J), la N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA o T), la 6-carboxi-X-rodamina (ROX o R), la 5-carboxirrodamina-6G (R6G5 o G5), la 6-carboxirrodamina-6G (R6G6 o G6) y la rodamina 110; colorantes de cianina, por ejemplo, los colorantes Cy3, Cy5 y Cy7; cumarinas, por ejemplo, la umbeliferona; colorantes de bencimida, por ejemplo, Hoechst 33258; colorantes de fenantridina, por ejemplo, rojo Texas; colorantes de etidio; colorantes de acridina; colorantes de carbazol; colorantes de fenoxazina; colorantes de porfirina; colorantes de polimetina, por ejemplo, colorantes de cianina tales como Cy3 (emite una radiación de respuesta en la longitud de onda que varía entre 540 y 580 nm), Cy5 (emite una radiación de respuesta en la longitud de onda que varía entre 640 y 680 nm), etc.; colorantes BODIPY y colorantes de quinolina. Los fluoróforos específicos de interés incluyen: pireno, cumarina, dietilaminocumarina, FAM, clorotriazinilo de fluoresceína, fluoresceína, R110, eosina, JOE, R6G, HIDC, tetrametilrodamina, TAMRA, lisamina, ROX, naftofluoresceína, rojo Texas, naftofluoresceína, Cy3 y Cy5, CAL naranja flúor y similares.

En algunas realizaciones, la sonda se conjuga con un inactivador. Un inactivador puede absorber la radiación electromagnética y disiparla en forma de calor, por lo que permanece oscuro. Los inactivadores ilustrativos incluyen Dabcyl, NfQ, tal como BHQ-1 o BHQ-2 (Biosearch), IOWA BLACK FQ (IDT) e IOWA BLACK RQ (IDT). En algunas realizaciones, el inactivador se selecciona para emparejarse con un fluoróforo para absorber la radiación electromagnética emitida por el fluoróforo. Los pares de fluoróforo/inactivador útiles en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento son bien conocidos en la materia y se pueden encontrar, por ejemplo, descritos en Marras, "Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes" disponible en [www.molecular-beacons.org/download/marras.mmb06 %28335 %293.pdf](http://www.molecular-beacons.org/download/marras.mmb06%28335%293.pdf).

En algunas realizaciones, un fluoróforo se une a un primer extremo de la sonda y un inactivador se une a un segundo extremo de la sonda. La unión puede incluir enlaces covalentes y, opcionalmente, puede incluir al menos una molécula

enlazadora situada entre la sonda y el fluoróforo o el inactivador. En algunas realizaciones, un fluoróforo se une al extremo 5' de una sonda y un inactivador se une al extremo 3' de una sonda. En algunas realizaciones, un fluoróforo se une al extremo 3' de una sonda y un inactivador se une al extremo 5' de una sonda. Los 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 de ácidos nucleicos que son útiles en las realizaciones divulgadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, tecnología de sonda de nanopartículas (véase Elghanian, *et al.* (1997) Science 277:1078-1081) y tecnología de sonda Amplifluor (véanse las patentes de EE. UU. n.º: 5.866.366; 6.090.592; 6.117.635; y 6.117.986).

La presente invención se refiere a una composición para la detección de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2, en donde la composición comprende: cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *L. crispatus* y/o *L. jensenii*, en donde cada cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 14 o a la SEQ ID NO: 15; cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de BVAB2, en donde cada cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 4 o a la SEQ ID NO: 5; cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1, en donde cada cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 7 o a la SEQ ID NO: 8; cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *G. vaginalis*, en donde cada cebador consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12 o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12, y cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, en donde cada cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 1 o a la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, los cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *L. crispatus* y/o *L. jensenii* comprenden, o consisten en, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2; los cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de BVAB2 comprenden, o consisten en, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 4 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 5; los cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1 que comprenden, consisten en, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8; los cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *G. vaginalis* comprenden, o consisten en, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 11; y los cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae* comprenden, o consisten en, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12, un cebador que comprende, o consiste en, la secuencia de SEQ ID NO: 14 y un cebador que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15.

La composición puede comprender además una pluralidad de sondas oligonucleotídicas, en donde cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16. En algunas realizaciones, cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16.

Cualquier sonda descrita en el presente documento puede comprender una fracción emisora de fluorescencia y una fracción inactivadora de fluorescencia.

Como se divulga en el presente documento, una mezcla de reacción puede comprender uno o más de los cebadores divulgados en el presente documento, una o más de las sondas divulgadas en el presente documento (por ejemplo, las sondas que contienen fluoróforos) o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende una o más de las composiciones que contienen cebador y/o sonda divulgadas en el presente documento. La mezcla de reacción también puede comprender varios componentes adicionales. Los ejemplos de los componentes adicionales en la mezcla de reacción incluyen, pero sin limitación, ADN molde, ADN polimerasa (por ejemplo, Taq ADN polimerasa), desoxinucleótidos (dNTP), solución de tampón, cationes biovalentes, iones de potasio de catión monovalente y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción es una mezcla maestra para PCR en tiempo real.

Muestras

Los métodos y composiciones divulgados en el presente documento son adecuados para detectar trastornos vaginales, en particular, VB, en una amplia diversidad de muestras. Como se utiliza en el presente documento, una "muestra" se refiere a cualquier tipo de material de origen biológico tomado de uno o más sujetos de los que se sospecha que padecen VB. La muestra puede comprender, por ejemplo, líquido, tejido o células. La muestra puede comprender un material biológico tomado directamente de un sujeto, células o tejidos cultivados, o cualquier fracción o productos producidos o procedentes de materiales biológicos. Una muestra puede estar purificada, parcialmente

purificada, sin purificar, enriquecida o amplificada.

La muestra puede ser una muestra biológica, por ejemplo, una muestra clínica. En algunas realizaciones, la muestra se toma de una fuente biológica, tal como la vagina, uretra, pene, ano, garganta, cuello uterino, caldos de fermentación, cultivos celulares y similares. La muestra puede comprender, por ejemplo, líquido y células de la vagina. La muestra biológica se puede utilizar (i) directamente tal como se obtiene del sujeto o la fuente, o (ii) después de un tratamiento previo para modificar el carácter de la muestra. Por lo tanto, la muestra de prueba se puede tratar previamente antes de su uso, por ejemplo, mediante la alteración de células o de partículas víricas, la preparación de líquidos a partir de materiales sólidos, la dilución de líquidos viscosos, el filtrado de líquidos, la concentración de líquidos, la inactivación de componentes interferentes, la adición de reactivos, la purificación de ácidos nucleicos y similares. Por consiguiente, una "muestra biológica" como se utiliza en el presente documento incluye ácidos nucleicos (ADN, ARN o ácidos nucleicos totales) extraídos de una muestra clínica o biológica. La preparación de muestras también puede incluir el uso de una solución que contenga tampones, sales, detergentes y/o similares que se utilizan para preparar la muestra para el análisis. En algunas realizaciones, la muestra se procesa antes de la prueba molecular. En algunas realizaciones, la muestra se analiza directamente y no se procesa antes de la prueba. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra vaginal, tal como una sola muestra de hisopado vaginal. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de hisopado vaginal de una mujer con síntomas clínicos de vaginitis y/o vaginosis.

Las muestras vaginales o de orina a menudo están infectadas con múltiples organismos. Los cebadores y la sondas divulgadas son tolerantes a infecciones mixtas de la matriz vaginal o de orina.

En algunas realizaciones, una muestra a analizar se procesa antes de realizar los métodos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la muestra se puede aislar, concentrar o someter a varias otras etapas de procesamiento antes de realizar los métodos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la muestra se puede procesar para aislar los ácidos nucleicos de la muestra antes de poner en contacto la muestra con los oligonucleótidos, como se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento se realizan en la muestra sin cultivar la muestra *in vitro*. En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento se realizan en la muestra sin aislar los ácidos nucleicos de la muestra antes de poner en contacto la muestra con los oligonucleótidos como se divulga en el presente documento.

Extracción de muestras

En extracciones normales de muestras, las células se lisan mediante cizallamiento mecánico con perlas de vidrio como se describe en la patente de EE. UU. n.º 7.494.771, para lisar los organismos diana. Como se divulga en el documento WO03/008636, dicho método genérico de lisis celular es eficaz para una amplia variedad de organismos diana y matrices de muestras. También existen otros métodos de lisis menos universales que están diseñados de manera específica para dirigirse a una determinada especie o grupo de organismos, o que explotan actividades enzimáticas o químicas específicas. Por ejemplo, la enzima ACP se utiliza normalmente para lisar organismos grampositivos (Ezaki *et al.*, J. Clin. Microbiol., 16(5):844-846 (1982); Paule *et al.*, J. Mol. Diagn., 6(3): 191-196 (2004); patente de EE. UU. n.º 3.649.454) y micobacterias (patente de EE. UU. n.º 5.185.242), pero en general se considera menos eficaz con respecto a la lisis de especies gramnegativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Patente de EE. UU. n.º 3.649.454).

Pruebas de ácidos nucleicos

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, pruebas de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la prueba puede incluir la prueba de secuencias de ácido nucleico diana en una muestra. Se pueden utilizar varias formas de pruebas de ácidos nucleicos en las realizaciones divulgadas en el presente documento, que incluyen, pero sin limitación, pruebas que implican la amplificación de ácidos nucleicos.

Como se utiliza en el presente documento, la amplificación de ácidos nucleicos se refiere a cualquier procedimiento conocido para obtener múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico diana o su complemento o fragmentos de la misma, mediante métodos específicos de secuencia. Los ejemplos de métodos de amplificación conocidos incluyen, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (por ejemplo, amplificación por desplazamiento múltiple (MDA)), amplificación mediada por replicasa, inmunoamplificación, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación de 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.º 4.683.195; Walker, "Strand Displacement Amplification", patente de EE. UU. n.º 5.455.166; Dean *et al.*, "Multiple displacement amplification", patente de EE. UU. n.º 6.977.148; Notomi *et al.*, "Process for Synthesizing Nucleic Acid", patente de EE. UU. n.º 6.410.278; Landegren *et al.* patente de EE. UU. n.º 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.º 5.427.930; Cashman, "Blocked-Polymerase Polynucleotide Immunoassay Method and Kit", patente de EE. UU. n.º 5.849.478; Kacian *et al.*, "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods", patente de EE. UU. n.º 5.399.491; Malek *et al.*, "Enhanced Nucleic Acid Amplification Process", patente de EE. UU. n.º 5.130.238; Lizardi *et al.*, BioTechnology,

6:1197 (1988); Lizardi *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.854.033 "Rolling circle replication reporter systems". En algunas realizaciones, se pueden realizar dos o más de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos antes mencionados, por ejemplo, de manera secuencial.

- 5 Por ejemplo, la amplificación LCR utiliza al menos cuatro oligonucleótidos separados para amplificar una diana y su cadena complementaria mediante múltiples ciclos de hibridación, unión y desnaturalización (patente EP n.º 0 320 308). La SDA amplifica mediante el uso de un cebador que contiene un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que corta una cadena de un ADN doble semimodificado que incluye la secuencia diana, seguido de
10 amplificación en una serie de etapas de extensión de cebador y desplazamiento de cadena (Patente de EE. UU. n.º 5.422.252 de Walker *et al.*).

La PCR es un método bien conocido en la materia para la amplificación de ácidos nucleicos. La PCR implica la amplificación de una secuencia diana mediante dos o más cebadores oligonucleotídicos específicos de secuencia extensibles que flanquean la secuencia diana. El ácido nucleico que contiene la secuencia diana de interés se somete
15 a un programa de múltiples rondas de ciclos térmicos (desnaturalización, hibridación y extensión) en presencia de los cebadores, una polimerasa de ADN termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa) y varios dNTP, lo que da como resultado la amplificación de la secuencia diana. La PCR utiliza varias rondas de reacciones de extensión con cebadores en las que una ADN polimerasa termoestable sintetiza de manera simultánea cadenas complementarias de una región definida de una molécula de ADN. Al final de cada ciclo, cada molécula de ADN recién sintetizada actúa
20 como una plantilla para el siguiente ciclo. Durante rondas repetidas de estas reacciones, el número de cadenas de ADN recién sintetizadas aumenta exponencialmente de tal manera que después de 20 a 30 ciclos de reacción, el ADN molde inicial se habrá replicado varios miles o millones de veces. Los métodos para llevar a cabo diferentes tipos y modos de PCR se describen con detalle 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, las patentes de EE. UU. n.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159) y en publicaciones científicas (por ejemplo, Mullis *et al.* 1987, Methods in Enzymology, 155:335-350).

