

POLINUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/669,236 presentada el 9 de mayo de 2018 y la solicitud no provisional estadounidense n.º 15/976,733 presentada el 10 de mayo de 2018, cuyas descripciones se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó a través del sistema de presentación electrónica EFS-Web y se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Dicha copia ASCII, creada el 8 de mayo de 2019, se denomina TSM-045WO_CRF_sequencelisting.txt y tiene un tamaño de 29.937 bytes.

15

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente invención hace referencia a los campos de la biología molecular y la química de los ácidos nucleicos. La invención proporciona métodos y reactivos para detectar patógenos, tales como *Chlamydia trachomatis* y, por consiguiente, también se refiere a los campos del diagnóstico y pronóstico médico. En particular, la invención se refiere a polinucleótidos y métodos para amplificar y detectar *Chlamydia trachomatis*.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] Existe una necesidad urgente de desarrollar una plataforma de diagnóstico para infecciones de transmisión sexual (ITS) en el punto de atención (POC, por sus siglas en inglés) donde ingrese la muestra y salga el resultado, que sea rápida y asequible. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 499 millones de casos nuevos de ITS curables, a saber, las debidas a *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Trichomonas vaginalis* (TV) y sífilis se producen cada año en todo el mundo en hombres y mujeres de 15 a 49 años de edad, provocando una morbilidad significativa. Las infecciones gonocócicas y por clamidia no tratadas en mujeres

25

30

del África subsahariana se han implicado como la causa de hasta el 85 % de la infertilidad entre las mujeres que buscan una intervención para la infertilidad.

[0005] *La C. trachomatis* es responsable de la infección de transmisión sexual más común en los EE. UU. La clamidia puede causar uretritis en los hombres y enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico e infertilidad en las mujeres. Las infecciones asintomáticas son comunes tanto en hombres como en mujeres, lo que justifica exámenes para prevenir la propagación de la enfermedad (según lo recomendado por el CDC).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0006] La Figura 1 identifica secuencias de polinucleótidos marcadas, o balizas moleculares, que son capaces de unirse al amplicón producido a partir de cada conjunto de cebadores.

COMPENDIO

[0007] La presente invención abarca, en algunas modalidades, una composición que comprende un conjunto de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste en el Conjunto-1 al Conjunto-81. En algunas modalidades, la composición comprende además una sonda. En algunas modalidades, la sonda comprende un marcador. En algunas modalidades, la sonda es un polinucleótido marcado.

En una implementación preferida, el marcador es un fluoróforo, que preferiblemente está unido covalentemente a un extremo del polinucleótido. En una modalidad particularmente preferida, la sonda o polinucleótido es una baliza molecular que comprende un fluoróforo, un inactivador y un polinucleótido. En una modalidad, el fluoróforo es FAM y el inactivador es BHQ1. En una implementación alternativa, el fluoróforo es ATTO 565 o Alexa 594 y el inactivador es BHQ1 o BHQ2.

[0008] En algunas implementaciones, la composición comprende un polinucleótido marcado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 5-34 de SEQ ID NO: 97, los nucleótidos 5-31 de la SEQ ID NO: 98, los nucleótidos 3-31 de la SEQ ID NO: 99, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 100, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 101, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 102, los nucleótidos 5-26 de la SEQ ID NO: 103, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 104, los nucleótidos 7-30 de la SEQ ID NO: 105, los nucleótidos 5-27 de la SEQ ID NO: 106, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 107, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 108, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 109, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 110, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 111, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 112, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 113, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 114, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO:

115, los nucleótidos 4-28 de la SEQ ID NO: 116 y los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 117, los nucleótidos 8-28 de la SEQ ID NO: 118, los nucleótidos 8-30 de la SEQ ID NO: 119, los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 120, los nucleótidos 4-33 de la SEQ ID NO: 121, los nucleótidos 7-34 de la SEQ ID NO: 122, los nucleótidos 9-34 de la SEQ ID NO: 123, los nucleótidos 8-34 de la SEQ ID NO: 124, los nucleótidos 6-28 de la SEQ ID NO: 125, los nucleótidos 7-28 de la SEQ ID NO: 126, los nucleótidos 3-27 de la SEQ ID NO: 127, los nucleótidos 7-32 de la SEQ ID NO: 128, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 129, los nucleótidos 6-27 de la SEQ ID NO: 130 y los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 131. En otras implementaciones, el polinucleótido marcado puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 97 a 131. En determinadas implementaciones, la secuencia del polinucleótido marcado se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 97 a 131. En otras modalidades, la secuencia del polinucleótido marcado se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 97 a 131.