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

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., Nueva York (1994). Los ejemplos de métodos de PCR incluyen, pero sin limitación, PCR en tiempo real, PCR de punto final, polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados mediante PCR (AFLP-PCR), PCR Alu, PCR asimétrica, PCR de colonias, PCR DD, PCR degenerada, PCR de inicio en caliente, PCR *in situ*, PCR inversa, PCR larga, PCR múltiple, PCR anidada, PCR-ELISA, PCR-RFLP, polimorfismo de conformación de cadena simple mediante PCR (PCR-SSCP), PCR competitiva
40 cuantitativa (QC-PCR), amplificación rápida de extremos de ADNc mediante PCR (RACE-PCR), amplificación aleatoria de ADN polimórfico mediante PCR (RAPD-PCR), PCR en tiempo real, PCR palindrómica extragenética repetitiva (Rep-PCR), PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR), TAIL-PCR, Touchdown PCR y Vettorette PCR.

PCR en tiempo real, también llamada reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR), y
45 se pueden utilizar para cuantificar y amplificar de manera simultánea 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 están presentes. La expresión en "tiempo real" se refiere al control periódico durante la PCR. Determinados sistemas, tales como los sistemas de detección de secuencias ABI 7700 y 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, California) realizan el control durante cada ciclo térmico en un punto predeterminado o definido por el usuario. El análisis en tiempo real de la PCR con sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, del inglés *fluorescence resonance energy transfer*) mide los cambios en la señal del colorante fluorescente de un ciclo a otro, 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 de métodos de cuantificación son el uso de colorantes fluorescentes (por
50 ejemplo, SYBRGreen) que se intercalan en el ADN bicatenario y de sondas oligonucleotídicas de ADN modificadas que emiten fluorescencia cuando se hibridan con un ADN complementario. Los agentes intercalantes tienen una fluorescencia relativamente baja cuando no se unen y una fluorescencia relativamente elevada cuando se unen a ácidos nucleicos bicatenarios. Por ello, los agentes intercalantes se pueden utilizar para controlar la acumulación de ácidos nucleicos bicatenarios durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Los ejemplos de dichos colorantes no específicos útiles en las realizaciones divulgadas en el presente documento incluyen agentes intercalantes tales como SYBR Green I (Molecular Probes), yoduro de propidio, bromuro de etidio y similares.

Las muestras vaginales a menudo están infectadas con múltiples organismos. Los cebadores y las sondas divulgadas son tolerantes a infecciones mixtas de la matriz vaginal. Debido a las secuencias diana específicas, a los cebadores y
65 a las sondas, los métodos y composiciones divulgados en el presente documento se pueden utilizar para detectar la presencia/ausencia o el nivel de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium*

vaginae, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2* en una muestra con elevada sensibilidad, especificidad y precisión.

Los cebadores divulgados en el presente documento se pueden combinar con sistemas de PCR adicionales utilizando un perfil de PCR térmico y químico uniforme para proporcionar un grupo de ensayos para la detección de organismos vaginales, para mejorar la sensibilidad y la consistencia general del ensayo.

En algunas realizaciones, la PCR múltiple se realiza para amplificar y detectar, por ejemplo, mediante medios directos o indirectos, la presencia o la ausencia de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2* para permitir el diagnóstico de la VB mediante una prueba. La presencia o la ausencia de *L. crispatus*, *L. jensenii*, *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB-2*, se puede determinar mediante la amplificación y la detección de la presencia o la ausencia del gen del ARNr 16S de *L. crispatus*, *L. jensenii*, *Atopobium vaginae*, *BVAB-2*, *Megasphaera* de tipo 1 y la presencia o la ausencia del gen *vly* de *G. vaginalis*.

Por consiguiente, algunas realizaciones para la detección y/o identificación de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2* en una muestra incluyen las etapas de proporcionar una muestra de prueba; y de poner en contacto la muestra con cebadores oligonucleotídicos como se describe anteriormente que pueden hibridarse y amplificar de manera específica genes del ARNr 16S de *L. crispatus*, *L. jensenii*, *Atopobium vaginae*, *BVAB-2*, *Megasphaera* de tipo 1, y el gen *vly* de *G. vaginalis*, en condiciones convencionales de amplificación de ácidos nucleicos y/o condiciones de hibridación estrictas. Como se describe en el presente documento, la muestra se puede poner en contacto con todos los cebadores y sondas a la vez, o se puede poner en contacto primero con algunos de los cebadores y sondas y después con el resto de los cebadores y sondas.

En algunas realizaciones, la puesta en contacto se realiza en condiciones que permiten la hibridación específica de los cebadores con la región génica diana correspondiente si el organismo diana está presente en la muestra. Se puede determinar la presencia y/o la cantidad de sonda que se une de manera específica a la región génica diana correspondiente (si está presente en la muestra que se está analizando), en donde la sonda unida es indicativa de la presencia del organismo diana correspondiente en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de sonda unida se utiliza para determinar la cantidad del organismo diana correspondiente en la muestra.

La etapa de determinación se puede lograr mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia, que incluyen, pero sin limitación, hibridación *in situ*, después de la etapa de puesta en contacto. La detección de dobletes híbridos (es decir, de una sonda unida de manera específica a la región génica diana) se puede llevar a cabo mediante una serie de métodos. Normalmente, los dobletes de hibridación se separan de los ácidos nucleicos no hibridados y después se detectan los marcadores unidos a los dobletes. Dichos marcadores se refieren a marcadores radiactivos, fluorescentes, biológicos o enzimáticos o marcadores de uso convencional en la materia. Se puede conjugar un marcador con las sondas oligonucleotídicas o con los ácidos nucleicos procedentes de la muestra biológica. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden emplear etapas de lavado para eliminar el exceso de muestra/ácidos nucleicos diana o sonda oligonucleotídica (así como el conjugado no unido, cuando corresponda). Además, los formatos de ensayo heterogéneos convencionales son adecuados para detectar los híbridos mediante los marcadores presentes en los cebadores y sondas oligonucleotídicas.

Se proporciona un método para detectar *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2* en una muestra biológica, en donde el método comprende: poner en contacto la muestra biológica con una pluralidad de pares de cebadores, en donde la pluralidad de pares de cebadores comprende: cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *L. crispatus* y *L. jensenii*, en donde cada cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 14 o a la SEQ ID NO: 15; cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *BVAB2*, en donde cada cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 4 o a la SEQ ID NO: 5; cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1, en donde cada cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 7 o a la SEQ ID NO: 8; cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *G. vaginalis*, en donde cada cebador consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12 o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12, y cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, en donde cada cebador consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 1 o a la SEQ ID NO: 2; generar amplicones de las secuencias del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, *BVAB2*, *Megasphaera* de tipo 1, y/o *L. crispatus* y *L. jensenii*, y/o amplicones de la secuencia del gen *vly* de *G. vaginalis* de dicha muestra biológica, si dicha muestra comprende uno o más de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2*; y determinar la presencia o la cantidad de uno o más productos amplificados como indicación de la presencia de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y *BVAB2* en dicha muestra biológica.

En algunas realizaciones, la pluralidad de pares de cebadores comprende un cebador que consiste en la secuencia

de SEQ ID NO: 1, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 4, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 5, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 11, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12, un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones, determinar la presencia o la cantidad de uno o más productos amplificados comprende poner en contacto los productos amplificados con una pluralidad de sondas oligonucleotídicas, en donde cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16. Por ejemplo, cada sonda puede comprender, o consistir en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16.

Como se describe en el presente documento, la amplificación se puede realizar mediante PCR en tiempo real, por ejemplo, PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR). Los cebadores adecuados para utilizar en los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden comprender una secuencia de nucleótidos exógena que permite la manipulación posterior a la amplificación de los productos de amplificación sin un efecto significativo sobre la propia amplificación. En algunas realizaciones, el cebador puede estar flanqueado por secuencias complementarias que comprenden un fluoróforo en el extremo 5' y un inactivador de fluorescencia en el extremo 3'.

Las sondas oligonucleotídicas divulgadas en el presente documento pueden comprender una fracción emisora de fluorescencia y una fracción inactivadora de fluorescencia.

Los métodos divulgados en el presente documento son susceptibles de automatización, proporcionando así una opción de alto rendimiento para la detección y/o cuantificación de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2 en una muestra. Se pueden utilizar varias plataformas de PCR múltiple, por ejemplo, BD MAX™, Viper™ o Viper™ LT, para realizar una o más etapas de los métodos divulgados. Los métodos se pueden realizar de forma múltiple. Por ejemplo, la amplificación y/o la detección de ácidos nucleicos, en algunas realizaciones, comprenden la realización de PCR múltiple.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar situaciones y entornos particulares en los que se puede aplicar esta tecnología y no pretenden restringir el alcance de la invención y de las reivindicaciones incluidas en esta divulgación. En los siguientes ejemplos, la detección de la CVV y de la tricomoniasis solo se divulga con fines de referencia y las realizaciones correspondientes no pertenecen a la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Detección de CVV, tricomoniasis y VB en muestras de hisopado vaginal

El estudio descrito en este ejemplo muestra la detección de especies de *Candida* asociadas con la CVV, la tricomoniasis y la VB mediante una prueba de diagnóstico *in vitro* cualitativa automatizada en muestras de hisopado vaginal. La prueba utiliza PCR en tiempo real para la amplificación de dianas de ADN y sondas de hibridación fluorogénica para la detección e identificación de organismos diana.

Se recogieron hisopos vaginales de mujeres con síntomas clínicos de vaginitis/vaginositis. Las muestras vaginales se caracterizaron mediante In Pouch™ TV para *T. vaginalis* mientras que el cultivo seguido de la identificación BD Phoenix™ se utilizó para especies de *Candida* y la puntuación de Nugent (Nugen *et al.*, J. Clin. Microbiol. 29(2):297-301 (1991)), como método de referencia para la VB. Los criterios de Amsel (Amsel *et al.*, Am. J. Med. 74(1):14-22 (1983)) se utilizaron solo en la determinación de los estados de la VB para muestras con puntuación de Nugent intermedia (puntuación de Nugent 4 a 6). Tres hisopos fueron para la prueba en el sistema BD MAX™ (Becton, Dickinson and Company, New Jersey) para la detección de tricomoniasis, especies de *Candida* asociadas con la CVV y de VB mediante un análisis de curva de rendimiento diagnóstico (ROC). El diagnóstico de la VB se determinó mediante un algoritmo basado en parámetros de PCR para la detección de bacterias relacionadas con la VB, incluidas las especies de *Lactobacillus*, *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, BVAB-2 y *Megasphaera*-1.

La PCR en tiempo real para la amplificación de dianas de ADN se realizó con los cebadores proporcionados en la tabla 1 y se utilizaron las sondas de hibridación fluorogénica proporcionadas en la tabla 1 para detectar especies de *Candida* asociadas con la CVV, *T. vaginalis* y las bacterias relacionadas con la VB *L. crispatus*, *L. jensenii*, *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2 en cada una de las muestras de hisopado vaginal.

Se realizó un estudio de inclusión con cepas cultivables originarias de 12 países. El análisis del estudio de inclusión se basó en el estado positivo/negativo de cada diana individual de acuerdo con los umbrales de parámetros de PCR establecidos. Como se muestra en la tabla 2, el ensayo es capaz de detectar una gran diversidad de cepas

pertenecientes a especies implicadas en la CVV, la tricomoniasis y la VB. El nivel de detección de organismos específicos en mezclas demostró un elevado nivel de sensibilidad analítica, lo que indica que los médicos pueden obtener una identificación clara de los patógenos implicados en la infección vaginal y seleccionar el tratamiento con solo una muestra vaginal.

5

Tabla 2. Estudio de inclusión

Microorganismo (Carga/hisopo)	Cepa ^a	Origen	Estado
<i>Candida albicans</i> (5,4 × 10 ⁵ UFC/hisopo)	ATCC 18804	Uruguay	POS
	ATCC 36232	ND	POS
	ATCC 60193	EE. UU.	POS
	ATCC 32032	Sudáfrica	POS
	CCUG 44014	Suecia	POS
<i>Atopobium vaginae</i> (1,1 × 10 ³ UFC/hisopo)	CCUG 43049	Suecia	POS
	CCUG 44156	Suecia	POS
	CCUG 55226	Bélgica	POS
	CCUG 44258	Suecia	POS
	CCUG 48515	Suecia	POS
<i>Trichomonas vaginalis</i> (1,4 × 10 ³ células/hisopo)	ATCC 30001	ND	POS
	ATCC 30092	EE. UU.	POS
	ATCC 30185	EE. UU.	POS
	ATCC 30184	EE. UU.	POS
	ATCC 30237	EE. UU.	POS
<i>Candida glabrata</i> (2,8 × 10 ⁴ UFC/hisopo)	ATCC 2001	ND	POS
	ATCC 15545	ND	POS
	ATCC 90876	Alemania	POS
	YST-192 ^b	EE. UU.	POS
	ATCC MYA-276	Escocia	POS
<i>Candida krusei</i> (34 × 10 ⁴ UFC/hisopo)	ATCC 6258	Sri Lanka	POS
	ATCC 28870	Italia	POS
	ATCC 32672	Nueva Zelanda	POS
	ATCC 44507	Inglaterra	POS
	YST-367 ^b	EE. UU.	POS
<i>Gardnerella vaginalis</i> (3,4 × 10 ⁴ UFC/hisopo)	ATCC 14018	EE. UU.	POS
	ATCC 14019	ND	POS
	CCUG 44111	Suecia	POS
	CCUG 44159	Suecia	POS
	CCUG 60143 A	Suecia	POS
	ATCC 49145	ND	POS
	CCUG 44280	Suecia	POS
<i>Lactobacillus crispatus</i> (1,4 × 10 ⁴ UFC/hisopo)	ATCC 33820	ND	POS
	CCUG 44073	Suecia	POS
	CCUG 42898	ND	POS
	ATCC 33197	ND	POS
	ATCC 53545	ND	POS
<i>Lactobacillus jensenii</i> (2,1 × 10 ³ UFC/hisopo)	ATCC 25258	ND	POS
	CCUG 44492	Sudáfrica	POS
	CCUG 44003	Suecia	POS
	CCUG 44122	Suecia	POS
	CCUG 44495	Sudáfrica	POS
<i>Candida parapsilosis</i> (5,4 × 10 ⁵ UFC/hisopo)	ATCC 22019	Puerto Rico	POS
	ATCC 28475	Noruega	POS
	YST-100 ^b	Alemania	POS
	CCUG 37233	Suecia	POS
	YST-194	EE. UU.	POS
Microorganismo (Carga/hisopo)	Cepa ^a	Origen	Estado
<i>Candida tropicalis</i> (5,4 × 10 ⁵ UFC/hisopo)	ATCC 750	ND	POS
	ATCC 1369	ND	POS
	ATCC 9968	antigua URSS	POS
	YST-1051 ^b	EE. UU.	POS
	CCUG 21298	Suecia	POS

^a Una cepa de cada microorganismo probada en cada mezcla ^b Cepa de la colección BD.
ND: no determinado

En estudios de infección conjunta simulada, se probó una carga baja de *T. vaginalis* o una carga baja de *C. glabrata* y *C. krusei* en presencia de cargas elevadas de *C. albicans*; y se probó una carga baja de *T. vaginalis* en presencia de una carga elevada de *C. glabrata*. Para cada estudio anterior, se utilizó una matriz simulada en lugar de la matriz vaginal debido a la presencia de algunas dianas en la flora vaginal de mujeres asintomáticas/sintomáticas. Los resultados de los estudios de infección conjunta simulada se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Estudio de infección conjunta estimulada del grupo vaginal

Carga elevada (Organismos/hisopo)	<i>Candida albicans</i> ($2,8 \times 10^6$)			<i>Candida glabrata</i> ($2,8 \times 10^6$)
Carga baja (Organismos/hisopo)	<i>Candida krusei</i> ($3,4 \times 10^4$)	<i>Trichomonas vaginalis</i> ($1,4 \times 10^3$)	<i>Candida glabrata</i> ($4,2 \times 10^3$)	<i>Trichomonas vaginalis</i> ($1,4 \times 10^3$)
% de resultados del ensayo conformes	95 %	100 %	100 %	100 %

Las muestras clínicas se definieron como muestra positiva/negativa para especies de *Candida* y *T. vaginalis*. Los resultados del estudio de rendimiento que se muestran en la tabla 4 demuestran que el grupo vaginal divulgado en el presente documento se puede utilizar para detectar *T. vaginalis* y especies de *Cándida* con elevada sensibilidad y especificidad.

Tabla 4. Estudio de rendimiento para *T. v.* y especies de *Candida*

Ensayo de grupo vaginal	Método de referencia	Rendimiento			
		Sensibilidad/Especificidad ^a	Fracción ^b	%	[CI al 95 bilateral] ^e
<i>T. vaginalis</i>	Inpouch TV™	Sensibilidad	34/36	94,4	[81,3 - 99,3]
		Especificidad	729/729	100,0	[99,6 - 100,0]
Especies de <i>Candida</i> ^{c,d}	BD Phoenix™	Sensibilidad	171/197	86,8	[81,3 - 91,2]
		Especificidad	544/568	95,8	[93,8 - 97,3]

^a Sensibilidad = POS verdadero/POS total del método de referencia y Especificidad = NEG verdadero/NEG total del método de referencia

^b Los resultados no notificables "no resueltos" se excluyeron del cálculo de sensibilidad/especificidad (1 %)

^c Especies de *Candida*: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*

^d Se detectan *Candida glabrata* y *Candida krusei* en dos canales distintos: se obtuvieron por separado ocho muestras de *C. glabrata* positivas para PCR y método de referencia, una positiva para peR y dos positivas para el método de referencia. Se obtuvieron una muestra de *C. krusei* positiva para PCR y método de referencia y una positiva para cada método por separado.

^e La CI al 95 % bilateral se calculó mediante el método de Clopper-Pearson

El rendimiento del ensayo para la detección de la VB se estableció mediante un análisis de curva de rendimiento diagnóstico (ROC). Con métricas de PCR a partir de la amplificación y la detección de especies de *Lactobacillus*, *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *BVAB-2* y *Megasphaera-1*, se construyó un algoritmo basado en un modelo de regresión logística para estimar la probabilidad positiva de la VB y dar una única identificación de VB positiva o negativa. Se consideró que los pacientes tenían VB si su probabilidad estimada superaba un umbral determinado por el análisis de la curva ROC.

Como se muestra en la tabla 5, los resultados preliminares del rendimiento del ensayo (sensibilidad/especificidad) basados en el análisis de 771 muestras clínicas caracterizadas en total fueron del 91,9 % (sensibilidad)/86,2 % (especificidad) o aumentaron al 95,4 (sensibilidad)/92,5 % (especificidad) cuando no se consideraron los resultados intermedios de la puntuación de Nugent y de los criterios de Amsel.

Tabla 5. Estudio de rendimiento para la detección de VB

Nuevo ensayo de VB	Método de referencia	Rendimiento			
		Sensibilidad/Especificidad ^a	Fracción ^b	%	[CI al 95 % bilateral]
VB	Puntuación de Nugent/Criterios de Amsel	Sensibilidad	350/381	91,9	[88,7 - 94,4]
		Especificidad	330/383	86,2	[82,3 - 89,5]
VB	Puntuación de Nugent/Criterios de Amsel	Sensibilidad	311/326 ^c	95,4	[92,5 - 97,4]
		Especificidad	297/321 ^d	92,5	[89,1 - 95,2]

(continuación)

		(continuación)			
		Rendimiento			
Nuevo ensayo de VB	Método de referencia	Sensibilidad/Especificidad ^a	Fracción ^b	%	[CI al 95 % bilateral]
^a Sensibilidad = POS verdadero/POS total del método de referencia y Especificidad = NEG verdadero/NEG total del método de referencia					
^b Los resultados no notificables "no resueltos" se excluyeron del cálculo de sensibilidad/especificidad (<1 %)					
^c Se excluyeron 55 muestras con puntuación de Nugent intermedia y clasificadas como POS según los criterios de Amsel.					
^d Se excluyeron 62 muestras con puntuación de Nugent intermedia y clasificadas como NEG según los criterios de Amsel.					

Este ejemplo demuestra que las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento se pueden utilizar para detectar organismos relacionados con la CVV, la TV y la VB con elevada especificidad y sensibilidad.

5

Ejemplo 2

Selección de cebadores y sondas para la detección múltiple de CVV, tricomoniasis y VB en muestras vaginales

- 10 Se han diseñado y probado varios cebadores y sondas para determinar su rendimiento en la amplificación y la detección de especies de *Candida* asociadas a CVV, *T. vaginalis* y VB de manera individual o de forma múltiple. Las tablas 6a y 6b proporcionan varios cebadores, pares de cebadores y sondas que no se seleccionaron debido a una serie de propiedades no deseadas, incluida una señal débil, falta de amplificación, gran tamaño de amplicón, señal de falso positivo, detección no específica, sensibilidad a la variación de temperatura, fallo en la detección de un gran
- 15 número de cepas variantes, limitaciones en el ensayo múltiple, selectiva de cebadores/sondas asociados e interacción con otros cebadores/sondas. Sorprendentemente, como se describe en el ejemplo 1, se encontró que varios cebadores y sondas funcionan bien en la amplificación y la detección de especies de *Candida* asociadas a CVV, *T. vaginalis* y VB de manera individual o de forma múltiple. Las propiedades superiores de esos cebadores, sondas y algunas combinaciones de los mismos no se predijeron. Por otra parte, la capacidad de los oligonucleótidos de las
- 20 SEQ ID NO: 1 a 16 para actuar de manera eficaz (es decir, amplificar y detectar de manera específica el ADN diana) en una reacción de PCR en tiempo real múltiple no se predijo. Asimismo, la capacidad de los oligonucleótidos de las SEQ ID NO: 17 a 29 para actuar de manera eficaz (es decir, amplificar y detectar de manera específica el ADN diana) en una reacción de PCR en tiempo real múltiple no se predijo.

25

Tabla 6a. Cebadores y sondas no seleccionados para la detección de VB

Analito (organismo diana)	Gen diana	Cebadores, pares de cebadores y sondas no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
<i>Atopobium vaginae</i>	ARNr 16S	HINAVFW	GTTAGGTCAGGAGTTAAATCTG (SEQ ID NO: 33)
		HINAVRV	TCATGGCCCAGAAGACC (SEQ ID NO: 34)
		HINAV-RVA	TCGTGGCCCAGAAGGCC (SEQ ID NO: 35)
		AVFP-BV1 A VFP-BV1A*	CCCTGGTAGTCCTAGCT (SEQ ID NO: 36) CCCTGGTAGTCCTAGCC (SEQ ID NO: 37)
		A VRP-BV1	CGGCACGGAAAGTATAATCT (SEQ ID NO: 38)
		<u>Cebador directo (DIR):</u> ATOVAGRT3FW	GGTGAAGCAGTGGAAACACT (SEQ ID NO: 39)
		<u>Cebador inverso (INV):</u> MCF-AV-R2 <u>INV:</u> ATOVAGRT3REV*	GCAGCCCAGGACATAAGG (SEQ ID NO: 41) ATTCGCTTCTGCTCGCGCA (SEQ ID NO: 42)