[0009] En algunas modalidades, el conjunto de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en Conjunto-12, Conjuntos 14-27, Conjunto-39, Conjuntos 41-54, Conjunto-66 y Conjuntos 68-81, y la composición comprende un polinucleótido marcado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 5-26 de la SEQ ID NO: 103, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 104, los nucleótidos 7-30 de la SEQ ID NO: 105, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 107, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 108, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 109, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 111, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 114, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 115, los nucleótidos 4-28 de la SEQ ID NO: 116, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 117, los nucleótidos 8-28 de la SEQ ID NO: 118, los nucleótidos 8-30 de la SEQ ID NO: 119, los nucleótidos 9-34 de la SEQ ID NO: 123, los nucleótidos 8-34 de la SEQ ID NO: 124, los nucleótidos 7-32 de la SEQ ID NO: 128 y los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 129. En algunas implementaciones, el polinucleótido marcado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 128 y SEQ ID NO: 129. En algunas implementaciones, la secuencia del polinucleótido marcado es la SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 128 y SEQ ID NO: 129. En una implementación preferida, la secuencia del polinucleótido marcado es la SEQ ID NO: 115, y el conjunto de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en el Conjunto-20,

Conjunto-24, Conjunto-47, Conjunto-51, Conjunto-74 y Conjunto-78. Incluso más preferiblemente, el conjunto de polinucleótidos es el Conjunto-20 o Conjunto-24.

[0010] En incluso otra modalidad, el conjunto de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en los Conjuntos 12-27, Conjuntos 39-54 y Conjuntos 66-81, y la composición comprende un polinucleótido marcado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 5-34 de la SEQ ID NO: 97, los nucleótidos 5-31 de la SEQ ID NO: 98, los nucleótidos 3-31 de la SEQ ID NO: 99, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 100, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 101, los nucleótidos 5-27 de la SEQ ID NO: 106, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 110, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 112, los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 120, los nucleótidos 4-33 de la SEQ ID NO: 121 y los nucleótidos 7-34 de la SEQ ID NO: 122. Más particularmente, el polinucleótido marcado puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 122. En determinadas implementaciones, la secuencia del polinucleótido marcado se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 122.

[0011] En una implementación, el conjunto de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en el Conjunto-12, Conjuntos 14-18, Conjunto-20, Conjunto-24, Conjunto-27, Conjunto-39, Conjuntos 41-45, Conjunto-47, Conjunto-51, Conjunto-54, Conjunto-66, Conjuntos 68-72, Conjunto 74, Conjunto-78 y Conjunto-81, y la composición comprende un polinucleótido marcado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 6-28 de la SEQ ID NO: 125 y los nucleótidos 7-28 de la SEQ ID NO: 126. En determinadas implementaciones, el polinucleótido marcado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 125 y la SEQ ID NO: 126. En algunas modalidades, la secuencia del polinucleótido marcado es la SEQ ID NO:125 o la SEQ ID NO: 126.

[0012] En otra implementación, el conjunto de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en los Conjuntos 14-27, Conjuntos 41-54 y los Conjuntos 68-81, y la composición comprende un polinucleótido marcado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 113 y los nucleótidos 3-27 de la SEQ ID NO: 127. En algunas modalidades, el polinucleótido marcado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 113 y la SEQ ID NO: 127. En otras modalidades, la secuencia del polinucleótido marcado es la SEQ ID NO:113 o la SEQ ID NO: 127.

[0013] En incluso otra modalidad, el conjunto de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en los Conjuntos 12-20, Conjuntos 22-27, Conjuntos 39-47, Conjuntos 49-54, Conjuntos 66-74 y Conjuntos 76-81, y la composición comprende un polinucleótido marcado que comprende los nucleótidos 6-27 de la SEQ ID NO: 130. En algunas implementaciones, el polinucleótido marcado comprende la SEQ ID NO: 130. En otras modalidades, la secuencia del polinucleótido marcado es la SEQ ID NO: 130.