(continuación)			
Analito (organismo diana)	Gen diana	Cebadores, pares de cebadores y sondas no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
		<u>DIR</u> : ATOP-442F	GCAGGGACGAGGCCGCAA (SEQ ID NO: 43)
		<u>INV</u> : HINAVRV	TCATGGCCCCAGAAGACC (SEQ ID NO: 44)
		<u>DIR</u> : MCF-AV-F1 e <u>INV</u> : MCF-AV-R3	CGGATTCATTGGGCGTAA (SEQ ID NO: 45) CGCCTCAGCGTCAGT (SEQ ID NO: 46)
		<u>DIR</u> : MCF-AV-F1 e <u>INV</u> : MCF-AV-R4	CGGATTCATTGGGCGTAA (SEQ ID NO: 47) ACACCTAGTGTCCATCGTTTA (SEQ ID NO: 48)
		<u>DIR</u> : MCF-AV-F2 e <u>INV</u> : MCF-AV-R3	CCTTCGGGTTGTAAACCG (SEQ ID NO: 49) CGCCTCAGCGTCAGT (SEQ ID NO: 50)
BVAB2	16S	<u>DIR</u> : HINBVAB2FW e <u>INV</u> : HINBVAB2RV	AGGCGGCTAGATAAGTGTGA (SEQ ID NO: 51) TCCTCTCCAGCACTCAAGCTAA (SEQ ID NO: 52)
		<u>DIR</u> : BVAB2-619F e <u>INV</u> : BVAB2-1024R	TTAACCTTGGGGTTCATTACAA (SEQ ID NO: 53) AATTCAGTCTCCTGAATCGTCAGA (SEQ ID NO: 54)
		<u>DIR</u> : BVAB2_585FA <u>DIR</u> : HINBVAB2FW <u>DIR</u> : BVABFP-BV2 <u>INV</u> : BVAB2_879R	GCGGCTAGATAAGTGTGATGTTT (SEQ ID NO: 4) AGGCGGCTAGATAAGTGTGA (SEQ ID NO: 55) CGTGTAGGCGGCTAGATAAGTG (SEQ ID NO: 56) GAATACTTATTGTGTTAACTGCGC (SEQ ID NO: 57)
<i>Megasphaera</i> de tipo 1	16S	<u>DIR</u> : HINMGSTYP1FW e <u>INV</u> : HINMGSTYP1RV	GACGGATGCCAACAGTATCCGTCCG (SEQ ID NO: 7) AAGTTCGACAGTTTCCGTCCCCTC (SEQ ID NO: 58)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	vaginolisina (vly)	<u>DIR</u> : GWLYFW1 e <u>INV</u> : GWLYRV1	GGCGGCGAAAGTGCTGTA (SEQ ID NO: 59) AGCCGTTCACTGCGGAAGT (SEQ ID NO: 12)
		<u>DIR</u> : GWLYFW2 e <u>INV</u> : GVVLYRV2A	GCCAACGATGATCGCGTAT (SEQ ID NO: 10) CAAGCTCGGCATGTTATCCAT (SEQ ID NO: 60)

(continuación)			
Analito (organismo diana)	Gen diana	Cebadores, pares de cebadores y sondas no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
		<u>DIR</u> : MCF-GV-F6 <u>DIR</u> : MCF-GV-F7 <u>INV</u> : MCF-GV-R2 <u>INV</u> : MCF-GV-R3 <u>INV</u> : MCF-GV-R4	CCAGAATTTGATGGATAACATGCC (SEQ ID NO: 65) ATGGACAATATGCCAAGCCT (SEQ ID NO: 66) TTCACTGCGGAAGTTACAGA (SEQ ID NO: 67) TTAAGTGCAGGAAGTAACGGA (SEQ ID NO: 68) TTAAGTGCAGGAAGTAACGGA (SEQ ID NO: 69)
		Sondas (<u>fluoróforo en 5'</u> : Cv5: <u>fluoróforo en 3'</u> : <u>BHQ2</u>): MCF-GV-T3-CY5-B2 MCF-GV-T4-CY5-B2	ACAGCACTTTCGCCGCC (SEQ ID NO: 13) ACAGCACTCTCGCCGCC (SEQ ID NO: 70)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ARNr 16S	<u>DIR</u> : HINGVFW e <u>INV</u> : HINGVRV	GGAAACGGGTGGTAATGCTGG (SEQ ID NO: 61) CGAAGCCTAGGTGGGCCATT (SEQ ID NO: 62)
		<u>DIR</u> : GV1FW e <u>INV</u> : GV3RV	TTAAGTGCAGGAAGTAACGGA (SEQ ID NO: 63) CCGTCACAGGCTGAACAGT (SEQ ID NO: 64)
<i>Lactobacillus crispatus</i>	ARNr 16S	<u>DIR</u> : L. crisp-452F e <u>INV</u> : L. crisp-1023R	GATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTA (SEQ ID NO: 71) CTTTGTATCTCTACAAATGGCACTA (SEQ ID NO: 72)
		<u>DIR</u> : HIN LG FW e <u>INV</u> : HIN LG RV	CGAGCTTGCCTAGATGAATTTG (SEQ ID NO: 73) CTCTAGACATGCGTCTAGTG (SEQ ID NO: 74)
		<u>DIR</u> : HIN LC FW e <u>INV</u> : HIN LC RV	GATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGA (SEQ ID NO: 75) AGCTGATCATGCGATCTGCTTTC (SEQ ID NO: 76)
		<u>DIR</u> : HIN LJ FW <u>INV</u> : HIN LJ RV	GCCTATAGAAATTCCTCGGAATGGACA (SEQ ID NO: 77) CAAATGGTATCCCAGACTTAAGGG (SEQ ID NO: 78)

(continuación)			
Analito (organismo diana)	Gen diana	Cebadores, pares de cebadores y sondas no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
		<u>DIR</u> : MEG-LG_LJ-F6 <u>DIR</u> : MCF-LC-F4 <u>INV</u> : MCF-LG-R3 <u>INV</u> : MCF-LJ_LC-R1 Sondas: MCF-Lj-Lc-T1_ROX-B2 MCF-Lg-T5_ROX-B2 MCF-Lj-T7_ROX-B2 MCF-Lc-T3_ROX-B2	GTCGAGCGAGCTTGCCTA (SEQ ID NO: 79) GAACTAACAGATTTACTTCGGTAATG (SEQ ID NO: 80) AAACTCTAGACATGCGTCTAGT (SEQ ID NO: 81) GTTTCCAAATGGTATCCCAGA (SEQ ID NO: 82) Sondas: CGGCGGATGGGTGAGTAAC (SEQ ID NO: 103) CCAAGAGACTGGGATAACACCTG (SEQ ID NO: 105) TCTTCGGAATGGACATAGATACAAGCTA (SEQ ID NO: 115) ATCCGCCGCTCGCTTT (SEQ ID NO: 116)
		<u>DIR</u> : MCF-LG-F5 <u>DIR</u> : MCF-LJ-F6 <u>DIR</u> : MCF-LC-F4 <u>INV</u> : MCF-LG-R3 <u>INV</u> : MCF-LJ_LC-R1 Sondas: MCF-Lj-Lc-T1_ROX-B2 MCF-Lg-T5_ROX-B2	GCCTAGATGAATTTGGTGCTT (SEQ ID NO: 83) CGAGCTTGCCTATAGAAATTCTT (SEQ ID NO: 84) GAACTAACAGATTTACTTCGGTAATG (SEQ ID NO: 85) AAACTCTAGACATGCGTCTAGT (SEQ ID NO: 86) GTTTCCAAATGGTATCCCAGA (SEQ ID NO: 87) Sondas: CGGCGGATGGGTGAGTAAC (SEQ ID NO: 103) CCAAGAGACTGGGATAACACCTG (SEQ ID NO: 105)
		<u>DIR</u> : MCF-LJ_LC-F8	TTAAAAGGCGGCGTAAGC (SEQ ID NO: 14)
		<u>DIR</u> : MCF-LG-F9	ACTAGACGCATGTCTAGAGTTT (SEQ ID NO: 88)
		<u>INV</u> : MCF-LSP-R6	GCCAGTTACTACCTCTATC (SEQ ID NO: 15) TGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAC (SEQ ID NO: 89)
		Cebadores:	Cebadores:
		MCF-Lj_Lc-F8	TTAAAAGGCGGCGTAAGC (SEQ ID NO: 14)
		MCF-Lg-F9	ACTAGACGCATGTCTAGAGTTT (SEQ ID NO: 88)
		MCF-Lj_Lc-R7	GCCAGTTACTACCTCTATCCT (SEQ ID NO: 15)
		Sondas: (fluoróforo en 5': ROX: fluoróforo en 3': BHQ2):	Sondas:
		MCF-LSP-T8_ROX-B2	AAGTCTGATGGAGCAACGCC (SEQ ID NO: 16)
		MCF-LSP-T11_ROX-B2	ACATTGGGACTGAGACACGG (SEQ ID NO: 90)
		MCF-LSP-T13_ROX-B2	AGGCTTACCAAGGCGATGAT (SEQ ID NO: 91)
		MCF-LJ_LC-T15_ROX-B2	

(continuación)			
Analito (organismo diana)	Gen diana	Cebadores, pares de cebadores y sondas no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
		MCF-LG-T16_ROX-B2	CGGCTTACCAAGGCAATGAT (SEQ ID NO: 92)
		<u>DIR</u> : HIN LG FW <u>DIR</u> : HIN LJ FW <u>DIR</u> : HIN LC FW	CGAGCTTGCCTAGATGAATTTG (SEQ ID NO: 97) GCCTATAGAAATTCTTCGGAATGGACA (SEQ ID NO: 98) GATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGA (SEQ ID NO: 99)
		<u>INV</u> : HIN LG RV	CTCTAGACATGCGTCTAGTG (SEQ ID NO: 100)
		<u>INV</u> : HIN LJ RV	CAAATGGTATCCCAGACTTAAGGG (SEQ ID NO: 101)
		<u>INV</u> : HIN LC RV	AGCTGATCATGCGATCTGCTTTC (SEQ ID NO: 102)
		Sondas (fluoróforo en 5': ROX; fluoróforo en 3': BHQ2):	Sondas: CGGCGGATGGGTGAGTAAC (SEQ ID NO: 103)
		MCF-Lj-Lc-T1_ROX-B2 MCF-Lg-T5_ROX-B2	CCAAGAGACTGGGATAACACCTG (SEQ ID NO: 105)

Tabla 6b. Cebadores y sondas no seleccionados para la detección de CVV y de tricomoniasis

Analito (organismo diana)	Gen diana	Sondas y cebadores no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
<i>Candida albicans</i>	ARNasa P ARN 1 (RPR1)	<u>DIR</u> : cand-CR1 <u>INV</u> : cand-CR5	CGGGTGGGAAATTCGGT (SEQ ID NO: 117) CAATGATCGGTATCGGGT (SEQ ID NO: 118)
		Sondas: alb-T-FAM-B1 cand-T-FAM-B 1 cand-Ta-FAM-B 1	Sondas: CAGCTTGTAGTAAAGAATTACTCAC (SEQ ID NO: 119) TTCGCATATTGCACTAAATAG (SEQ ID NO: 120) TTCGCATATTGCACTAAACAG (SEQ ID NO: 121)
<i>Candida albicans</i>	Topoisomerasa III	<u>DIR</u> : MenCa1377fw <u>INV</u> : MenCa1472rv <u>Sonda</u> : MenCa-T-FAM-B1	CAACGCCAACGAAGACAAG (SEQ ID NO: 122) CCAGCTTTGTTTGCATCAA (SEQ ID NO: 123) Sonda: AAAGCCGATGGTAGTAGAAAAGTGC (SEQ ID NO: 124)
<i>Candida albicans</i>	Topoisomerasa II	<u>DIR</u> : CABF59 <u>INV</u> : CABR110	TTGAACATCTCCAGTTTCAAAGGT (SEQ ID NO: 125) GTTGGCGTTGGCAATAGCTCTG (SEQ ID NO: 126)

(continuación)

Analito (organismo diana)	Gen diana	Sondas y cebadores no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
<i>Especies de Candida</i>	CHS1	DIR: Jorprimer1Fw INV: Jorprimer2Rv Sondas: JorCa-T-FAM-B1 JorCpara-T-FAM-B1 B1 JorCtro-T-FAM-B1	CGCCTCTTGATGGTGATGAT (SEQ ID NO: 127) TCCGGTATCACCTGGCTC (SEQ ID NO: 128) Sondas: CGTTCGTACTAGAGTTGTGTTGTTTGGAT (SEQ ID NO: 129) GAGGCTGTGATGTGTGCTGTTGACCAG (SEQ ID NO: 130) AGGCTTGCTCTTTGTGCGGGCGAGCGAACG (SEQ ID NO: 131)
<i>Especies de Candida</i>	TEF	Cebadores DIR: ECanG278 cand-CR1-NP-Ca cand-CR1-NP-CtCp RT-Ca_Cd-F2 RT-Ctro-F3 RT-Cpara-F4 Cebadores INV: ECanG401 ECanG401a Cand-CR5-NP-CaCt Cand-CR5-NP-Cp RT-Cdub-R4 Sondas: ECanG-TL1-O2-FAM-B1 cand-T-FAM-B 1 cand-Ta-FAM-B 1 RT-Ca_Cd_Cp-T1-FAM-B1 RT-Ctro-T4-FAM-B1 RT-Ca Cd-T2-	Cebadores DIR: CAGGTCACAGAGATTCATCAAG (SEQ ID NO: 132) GAAATTCGGTGGTACGCTCC (SEQ ID NO: 133) GAAATTCGGTGGTACTCTCC (SEQ ID NO: 134) GTTGTGACTCTTTCAATGCCCAA (SEQ ID NO: 135) GTTGTGACTCTTTCAACGCTCAA (SEQ ID NO: 136) GATGTGACTCCTTCAATGCTCAA (SEQ ID NO: 137) Cebadores INV: GTAAGCCAACAAAGCGTGTCTC (SEQ ID NO: 138) GAAAGCCAATAGAGCGTGTCTC (SEQ ID NO: 139) GATCGGTATCGGGTGCTTG (SEQ ID NO: 140) GATCGGTATCGGGTTCTTG (SEQ ID NO: 141) CAGCGTCACCGGATTTGAC (SEQ ID NO: 142) Sondas: TGATTATTGCTGGTGG (SEQ ID NO: 143) TTCGCATATTGCACTAAATAG (SEQ ID NO: 120)
		FAM-B1 RT-Cpar-T6-FAM-B1	TTCGCATATTGCACTAAACAG (SEQ ID NO: 121) TGCTTGTAATTCGACACTTTG (SEQ ID NO: 144) TGTAATTCGACACCTTGTTGA (SEQ ID NO: 145) TTGTAATTCGACACTTTGTTG (SEQ ID NO: 146) CGACACTTTGATTGAAAAGATTGAC (SEQ ID NO: 147)

(continuación)

Analito (organismo diana)	Gen diana	Sondas y cebadores no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
<i>Especies de Candida</i>	ITS2	<u>Cebadores DIR:</u> ITS2-Ca-Fow ITS2-Ctr-Fow ITS2-Cpar-Fow Cebadores INV: ITS2-Ca-Rev ITS2-Ctr-Rev ITS2-Cpar-Rev <u>Sondas:</u> ITS2-Ca-CFO-B1 ITS2-Ctr-CFO-B1 ITS2-Cpar-CFO-B1	Cebadores DIR: GGGTTTGCTTGAAAGACGGTA (SEQ ID NO: 148) CGTGGTAACTTATTTTAAGCG (SEQ ID NO: 149) GGGTTTGGTGTTGAGCGATAC (SEQ ID NO: 150) <u>Cebadores INV:</u> TTGAAGATATACGTGGTGGACGTTA (SEQ ID NO: 151) GCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTA (SEQ ID NO: 152) GGAGTTTGTACCAATGAGTGGAAA (SEQ ID NO: 153) <u>Sondas</u> ACCTAAGCCATTGTCAAAGCGATCCCG (SEQ ID NO: 154) TGGCCACCATTATTTTCATAACTTTGACC (SEQ ID NO: 155) CTCCGCCTTTCTTTCAAGCAAACCCAG (SEQ ID NO: 156)
<i>Candida glabrata</i>	ARNasa P ARN 1 (RPR1)	Cebadores DIR: gla-CR3 gla-CR3a <u>Cebador INV:</u> cand-CR5 <u>Sonda:</u> gla-T-FAM-B1	Cebadores DIR: GGCAACGGCTGGGAAT (SEQ ID NO: 157) AGCAACGGCTGGGAAT (SEQ ID NO: 158) Cebador INV: CAATGATCGGTATCGGGT (SEQ ID NO: 159) <u>Sonda:</u> TAAAGCCTCACCACGATTTTGACAC (SEQ ID NO: 160)
<i>Candida glabrata</i>	Topoisomerasa II	<u>Cebador DIR:</u> CGBF35 <u>Cebador INV:</u> CGBR77	CCCAAAAATGGCCGTAAGTATG (SEQ ID NO: 161) CTGCTTGAAAGAAATATCGGAGAC (SEQ ID NO: 162)
<i>Candida glabrata</i>	CHS1	<u>DIR:</u> Jorprimer1Fw <u>INV:</u> Jorprimer2Rv <u>Sonda:</u> JorCgla-T-FAM-B1	CGCCTCTTGATGGTGATGAT (SEQ ID NO: 127) TCCGGTATCACCTGGCTC (SEQ ID NO: 128) <u>Sonda:</u> CGACTGGTTGACGATAATCAGAGGAGATGGG (SEQ ID NO: 163)
<i>Candida glabrata</i>	TEF	<u>Cebadores DIR:</u> RT-Cgla-F5 RT-Cgla-F6 <u>Sonda:</u> RT-Cgla-T8-FAM-B1	Cebadores: ACCCACCAAAGGCTGCT (SEQ ID NO: 164) CGACCCACCAAAGGCTGCT (SEQ ID NO: 165) <u>Sonda:</u> ACTGTACACCCGCCACATT (SEQ ID NO: 166)
<i>Candida krusei</i>	ARNasa P ARN 1 (RPR1)	<u>Cebadores DIR:</u> cand-CR1 kru-CR1-SiT <u>Cebadores INV:</u> krus-CR5 Kru-CR5-NP2 <u>Sonda:</u> krus-T-FAM-B1	CGGGTGGAATTCGGT (SEQ ID NO: 117) ATAGAGTAGCTCGGTCCC (SEQ ID NO: 167) TAGTGATCGGTATCGAGTT (SEQ ID NO: 168) CGGTATCGAGTTTCCATG (SEQ ID NO: 169) <u>Sonda:</u> CCAAAGTTGTACAAGCAAGTACCA (SEQ ID NO: 170)

(continuación)

Analito (organismo diana)	Gen diana	Sondas y cebadores no seleccionados	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
<i>Candida krusei</i>	Topoisomerasa II (KANBE, 2002)	<u>DIR</u> : CKSF35 <u>INV</u> : CKSR57	GAGCCACGGTAAAGAATACACA (SEQ ID NO: 171) TTTAAAGTGACCCGGATACC (SEQ ID NO: 172)
<i>Candida krusei</i>	TEF	<u>Cebadores INV</u> : RT-Ckru-R5 SiT-Ckru-R10 <u>Sondas</u> : SiT- Ckru-T10-CFO- B1 SiT-Ckru-T9- CFO-B1	CTTTGGATGGTCTTCAACAGA (SEQ ID NO: 173) ATCACCAGACTTGACGG (SEQ ID NO: 174) Sondas: AGTCTGTTGAAGACCATCCA (SEQ ID NO: 175) ATGTAAGTTCGACGAATTAATC (SEQ ID NO: 176)
TV	Ap65-1	<u>Cebadores DIR</u> : NP.TV.MAX.FP1 SiT.TV.MAX.FP1 <u>Cebadores INV</u> : NP.TV.MAX.RP1 SiT.TV.MAX.RP1 <u>Sondas</u> : NP.TV.MAX.D1- T-FAM-B1 SiT.TV.MAX.D1- T-FAM-B1	TCTGGCAAGATCAAGGACAT (SEQ ID NO: 177) GAAGATTCTGGCAAGATCA (SEQ ID NO: 178) CATCTGTAACGACAATGCAGC (SEQ ID NO: 179) GACAATGCAGCGGAT (SEQ ID NO: 180) <u>Sondas</u> : AACTACCCACGCCAGGACAT (SEQ ID NO: 181) CCGCAACTACCCACGCCA (SEQ ID NO: 182)

En las tablas 7a y 7b se proporcionan una serie de mezclas maestras de cebadores y sondas que no se seleccionaron debido a una serie de propiedades no deseadas, incluida la señal de falso positivo y el fallo de detección de cepas variantes.

5

Tabla 7a. Mezclas maestras no seleccionadas para la detección de VB

ID de la mezcla maestra	Cebadores y sondas	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
Mezcla maestra I	<u>Cebadores</u> : BVAB2_585Fa BVAB2 666RA MCF-LJ_LC-F8 MCF-LG-F9 MCF-LSP-R6 MENAV248FW MENAV334RV MCF-GV-F6 MCF-GV-F7 MCF-GV-R2 MCF-GV-R4 MEGAE-456F MEGAE-667R	GCGGCTAGATAAGTGTGATGTTT (SEQ ID NO: 4) CTCTCCAGCACTCAAGCTAAA (SEQ ID NO: 5) TTAAAAGGCGGCGTAAGC (SEQ ID NO: 14) ACTAGACGCATGTCTAGAGTTT (SEQ ID NO: 88) GCCAGTTACTACCTCTATC (SEQ ID NO: 15) CCCTATCCGCTCCTGATACC (SEQ ID NO: 1) CCAAATATCTGCGCATTTCA (SEQ ID NO: 2) CCAGAATTTGATGGATAACATGCC (SEQ ID NO: 65) ATGGACAATATGCCAAGCCT (SEQ ID NO: 66) TTCAGTGCGGAAGTTACAGA (SEQ ID NO: 67) TTAACTGCTGAAGTAACGGA (SEQ ID NO: 69) GATGCCAACAGTATCCGTCCG (SEQ ID NO: 7) CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA (SEQ ID NO: 8)
	<u>Sondas</u> : BVAB2_613_641_FAM-B1 MCF-LSP-T11_ROX-B2 MCF-AV-T4_FAM-B1 MCF-GV-T3-CY5-B2 MCF-GV-T4-CY5-B2 MEGA_485-506-T-HEX-BHQ1	FAM-CAAGGCTTAACCTTGGGGTTCATTACAA- BHQ1 (SEQ ID NO: 6) ROX-AAGTCTGATGGAGCAACGCC-BHQ2 (SEQ ID NO: 16) FAM-TCCCCT ACCAGACTCAAGCCTGC-BHQ 1 (SEQ ID NO: 3) Cy5-ACAGCACTTTGCGCCGCC-BHQ2 (SEQ ID NO: 13) Cy5-ACAGCACTCTCGCCGCC-BHQ2 (SEQ ID NO: 70) HEX-GT ACCGTAAGAGAAAGCCACGG-BHQ1 (SEQ ID NO: 9)

(continuación)