[0014] En una implementación, el conjunto de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en el Conjunto-13, Conjunto-40 y Conjunto-67, y la composición comprende un polinucleótido marcado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 102 y los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 131. En dicha modalidad, el polinucleótido marcado puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 102 y la SEQ ID NO: 131. En otra modalidad, la secuencia del polinucleótido marcado es la SEQ ID NO: 102 o la SEQ ID NO: 131.

[0015] Otro aspecto de la invención proporciona balizas moleculares que comprenden un fluoróforo, un inactivador y un polinucleótido, en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 5-34 de la SEQ ID NO: 97, los nucleótidos 5-31 de la SEQ ID NO: 98, los nucleótidos 3-31 de la SEQ ID NO: 99, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 100, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 101, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 102, los nucleótidos 5-26 de la SEQ ID NO: 103, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 104, los nucleótidos 7-30 de la SEQ ID NO: 105, los nucleótidos 5-27 de la SEQ ID NO: 106, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 107, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 108, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 109, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 110, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 111, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 112, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 113, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 114, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 115, los nucleótidos 4-28 de la SEQ ID NO: 116, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 117, los nucleótidos 8-28 de la SEQ ID NO: 118, los nucleótidos 8-30 de la SEQ ID NO: 119 y los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 120.

[0016] Incluso otro aspecto de la invención proporciona métodos para detectar *Chlamydia trachomatis* en una muestra de prueba, donde el método comprende (a) extraer ácido nucleico de la muestra de prueba, (b) amplificar una secuencia diana haciendo reaccionar el ácido nucleico extraído en la etapa (a) con una mezcla de reacción que comprende una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y un conjunto de cebadores específicos de secuencia, en donde dicho conjunto de cebadores específicos de secuencia se selecciona del grupo que consiste en el Conjunto-1 al Conjunto-81, y (c) detectar la presencia o ausencia de un producto amplificado

de la etapa (b); en donde la presencia de dicho producto de amplificación es indicativa de la presencia de *Chlamydia trachomatis* en la muestra de prueba. En una modalidad, la amplificación de la etapa (b) de la secuencia diana se realiza a entre alrededor de 60 °C y alrededor de 67 °C durante menos de 30 minutos. Preferiblemente, la etapa de amplificación se realiza durante menos de quince minutos, menos de diez minutos o menos de seis minutos. En algunas implementaciones, la mezcla de reacción comprende además una transcriptasa inversa. En algunas implementaciones, la *Chlamydia trachomatis* está presente en la muestra de prueba a una concentración de ≤ 100 IFU/mL, ≤ 50 IFU/mL, ≤ 5 IFU/mL o incluso ≤ 2 IFU/mL. En una implementación, la *Chlamydia trachomatis* está presente en la muestra de prueba a una concentración de ≤ 5 IFU/mL y la etapa de amplificación se realiza durante menos de 15 minutos. En otra implementación, la *Chlamydia trachomatis* está presente en la muestra de prueba a una concentración de ≤ 10 IFU/mL y la etapa de amplificación se realiza durante menos de seis minutos.

[0017] En determinadas modalidades, detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación comprende hibridar el producto amplificado con una sonda que comprende un polinucleótido unido a un marcador. En una implementación preferida, el marcador es un fluoróforo, que preferiblemente está unido covalentemente a un extremo del polinucleótido. En una modalidad particularmente preferida, la sonda o polinucleótido es una baliza molecular que comprende un fluoróforo, un inactivador y un polinucleótido. En una modalidad, el fluoróforo es FAM y el inactivador es BHQ1. En una implementación alternativa, el fluoróforo es ATTO 565 o Alexa 594 y el inactivador es BHQ1 o BHQ2. Este método se puede llevar a la práctica mediante el uso de cualquier combinación de conjunto de cebadores y polinucleótido marcado, por ejemplo, baliza molecular, descritos en el presente documento. La Figura 1 identifica secuencias de polinucleótidos marcados, o balizas moleculares, que son capaces de unirse al amplicón resultante de cada conjunto de cebadores y, por lo tanto, son útiles para detectar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en una muestra de prueba.