ID de la mezcla maestra	Cebadores y sondas	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
Mezcla maestra II	Cebadores: BVAB2_585Fa BVAB2_666Ra MCF-Lj_Lc-F8 MCF-Lg-F9 MCF-Lsp-R6 MenAv248fw MenAv334rv MenGV981fW, MenGV1072rv MegaE-456F MegaE-667R	GCGGCTAGATAAGTGTGATGTTT (SEQ ID NO: 4) CTCTCCAGCACTCAAGCTAAA (SEQ ID NO: 5) TTAAAAGGCGGCGTAAGC (SEQ ID NO: 14) ACTAGACGCATGTCTAGAGTTT (SEQ ID NO: 88) GCCAGTTACTACCTCTATC (SEQ ID NO: 15) CCCTATCCGCTCCTGATACC (SEQ ID NO: 1) CCAAATATCTGCGCATTTCA (SEQ ID NO: 2) CGCATCTGCTAAGGATGTTG ID NO: (SEQ 106) CAGCAATCTTTTCGCCAACT (SEQ ID NO: 107) GATGCCAACAGTATCCGTCCG (SEQ ID NO: 7) CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA (SEQ ID NO: 8)
	Sondas: BVAB2_613_641_CFO-B1 MCF-Lsp-T11 ROX-B2	FAM-CAAGGCTTAACCTTGGGGTTCATTACAA-BHQ1 (SEQ ID NO: 6) ROX-AAGTCTGATGGAGCAACGCC-BHQ2 (SEQ ID NO: 16)
	MCF-Av-T4_FAM-B1 MenGV-T-ROX-B2 Mega_485-506-T-CFO-BHQ1	FAM-TCCCCTACCAGACTCAAGCCTGC-BHQ1 (SEQ ID NO: 3) ROX-TGCAACTATTTCTGCAGCAGATCC-BHQ2 (SEQ ID NO: 108) CFO-GT ACCGT AAGAGAAAGCCACGG-BHQ1 (SEQ ID NO: 9)
Mezcla maestra IIII	Cebadores: BVAB2_585Fa BVAB2_666Ra MCF-Lj_Lc-F8 MCF-Lg-F9 MCF-Lsp-R6 MenAv248fw MenAv334rv GVvlyfw2 GVvlyrv2 GVvlyfw2a GVvlyrv2a MegaE-456F MegaE-667R	GCGGCTAGATAAGTGTGATGTTT (SEQ ID NO: 4) CTCTCCAGCACTCAAGCTAAA (SEQ ID NO: 5) TTAAAAGGCGGCGTAAGC (SEQ ID NO: 14) ACTAGACGCATGTCTAGAGTTT (SEQ ID NO: 88) GCCAGTTACTACCTCTATC (SEQ ID NO: 15) CCCTATCCGCTCCTGATACC (SEQ ID NO: 1) CCAAATATCTGCGCATTTCA (SEQ ID NO: 2) GCCAACGATGATCGCGTAT (SEQ ID NO: 10) CAGGCTTGCGATATTGTCCAT (SEQ ID NO: 109) GCCAATAATGACCGCGTAT (SEQ ID NO: 11) CAAGCTCGGCATGTTATCCAT (SEQ ID NO: 60) GATGCCAACAGTATCCGTCCG (SEQ ID NO: 7) CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA (SEQ ID NO: 8)
	Sondas: BVAB2_613_641_CFO-B1 MCF-Lsp-T11_ROX-B2 MCF-Av-T4_FAM-B1 GVvly-T2-ROX-B2 GVvly-T2a-ROX-B2 Mega_485-506-T-CFO-BHQ1	FAM-CAAGGCTTAACCTTGGGGTTCATTACAA-BHQ1 (SEQ ID NO: 6) ROX-AAGTCTGATGGAGCAACGCC-BHQ2 (SEQ ID NO: 16) FAM-TCCCCTACCAGACTCAAGCCTGC-BHQ1 (SEQ ID NO: 3) ROX-CCCAGGTGCTCTTTTCCGTGCTGA-BHQ2 (SEQ ID NO: 110) ROX-CCCAGGTGCGTGTTCCGCGCTGA-BHQ2 (SEQ ID NO: 111) CFO-GT ACCGT AAGAGAAAGCCACGG-BHQ1 (SEQ ID NO: 9)

(continuación)

ID de la mezcla maestra	Cebadores y sondas	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
Mezcla maestra IV	Cebadores: BVAB2_585Fa BVAB2_666Ra MCF-Lj_Lc-F8 MCF-Lg-F9 MCF-Lsp-R6 MenAv248fw MenAv334rv GVvlyfw 1 GVvlyrv1 GVvlyfw1a MegaE-456F MegaE-667R	GCGGCTAGATAAGTGTGATGTTT (SEQ ID NO: 4) CTCTCCAGCACTCAAGCTAAA (SEQ ID NO: 5) TTAAAAGGCGGCGTAAGC (SEQ ID NO: 14) ACTAGACGCATGTCTAGAGTTT (SEQ ID NO: 88) GCCAGTTACTACCTCTATC (SEQ ID NO: 15) CCCTATCCGCTCCTGATACC (SEQ ID NO: 1) CCAAATATCTGCGCATTTCA (SEQ ID NO: 2) GGCGGCGAAAGTGCTGTA ID NO: (SEQ 59) AGCCGTTCACTGCGGAAGT (SEQ ID NO: 12) GGCGGCGAAAGTGCTGTC (SEQ ID NO: 112) GATGCCAACAGTATCCGTCCG (SEQ ID NO: 7) CCTCTCCGACACTCAAGTTCTGA (SEQ ID NO: 8)
	Sondas: BVAB2_613_641_CFO-B1	FAM-CAAGGCTTAACCTTGGGGTTCATTACAA-BHQ1 (SEQ ID NO: 6) ROX-AAGTCTGATGGAGCAACGCC-BHQ2 (SEQ ID NO: 16)
	MCF-Lsp-T11_ROX-B2 MCF-Av-T4_FAM-B1 GVvly-T1-ROX-B2 Gvly-T1a-ROX-B2 Mega_485-506-T-CFO-BHQ1	FAM-TCCCCTACCAGACTCAAGCCTGC-BHQ1 (SEQ ID NO: 3) ROX-TTCAGCGCCCAACCAAGAGCTCTGT -BHQ2(SEQ ID NO: 113) ROX-TTAAGCATCCAATAAGAGCTCTGT-BHQ2(SEQ ID NO: 114) CFO-GT ACCGT AAGAGAAAGCCACGG-BHQ1 (SEQ ID NO: 9)

Tabla 7b. Mezclas maestras no seleccionadas para la detección de CVV y tricomoniasis

ID de la mezcla maestra	Cebadores y sondas	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
Mezcla maestra I	SiT-Cgla-F8 RT-Cgla-R7 RT-Cgla-T7-Fam-B1 TV.MAX.FP1 TV.MAX.RP1 TV.MAXD1-T-ROX-B2 kru-CR1-SiT Kru-CR5-NP2 krus-T-FAM-B1 RT-Ca_Cd_Ct-F1 RT-Cpara-F4 RT-Ca_Ct-R3 RT-Cpar-R6 RT-Cdub-R4 RT-Ca_Cd_Cp-T1-FAM-B1 RT-Ctro-T4-FAM-B 1	CGAACAATTGACTGAAGGTTTG (SEQ ID NO: 20) CGGACTTCAAGAACTTTGGAGA (SEQ ID NO: 21) CTTGT AAGTTCGAAGAA TTGTTGGA (SEQ ID NO: 22) GAAGATTCTGGCAAGATCAAGGA (SEQ ID NO: 17) ACGACAATGCAGCGGATGT (SEQ ID NO: 18) ATCCTCCGCAACTACCCACGCCA (SEQ ID NO: 19) ATAGAGTAGCTCGGTCCC (SEQ ID NO: 167) CGGTATCGAGTTTCCATG (SEQ ID NO: 169) CCAAAGTTGTACAAGCAAGTACCA (SEQ ID NO: 170) CCACCAAAGGGTTGTGAC (SEQ ID NO: 23) GATGTGACTCCTTCAATGCTCAA (SEQ ID NO: 137) CAGCATCACCGGATTTGAC (SEQ ID NO: 24) CGGACTTGATGAATTTTGGTTCA (SEQ ID NO: 25) CAGCGTCACCGGATTTGAC (SEQ ID NO: 142) TGCTTGTAATTGACACTTTG (SEQ ID NO: 144) TGTAATTGACACCTTGGTTGA (SEQ ID NO: 145)

(continuación)

ID de la mezcla maestra	Cebadores y sondas	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
Mezcla maestra II	SiT-Cgla-F8 RT-Cgla-R7	CGAACAATTGACTGAAGGTTTG (SEQ ID NO: 20)
	RT-Cgla-T7-Fam-B1 TV.MAX.FP1	CGGACTTCAAGAACTTTGGAGA (SEQ ID NO: 21)
	TV.MAX.RP1 TV.MAXD1-T-ROX-B2 kru-CR1-SiT Kru-CR5-NP2 krus-T-FAM-B1 RT-Ca_Cd-F2 RT-Ctro-F3	CTTGTAAGTTCTGAAGAATTGTTGGA (SEQ ID NO: 22) GAAGATTCTGGCAAGATCAAGGA (SEQ ID NO: 17) ACGACAATGCAGCGGATGT (SEQ ID NO: 18) ATCCTCCGCAACTACCCACGCCA (SEQ ID NO: 19)
	RT-Cpara-F4 RT-Ca_Ct-R3 RT-Cpar-R6 RT-Cdub-R4 RT-Ca_Cd-T3-FAM-B1 RT-Ctro-T4-FAM-B1 RT-Cpar-T6-FAM-B1	ATAGAGTAGCTCGGTCCC (SEQ ID NO: 167) CGGTATCGAGTTTCCATG (SEQ ID NO: 169) CCAAAGTTGTACAAGCAAGTACCA (SEQ ID NO: 170) GTTGTGACTCTTTCAATGCCCAA (SEQ ID NO: 135) GTTGTGACTCTTTCAACGCTCAA (SEQ ID NO: 136) GATGTGACTCCTTCAATGCTCAA (SEQ ID NO: 137) CAGCATCACCGGATTTGAC (SEQ ID NO: 24) CGGACTTGATGAATTTTGGTTCA (SEQ ID NO: 25) CAGCGTCACCGGATTTGAC (SEQ ID NO: 142) TGCTTGTAATTCGACACTTTGGTTG (SEQ ID NO: 26) TGTAATTCGACACCTTGGTTGA (SEQ ID NO: 145) CGACACTTTGATTGAAAAGATTGAC (SEQ ID NO: 147)
Mezcla maestra III	SiT-Cgla-F8 RT-Cgla-R7 RT-Cgla-T7-Fam-B1 TV.MAX.FP1 TV.MAX.RP1 TV.MAXD1-T-ROX-B2 RT-Ckru-F7 RT-Ckru-R5 RT-Ckru-T9-FAM-B1 RT-Ca_Cd_Ct-F1 RT-Ca_Ct-R3 RT-Cpar-R6 RT-Ca_Cd_Cp-T1-FAM-B15	CGAACAATTGACTGAAGGTTTG (SEQ ID NO: 20) CGGACTTCAAGAACTTTGGAGA (SEQ ID NO: 21) CTTGTAAGTTCTGAAGAATTGTTGGA (SEQ ID NO: 22) GAAGATTCTGGCAAGATCAAGGA (SEQ ID NO: 17) ACGACAATGCAGCGGATGT (SEQ ID NO: 18) ATCCTCCGCAACTACCCACGCCA (SEQ ID NO: 19) GCAGCTTCCTTCAATGCTCAA (SEQ ID NO: 27) CTTTGGATGGTCTTCAACAGA (SEQ ID NO: 173) CATGTAAGTTTCGACGAATTAATCGA (SEQ ID NO: 29) CCACCAAAGGGTTGTGAC (SEQ ID NO: 23) CAGCATCACCGGATTTGAC (SEQ ID NO: 24) CGGACTTGATGAATTTTGGTTCA (SEQ ID NO: 25) TGCTTGTAATTCGACACTTTG (SEQ ID NO: 144)

(continuación)

ID de la mezcla maestra	Cebadores y sondas	Secuencias de cebador y sonda (5'-3')
Mezcla maestra IV	SiT-Cgla-F8 RT-Cgla-R7 RT-Cgla-T7-Fam-B1 TV.MAX.FP1 TV.MAX.RP1 TV.MAXD1-T-ROX-B2 RT-Ckru-F7 SiT-Ckru-R10 SiT-Ckru-T9-CFO-B1 RT-Ca_Cd_Ct-F1 RT-Ca_Ct-R3 RT-Ca Cd Cp-T1-FAM-B1	CGAACAATTGACTGAAGGTTTG (SEQ ID NO: 20) CGGACTTCAAGAACTTTGGAGA (SEQ ID NO: 21) CTTGTAAGTTCGAAGAATTGTTGGA (SEQ ID NO: 22) GAAGATTCTGGCAAGATCAAGGA (SEQ ID NO: 17) ACGACAATGCAGCGGATGT (SEQ ID NO: 18) ATCCTCCGCAACTACCCACGCCA (SEQ ID NO: 19) GCAGCTTCCTTCAATGCTCAA (SEQ ID NO: 27)
		ATCACCAGACTTGACGG (SEQ ID NO: 174) ATGTAAGTTTCGACGAATTAATC (SEQ ID NO: 176) CCACCAAAGGGTTGTGAC (SEQ ID NO: 23) CAGCATCACCGGATTTGAC (SEQ ID NO: 24) TGCTTGTAATTCGACACTTTG (SEQ ID NO: 144)
Mezcla maestra V	SiT-Cgla-F8 RT-Cgla-R7 RT-Cgla-T7-Fam-B1 TV.MAX.FP1 TV.MAX.RP1 TV.MAXD1-T-ROX-B2 RT-Ckru-F7 SiT-Ckru-R10a SiT-Ckru-T10-CFO-B1 RT-Ca_Cd_Ct-F1 RT-Ca_Ct-R3 RT-Ca_Cd_Cp-T1-FAM-B1	CGAACAATTGACTGAAGGTTTG (SEQ ID NO: 20) CGGACTTCAAGAACTTTGGAGA (SEQ ID NO: 21) CTTGTAAGTTCGAAGAATTGTTGGA (SEQ ID NO: 22) GAAGATTCTGGCAAGATCAAGGA (SEQ ID NO: 17) ACGACAATGCAGCGGATGT (SEQ ID NO: 18) ATCCTCCGCAACTACCCACGCCA (SEQ ID NO: 19) GCAGCTTCCTTCAATGCTCAA (SEQ ID NO: 27) ATCACCAGACTTGACAG (SEQ ID NO: 28) AGTCTGTTGAAGACCATCCA (SEQ ID NO: 175) CCACCAAAGGGTTGTGAC (SEQ ID NO: 23) CAGCATCACCGGATTTGAC (SEQ ID NO: 24) TGCTTGTAATTCGACACTTTG (SEQ ID NO: 144)

Un experto en la materia reconocerá que, para este y otros procesos y métodos divulgados en el presente documento, las funciones realizadas en los procesos y métodos se pueden implementar en diferente orden. Asimismo, las etapas y operaciones descritas solo se proporcionan como ejemplos, y algunas de las etapas y operaciones pueden ser opcionales, combinarse en menos etapas y operaciones, o expandirse en etapas y operaciones adicionales sin restar valor a la esencia de las realizaciones divulgadas.