[0018] Incluso otro aspecto de la invención proporciona kits que comprenden las composiciones que comprenden un conjunto de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste en el Conjunto-1 al Conjunto-81. En algunas modalidades, el kit comprende además una polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y, opcionalmente, una transcriptasa inversa. En determinadas modalidades, el kit comprende una baliza molecular que comprende un fluoróforo, un inactivador y un polinucleótido, en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 5-34 de la SEQ ID NO: 97, los nucleótidos 5-31 de la SEQ ID NO: 98, los nucleótidos 3-31 de la SEQ ID NO: 99, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 100, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 101, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 102, los nucleótidos 5-26 de la

SEQ ID NO: 103, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 104, los nucleótidos 7-30 de la SEQ ID NO: 105, los nucleótidos 5-27 de la SEQ ID NO: 106, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 107, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 108, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 109, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 110, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 111, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 112, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 113, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 114, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 115, los nucleótidos 4-28 de la SEQ ID NO: 116, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 117, los nucleótidos 8-28 de la SEQ ID NO: 118, los nucleótidos 8-30 de la SEQ ID NO: 119, los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 120, los nucleótidos 4-33 de la SEQ ID NO: 121, los nucleótidos 7-34 de la SEQ ID NO: 122, los nucleótidos 9-34 de la SEQ ID NO: 123, los nucleótidos 8-34 de la SEQ ID NO: 124, los nucleótidos 6-28 de la SEQ ID NO: 125, los nucleótidos 7-28 de la SEQ ID NO: 126, los nucleótidos 3-27 de la SEQ ID NO: 127, los nucleótidos 7-32 de la SEQ ID NO: 128, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 129, los nucleótidos 6-27 de la SEQ ID NO: 130 y los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 131. La secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97 a la SEQ ID NO: 131. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97 a la SEQ ID NO: 131. En una modalidad, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular consiste en la SEQ ID NO: 115 y el conjunto de polinucleótidos es el Conjunto-20 o Conjunto-24.

[0019] Incluso otro aspecto de la invención proporciona métodos para detectar *Chlamydia trachomatis* en una muestra de prueba, donde el método comprende (a) extraer ácido nucleico de la muestra de prueba, (b) amplificar una secuencia diana haciendo reaccionar el ácido nucleico extraído en la etapa (a) durante menos de diez minutos con una mezcla de reacción que comprende una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y un conjunto de cebadores LAMP específicos de secuencia y (c) detectar la presencia o ausencia de un producto amplificado de la etapa (b); en donde la presencia de dicho producto de amplificación es indicativa de la presencia de *Chlamydia trachomatis* en la muestra de prueba. En algunas implementaciones, la *Chlamydia trachomatis* está presente en la muestra de prueba a una concentración de ≤ 100 IFU/mL, ≤ 50 IFU/mL, ≤ 5 IFU/mL o incluso ≤ 2 IFU/mL. En determinadas implementaciones, la etapa de amplificación comprende hacer reaccionar el ácido nucleico extraído en la etapa (a) con una mezcla de reacción que comprende una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y un conjunto de cebadores específicos de secuencia, en donde dicho conjunto de cebadores específicos de secuencia se selecciona del grupo que consiste en el Conjunto-1 al Conjunto-81. En tales implementaciones, detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación puede

comprender hibridar el producto amplificado con una baliza molecular que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97 a la SEQ ID NO: 131. En algunas implementaciones, detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación comprende hibridar el producto amplificado con una baliza molecular que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 99 a la SEQ ID NO: 120.

[0020] En algunas modalidades de los métodos descritos en el presente documento, la muestra de prueba comprende uno o más microorganismos además de *Chlamydia trachomatis*, y en donde la secuencia diana de *Chlamydia trachomatis* se amplifica preferentemente sobre una secuencia de polinucleótidos del o de los otros microorganismos.