Con respecto al uso de sustancialmente cualquier término plural y/o singular en el presente documento, los expertos en la materia pueden traducir del plural al singular y/o del singular al plural según sea apropiado al contexto y/o la aplicación. Las diversas permutaciones singular/plural se pueden exponer expresamente en el presente documento por razones de claridad.

Los expertos en la materia entenderán que, en general, los términos utilizados en el presente documento, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (por ejemplo, los cuerpos de las reivindicaciones adjuntas) en general se tiene la intención de que sean términos "abiertos" (por ejemplo, la expresión "que incluye" se debería interpretar como "que incluye pero sin limitación", la expresión "que tiene" se debería interpretar como "que tiene al menos", la expresión "que incluye" se debería interpretar como "que incluye pero sin limitación", etc.). Los expertos en la materia entenderán además que si se tiene la intención de un número específico de una mención de reivindicación introducida,

dicha intención se mencionará explícitamente en la reivindicación y, en ausencia de dicha mención, no existirá dicha intención. Por ejemplo, como ayuda para la comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de las expresiones introductorias "al menos una" y "una o más" para introducir citaciones de las reivindicaciones. Sin embargo, el uso de tales expresiones no debe interpretarse en el sentido de que la introducción de una mención de reivindicación por los artículos indefinidos "un" o "uno/a" limita cualquier reivindicación particular que contenga dicha mención de reivindicación introducida a las realizaciones que contengan solo una mención de este tipo, incluso cuando la misma reivindicación incluye las expresiones introductorias "uno/a o más" o "al menos uno/a" y artículos indefinidos tales como "un" o "uno/a" (por ejemplo, "un" y/o "uno/a" debe interpretarse como "al menos uno/a" o "uno/a o más"); lo mismo se aplica al uso de artículos definidos para introducir menciones de reivindicaciones. Además, incluso si se menciona explícitamente un número específico de una mención de reivindicación introducida, los expertos en la materia reconocerán que dicha mención debe interpretarse en el sentido de al menos el número mencionado (por ejemplo, la simple mención de "dos menciones", sin otros modificadores, significa al menos dos menciones o dos o más menciones). Asimismo, en aquellos casos en que una convención análoga a "al menos uno de A, B y C, etc." se utilice, en general, dicha construcción está pensada en el sentido de que un experto en la materia entendería la convención (por ejemplo, "un sistema que tiene al menos uno de A, B y C" incluiría, aunque sin limitación, 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 aquellos casos en que una convención análoga a "al menos uno de A, B o C, etc." se utilice, en general, dicha construcción está pensada en el sentido de que un experto en la materia entendería la convención (por ejemplo, "un sistema que tiene al menos uno de A, B o C" incluiría, aunque sin limitación, 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.). Los expertos en la materia entenderán además que prácticamente cualquier palabra y/o expresión disyuntiva que presente dos o más términos alternativos, ya sea en la descripción, en las reivindicaciones o en los dibujos, debe entenderse que contempla las posibilidades de incluir uno de los términos o expresiones, cualquiera de los términos o expresiones o ambos términos o expresiones. Por ejemplo, se entenderá que la expresión "A o B" incluye las posibilidades de "A" o "B" o "A y B".

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

Tal como entenderá el experto en la materia, para todos y cada uno de los fines, tal como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos divulgados en el presente documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como lo suficientemente descriptivo y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como ejemplo no limitante, cada intervalo analizado en el presente documento puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. También comprenderá un experto en la materia que términos lingüísticos tales como "hasta", "al menos", y similares incluyen el número citado y se refiere a los intervalos que posteriormente pueden desglosarse en subintervalos como se ha analizado anteriormente.

Siempre que se proporcione un intervalo de valores en el presente documento, el intervalo debe incluir el valor inicial, el valor final, cada valor individual o intervalo de valores entre ellos, a menos que se indique específicamente lo contrario. Por ejemplo, "de 0,2 a 0,5" significa 0,2, 0,3, 0,4, 0,5; intervalos intermedios tales como 0,2-0,3, 0,3-0,4, 0,2-0,4; incrementos intermedios tales como 0,25, 0,35, 0,225, 0,335, 0,49; intervalos de incrementos intermedios tales como 0,26-0,39; y similares. Como otro ejemplo, un grupo que tiene 1 a 3 células se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 células. Asimismo, un grupo que tiene 1 a 5 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 células y así sucesivamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Paquette, Nancy
Tremblay, Marie-Helene
Tremblay, Simon
Therrien, Roseline
Belley-Montfort, Lucile
Fortin, Marie-Christine
Cantin, Dany
Roger-Dalbert, Celine

<120> DETECCIÓN MÚLTIPLE DE LA CANDIDOSIS VULVOVAGINAL, LA TRICOMONIASIS Y LA VAGINOSIS BACTERIANA

<130> GENOM.143WO/P-10951.70

<150> 62/152.754

<151> 24/04/2015

	<150> 62/279.220	
	<151> 15/01/2016	
	<160> 182	
5	<170> FastSEQ para Windows versión 4.0	
	<210> 1	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 1	
	ccctatccgc tcctgatacc	20
	<210> 2	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 2	
	ccaaatatct gcgcatttca	20
30	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 3	
	tcccctacca gactcaagcc tgc	23
40	<210> 4	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 4	
50	gcggctagat aagtgtgatg ttt	23
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 5	
	ctctccagca ctcaagctaa a	21
	<210> 6	
	<211> 28	
65	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 6	
	caaggcttaa ccttggggtt cattaca	28
	<210> 7	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 7	
	gatgccaaaca gtatccgtcc g	21
20	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
30	cctctccgac actcaagttc ga	22
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 9	
40	taccgtaaga gaaagccacg g	21
	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 10	
	gccaacgatg atcgcgtat	19
	<210> 11	
	<211> 19	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 11	
	gccaataatg accgcgtat	19
	<210> 12	

	<211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 12 agccgttcac tgcggaagt	19
10	<210> 13 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 13 acagcacttt cgccgcc	17
20	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 14 ttaaaaggcg gcgtaagc	18
35	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 15 gccagttact acctctatc	19
45	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 16 aagtctgatg gagcaacgcc	20
55	<210> 17 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 17 gaagattctg gcaagatcaa gga	23

5	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 18 acgacaatgc agcggatgt	19
15	<210> 19 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 19 atcctccgca actaccacg cca	23
25	<210> 20 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 20 cgaacaattg actgaagggt tg	22
35	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 21 cggacttcaa gaactttgga ga	22
45	<210> 22 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 22 cttgtaagtt cgaagaattg ttgga	25
55	<210> 23 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 23	
65		

	ccaccaaagg gttgtgac	18
5	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 24 cagcatcacc ggatttgac	19
15	<210> 25 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 25 cggacttgat gaattttggt tca	23
25	<210> 26 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 26 tgcttgtaaa ttcgacactt tggttg	26
40	<210> 27 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 27 gcagcttcct tcaatgctca a	21
50	<210> 28 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 28 atcaccagac ttgacag	17
60	<210> 29 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 29 catgtaagtt cgacgaatta atcga	25
5	<210> 30 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 30 ggcatggagg ttgtcccatt tgtg	24
15	<210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 31 ggatctagcc gtgtgccgc t	21
30	<210> 32 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 32 ttgatgcctc ttcacattgc tccaccttc ct	32
40	<210> 33 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 33 gttaggtcag gagttaaatc tg	22
50	<210> 34 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 34 tcatggccca gaagacc	17
60	<210> 35 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 35 tcgtggccca gaaggcc	17
10	<210> 36 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 36 ccctggtagt cctagct	17
20	<210> 37 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 37 ccctggtagt cctagcc	17
30	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 38 cggcacggaa agtataatct	20
45	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 39 ggtgaagcag tggaaacact	20
55	<210> 40 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 40 ttcgtttctg ctgcgcga	18
	<210> 41 <211> 18	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 41	
	gcagcccagg acataagg	18
10	<210> 42	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 42	
	attcgcttct gctcgcgca	19
20	<210> 43	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 43	
	gcagggacga ggccgcaa	18
30	<210> 44	
	<211> 17	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 44	
	tcatggccca gaagacc	17
	<210> 45	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 45	
	cggattcatt gggcgtaaa	19
	<210> 46	
55	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 46	
	cgcctcagcg tcagt	15

5	<210> 47	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 47	
	cggattcatt gggcgtaaa	19
	<210> 48	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 48	
20	acacctagtg tccatcgttt a	21
	<210> 49	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 49	
	ccttcgggtt gtaaaccg	18
	<210> 50	
30	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 50	
	cgcctcagcg tcagt	15
	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 51	
	aggcggctag ataagtgtga	20
45	<210> 52	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 52	
55		
60		

	tcctctccag cactcaagct aa	22
5	<210> 53 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 53 ttaaccttgg ggttcattac aa	22
15	<210> 54 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 54 aattcagtct cctgaatcgt caga	24
25	<210> 55 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 55 aggcggctag ataagtgtga	20
35	<210> 56 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 56 cgtgtaggcg gctagataag tg	22
45	<210> 57 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 57 gaatacttat tgtgttaact gcgc	24
55	<210> 58 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 58 aagttcgcaca gtttccgtcc cctc	24
5	<210> 59 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 59 ggcggcgaaa gtgctgta	18
20	<210> 60 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 60 caagctcggc atgttatcca t	21
35	<210> 61 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 61 ggaaacgggt ggtaatgctg g	21
50	<210> 62 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 62 cgaagcctag gtgggccatt	20
65	<210> 63 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
75	<400> 63 ttactggtgt atcactgtaa gg	22
80	<210> 64 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 64 ccgtcacagg ctgaacagt	19
10	<210> 65 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 65 ccagaatttg atggataaca tgcc	24
20	<210> 66 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 66 atggacaata tgccaagcct	20
30	<210> 67 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 67 ttcactgcgg aagttacaga	20
40	<210> 68 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 68 ttaactgcgg aagtaacgga	20
50	<210> 69 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 69 ttaactgctg aagtaacgga	20
60	<210> 70 <211> 17 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 70 acagcactct cgccgcc	17
10	<210> 71 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 71 gatagaggta gtaactggcc tttta	24
20	<210> 72 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 72 ctttgtatct ctacaaatgg cacta	25
30	<210> 73 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 73 cgagcttgcc tagatgaatt tg	22
40	<210> 74 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 74 ctctagacat gcgtctagtg	20
55	<210> 75 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 75 gatttacttc ggtaatgacg ttagga	26
	<210> 76	

	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 76		
	agctgatcat gcgatctgct ttc	23	
10	<210> 77		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 77		
20	gcctatagaa attcttcgga atggaca	27	
	<210> 78		
	<211> 24		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
30	<400> 78		
	caaatggtat cccagactta aggg	24	
	<210> 79		
	<211> 18		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
40	<400> 79		
	gtcgagcgag cttgccta	18	
	<210> 80		
45	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 80		
	gaactaacag atttacttcg gtaatg	26	
55	<210> 81		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 81		
	aaactctaga catgcgtcta gt	22	

5	<210> 82 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 82 gtttccaaat ggtatcccag a	21
15	<210> 83 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 83 gcctagatga atttgggtgct t	21
25	<210> 84 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 84 cgagcttgcc tatagaaatt ctt	23
35	<210> 85 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 85 gaactaacag atttacttcg gtaatg	26
45	<210> 86 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 86 aaactctaga catgcgtcta gt	22
55	<210> 87 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<210> 87 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 87 gtttccaaat ggtatcccag a	21
5	<210> 88 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 88 actagacgca tgtctagagt tt	22
15	<210> 89 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 89 tgcattagct agttggtaag gtaac	25
25	<210> 90 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 90 acattgggac tgagacacgg	20
35	<210> 91 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 91 aggcttacca aggcatgat	20
45	<210> 92 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 92 cggcttacca aggcaatgat	20
55	<210> 93 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 93	
5	tgcathtagct agttggttaag gtaac	25
	<210> 94	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 94	
15	acattggggac tgagacacgg	20
	<210> 95	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 95	
	aggcttacca aggcgatgat	20
	<210> 96	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 96	
	cggcttacca aggcaatgat	20
	<210> 97	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 97	
	cgagcttgcc tagatgaatt tg	22
50	<210> 98	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 98	
60	gcctatagaa attcttcgga atggaca	27
	<210> 99	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 99 gatttacttc ggtaatgacg ttagga	26
10	<210> 100 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 100 ctctagacat gcgtctagtg	20
20	<210> 101 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 101 caaatggtat cccagactta aggg	24
30	<210> 102 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 102 agctgatcat gcgatctgct ttc	23
45	<210> 103 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 103 cggcggatgg gtgagtaac	19
55	<210> 104 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 104 cggcggatgg gtgagtaac	19
65	<210> 105 <211> 23 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 105	
	ccaagagact gggataacac ctg	23
10	<210> 106	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 106	
	cgcatctgct aaggatgttg	20
20	<210> 107	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 107	
	cagcaatctt ttcgccaact	20
30	<210> 108	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 108	
	tgcaactatt tctgcagcag atcc	24
40	<210> 109	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 109	
	caggcttggc atattgtcca t	21
55	<210> 110	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 110	
	cccaggtgct cttttccgtg ctga	24
	<210> 111	

	<211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 111 cccaggtgcg ctgttccgcg ctga	24
10	<210> 112 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 112 ggcggcgaaa gtgctgtc	18
25	<210> 113 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 113 ttcagcgccc aaccaagagc tctgt	25
35	<210> 114 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 114 ttaagcatcc aactaagagc tctgt	25
45	<210> 115 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 115 tcttcggaat ggacatagat acaagcta	28
55	<210> 116 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
65	<400> 116 atccgccgct cgcttt	16

5	<210> 117	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 117	
	cggggtgggaa attcgggt	17
	<210> 118	
	<211> 18	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 118	
20	caatgatcgg tatcgggt	18
	<210> 119	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 119	
	cagctttag taaagaatta ctcac	25
	<210> 120	
35	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 120	
	ttcgcattt gcactaaata g	21
	<210> 121	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 121	
	ttcgcattt gcactaaaca g	21
50	<210> 122	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 122	
	<210> 122	
	<211> 19	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 122	

	caacgccaac gaagacaag	19
5	<210> 123 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 123 ccagctttgt ttgcatcaa	19
15	<210> 124 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 124 aaagccgatg gtagtagaaa actgc	25
25	<210> 125 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 125 ttgaacatct ccagtttcaa aggt	24
35	<210> 126 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 126 gttggcgttg gcaatagctc tg	22
45	<210> 127 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 127 cgcctcttga tggatgatgat	20
55	<210> 128 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 128 tccggtatca cctggctc	18
5	<210> 129 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 129 cgttcgtact agagttgtgt tgttttggat	30
15	<210> 130 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 130 gaggctgtga tgtgtgctgt tgaccag	27
25	<210> 131 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 131 aggcttgctc tttgtcgggc gagcgaacg	29
35	<210> 132 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 132 caggtcacag agatttcac aag	23
45	<210> 133 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 133 gaaattcggg ggtacgctcc	20
55	<210> 134 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60		

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 134 gaaattcggg ggtactctcc	20
10	<210> 135 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 135 gttgtgactc tttcaatgcc caa	23
20	<210> 136 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 136 gttgtgactc tttcaacgct caa	23
30	<210> 137 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 137 gatgtgactc cttcaatgct caa	23
40	<210> 138 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 138 gtaagccaac aaagcgtggt ctc	23
55	<210> 139 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 139 gaaagccaat agagcgtggt ctc	23
	<210> 140 <211> 19 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 140	
	gacgcgtatc gggcgcttg	19
10	<210> 141	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 141	
	gacgcgtatc ggggttcttg	19
20	<210> 142	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 142	
30	cagcgtcacc ggatttgac	19
	<210> 143	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 143	
40	tgattattgc tgggtgg	16
	<210> 144	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 144	
	tgcttgtaaa ttcgacactt tg	22
	<210> 145	
	<211> 23	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 145	
	tgtaaattcg acaccttggt tga	23
	<210> 146	

	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 146		
	ttgtaaattc gacactttgg ttg	23	
10	<210> 147		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 147		
20	cgacactttg attgaaaaga ttgac	25	
	<210> 148		
	<211> 21		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
30	<400> 148		
	gggtttgctt gaaagacggt a	21	
	<210> 149		
	<211> 21		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
40	<400> 149		
	cgtggtaact tattttaagc g	21	
	<210> 150		
45	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 150		
	gggtttggtg ttgagcgata c	21	
55	<210> 151		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 151		
65	ttgaagatat acgtggtgga cgтта	25	

5	<210> 152	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 152	
	gcttaagttc agcgggtagt ccta	24
	<210> 153	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 153	
20	ggagtttgta ccaatgagtg gaaa	24
	<210> 154	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 154	
	acctaagcca ttgtcaaagc gatcccg	27
	<210> 155	
30	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 155	
	tggccaccat ttatttcata actttgacc	29
	<210> 156	
	<211> 27	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 156	
	ctccgccttt ctttcaagca aacccag	27
45	<210> 157	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 157	
	<210> 157	
	<211> 16	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 157	

	ggcaacggct gggaaat	16
5	<210> 158 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 158 agcaacggct gggaaat	16
15	<210> 159 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 159 caatgatcgg tatcgggt	18
25	<210> 160 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 160 taaagcctca ccacgatttt gacac	25
40	<210> 161 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 161 cccaaaaatg gccgtaagta tg	22
50	<210> 162 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 162 ctgcttgaaa gaaatatcgg agac	24
60	<210> 163 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 163 cgactggttg acgataatca gaggagatgg g	31
5	<210> 164 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 164 acccaccaaa ggctgct	17
15	<210> 165 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 165 cgacccacca aaggctgct	19
25	<210> 166 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 166 actgtcacac cgcccacatt	20
35	<210> 167 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 167 atagagtagc tcggtccc	18
	<210> 168 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 168 tagtgatcgg tatcgagtt	19
60	<210> 169 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 169	
5	cggtatcgag tttccatg	18
	<210> 170	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 170	
15	ccaaagttgt acaagcaagt acca	24
	<210> 171	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 171	
	gagccacggt aaagaataca ca	22
	<210> 172	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 172	
	tttaaagtga cccggatacc	20
40	<210> 173	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 173	
	ctttggatgg tcttcaacag a	21
50	<210> 174	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 174	
60	atcaccagac ttgacgg	17
	<210> 175	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 175 agtctgttga agaccatcca	20
10	<210> 176 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 176 atgtaagttc gacgaattaa tc	22
20	<210> 177 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 177 tctggcaaga tcaaggacat	20
30	<210> 178 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 178 gaagattctg gcaagatca	19
40	<210> 179 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 179 catctgtaac gacaatgcag c	21
50	<210> 180 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 180 gacaatgcag cggat	15
60	<210> 181 <211> 20 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 181	
	aactaccac gccaggacat	20
10	<210> 182	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 182	
	ccgcaactac ccacgcca	18
20		

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2, que comprende:

poner en contacto una muestra biológica con una pluralidad de pares de cebadores, en donde la pluralidad de pares de cebadores comprende:

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 14 o a la SEQ ID NO: 15,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de BVAB2, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 4 o a la SEQ ID NO: 5,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 7 o a la SEQ ID NO: 8,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *Gardnerella vaginalis*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12 o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12, y

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 1 o a la SEQ ID NO: 2;

generar amplicones de las secuencias del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, BVAB2, *Megasphaera* de tipo 1, y/o *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii*, y/o amplicones de la secuencia del gen *vly* de *Gardnerella vaginalis* de dicha muestra biológica, si dicha muestra comprende uno o más de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2; y

determinar la presencia o la cantidad de uno o más productos amplificados como indicación de la presencia de uno o más de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2 en dicha muestra biológica.

2. El método de la reivindicación 1, en donde

el par de cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii* consisten en las secuencias de SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente;

el par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de BVAB2 consisten en las secuencias de SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente;

el par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1 consisten en las secuencias de SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente;

el par de cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *Gardnerella vaginalis* consisten en las secuencias de:

a) SEQ ID NO: 10 y 12, respectivamente o

b) SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente;

y el par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae* consisten en las secuencias de SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente.

3. El método de una cualquiera de la reivindicación 2, en donde determinar la presencia o la cantidad de uno o más productos amplificados comprende poner en contacto los productos amplificados con una pluralidad de sondas oligonucleotídicas, en donde cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16.

4. Una composición para la detección de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* de tipo 1 y BVAB2, que comprende:

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 14 o a la SEQ ID NO: 15,

al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de BVAB2, en donde cada cebador

- en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 4 o a la SEQ ID NO: 5, al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 7 o a la SEQ ID NO: 8,
- al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *Gardnerella vaginalis*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12 o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 a 12, y
- al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae*, en donde cada cebador en dicho al menos un par de cebadores consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a la SEQ ID NO: 1 o a la SEQ ID NO: 2.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde
- el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con los genes del ARNr 16S de *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenii* comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15;
- el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *BVAB2a* comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 4 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 5;
- el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Megasphaera* de tipo 1 comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8;
- el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen *vly* de *Gardnerella vaginalis* comprende: (a) un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12, o (b) un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 11 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12; y
- el al menos un par de cebadores capaces de hibridarse con el gen del ARNr 16S de *Atopobium vaginae* comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2.
6. La composición de la reivindicación 5, que comprende además una pluralidad de sondas oligonucleotídicas, comprendiendo cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha muestra biológica es una muestra clínica o en donde dicha muestra biológica se recoge de la uretra, pene, ano, garganta, cuello uterino o vagina.
8. El método de la reivindicación 3, en donde determinar la presencia o la cantidad de uno o más productos amplificados comprende poner en contacto los productos amplificados con una pluralidad de sondas oligonucleotídicas, consistiendo cada una en una secuencia de SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 o 16, o una secuencia que tiene un emparejamiento incorrecto con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16.
9. El método de la reivindicación 3 u 8, en donde determinar la presencia o la cantidad de uno o más productos amplificados comprende poner en contacto los productos amplificados con cinco sondas oligonucleotídicas, consistiendo cada una en las secuencias de SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16, respectivamente.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 9, en donde cada cebador está flanqueado por secuencias complementarias que comprenden un fluoróforo en el extremo 5' y un inactivador de fluorescencia en el extremo 3'.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 y 8 a 9, en donde al menos una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas comprende una fracción emisora de fluorescencia y una fracción inactivadora de fluorescencia.
12. La composición de la reivindicación 6, consistiendo cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas en las secuencias de SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13 y 16, respectivamente.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y 12, en donde al menos una de la pluralidad de sondas comprende una fracción emisora de fluorescencia y una fracción inactivadora de fluorescencia.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y 12 a 13, que comprende además una ADN polimerasa, cationes bivalentes, iones potasio de catión monovalente o una combinación de los mismos.