[0021] En algunas modalidades, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,1 %, al menos 99,2 %, al menos 99,3 %, al menos 99,4 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO 1-96 y métodos de uso de esas secuencias de ácido nucleico para detectar *Chlamydia trachomatis* en una muestra de prueba. En algunas modalidades, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,1 %, al menos 99,2 %, al menos 99,3 %, al menos 99,4 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 % idéntica a cualquiera del grupo que consiste en los nucleótidos 3-31 de la SEQ ID NO: 99, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 100, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 101, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 102, los nucleótidos 5-26 de la SEQ ID NO: 103, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 104, los nucleótidos 7-30 de la SEQ ID NO: 105, los nucleótidos 5-27 de la SEQ ID NO: 106, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 107, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 108, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 109, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 110, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 111, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 112, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 113, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 114, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 115, los nucleótidos 4-28 de la SEQ ID NO: 116 y los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 117 y métodos de uso de esas secuencias de ácido nucleico para detectar *Chlamydia trachomatis* en una muestra de prueba.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0022] La detección de bajas concentraciones de especies (hasta unas pocas moléculas o microorganismos en una muestra) es un desafío en la medicina. La presente invención hace referencia a la detección selectiva de *Chlamydia trachomatis*. En particular, con base en nuevas

estrategias de detección que utilizan amplificación de ácido nucleico, particularmente RT-LAMP, y detección de baliza molecular, las infecciones por clamidia pueden diagnosticarse mediante el uso de los métodos y reactivos descritos en este documento. El uso de ARN (ARN ribosómico (ARNr) o ARN mensajero) como regiones diana proporciona múltiples copias de la diana por genoma de *C. trachomatis*. Por consiguiente, esto facilita la detección de *C. trachomatis* en muestras mediante la utilización de los enfoques descritos en este documento en relación con técnicas que se dirigen al ADN genómico, incluso cuando está presente en múltiples copias por genoma. Además, los reactivos de detección de balizas moleculares descritos en este documento proporcionan especificidad adicional, al no unirse, en la mayoría de los casos, al ADN amplificado fuera del objetivo, minimizando así la aparición de, por ejemplo, falsos positivos. Esta especificidad se ilustra, entre otros, en el Ejemplo 4 que se proporciona a continuación. También se describen en la presente muchos otros aspectos de la invención.

[0023] Como se usa en este documento, “ácido nucleico” incluye tanto ADN como ARN, incluido ADN y ARN que contienen nucleótidos no estándar. Un “ácido nucleico” contiene al menos un polinucleótido (una “cadena de ácido nucleico”). Un “ácido nucleico” puede ser de cadena simple o cadena doble. La expresión “ácido nucleico” se refiere a nucleótidos y nucleósidos que componen, por ejemplo, macromoléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y macromoléculas de ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos más comunes son el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Debe entenderse además que la presente invención se puede utilizar para secuencias biológicas que contienen nucleótidos artificiales tales como ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés), morfolino, ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), ácido nucleico glicólico (GNA, por sus siglas en inglés) y ácido nucleico treósico (TNA, por sus siglas en inglés), entre otros. Preferiblemente, los nucleótidos artificiales son moléculas de ácido nucleico bloqueado, que incluyen [alfa]-L-LNA. Los LNA comprenden análogos de ácido ribonucleico en los que el anillo de ribosa está “bloqueado” por un puente de metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4', es decir, oligonucleótidos, que contienen al menos un monómero de LNA, es decir, un nucleótido 2'-O,4'-C-metilen-β-D-ribofuranosil. Las bases de LNA forman pares de bases estándar de Watson-Crick pero la configuración bloqueada aumenta la velocidad y la estabilidad de la reacción de apareamiento de bases (Jepsen et ál., *Oligonucleotides*, 14, 130-146 (2004)).

[0024] Como se usa en este documento, un “polinucleótido” hace referencia a una cadena polimérica que contiene dos o más nucleótidos, que contienen desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos, como los que contienen cadenas principales modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o fosforotioatos) o bases modificadas. Los “polinucleótidos” incluyen cebadores, oligonucleótidos, cadenas de ácido nucleico, etc. Un

polinucleótido puede contener nucleótidos estándar o no estándar. Por lo tanto, el término incluye ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADN, ADNc, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, sondas, cebadores, etc. Normalmente, un polinucleótido contiene un fosfato 5' en un extremo ("extremo 5'") y un grupo hidroxilo 3' en el otro extremo ("extremo 3'") de la cadena. El nucleótido más hacia 5' de un polinucleótido puede denominarse en el presente documento como el "nucleótido de extremo 5'" del polinucleótido. El nucleótido más hacia 3' de un polinucleótido puede denominarse en el presente documento como el "nucleótido de extremo 3'" del polinucleótido. Cuando el ácido nucleico de la invención toma la forma de ARN, puede tener o no un casquete 5'.

[0025] LAMP es un método de amplificación de ácidos nucleicos que se basa en la síntesis de ADN de desplazamiento de cadena de autociclo realizada por una ADN polimerasa Bst u otras polimerasas con actividad de desplazamiento de cadena. Los productos amplificados son estructuras en tallo-bucle con varias secuencias repetidas de la diana y tienen múltiples bucles. El principal mérito de este método es que no se requiere la desnaturalización de la plantilla de ADN y, por lo tanto, la reacción LAMP se puede llevar a cabo en condiciones isotérmicas (que varían entre 60 y 67 °C). LAMP requiere solo una enzima y cuatro tipos de cebadores que reconocen seis sitios de hibridación distintos en la secuencia diana. La reacción se puede acelerar mediante la adición de dos cebadores adicionales. El método produce una gran cantidad de producto amplificado, lo que resulta en una detección más fácil, como la detección por evaluación visual de la turbidez o fluorescencia de la mezcla de reacción.

[0026] En resumen, la reacción se inicia mediante anillado y extensión de un par de cebadores 'formadores de bucle' (cebadores internos directos e inversos, FIP y BIP, respectivamente), seguido del anillado y extensión de un par de cebadores flanqueantes (F3 y B3). La extensión de estos cebadores da como resultado el desplazamiento de cadena de los elementos formadores de bucles, que se pliegan para formar estructuras terminales de bucle en horquilla. Una vez que han aparecido estas estructuras clave, el proceso de amplificación se vuelve autosostenible y procede a temperatura constante de manera continua y exponencial (en lugar de una manera cíclica, como la PCR) hasta que todos los nucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) de la mezcla de reacción se han incorporado al ADN amplificado. Opcionalmente, se puede incluir un par adicional de cebadores para acelerar la reacción. Estos cebadores, denominados cebadores de bucle, se hibridan con bucles terminales unidos al cebador no interno de los productos con forma de mancuerna del cebador interno.

[0027] El término "cebador" tal como se usa en la presente hace referencia a un oligonucleótido, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis cuando está en condiciones donde se

induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (plantilla), es decir, en presencia de nucleótidos y un agente de polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados.

[0028] LAMP permite la amplificación de secuencias de ADN diana con mayor sensibilidad y especificidad que la PCR, a menudo con tiempos de reacción inferiores a 30 minutos, lo que equivale a las pruebas de PCR en tiempo real más rápidas. La secuencia diana que se amplifica tiene típicamente 200-300 pares de bases (pb) de longitud, y la reacción se basa en el reconocimiento de entre 120 pb y 160 pb de esta secuencia por varios cebadores simultáneamente durante el proceso de amplificación. Este alto nivel de rigurosidad hace que la amplificación sea muy específica, de modo que la aparición de ADN amplificado en una reacción ocurre solo si la secuencia diana completa estaba inicialmente presente.

[0029] Las aplicaciones de LAMP se han ampliado aún más para incluir la detección de moléculas de ARN mediante la adición de la enzima transcriptasa inversa (RT, por sus siglas en inglés). Al incluir la detección de ARN, los tipos de diana para los que se puede aplicar LAMP también se expanden y agregan la capacidad de dirigirse adicionalmente a virus basados en ARN, ARN no codificante regulador importante (ARNs, ARNmi) y moléculas de ARN que se han asociado con enfermedades o estados fisiológicos particulares. La capacidad de detectar ARN también tiene el potencial de aumentar la sensibilidad del ensayo, por ejemplo, para elegir dianas de ARN mensajero (ARNm) o ARN ribosómico (ARNr) altamente expresado, estable y/o abundante. Esta fase preliminar de amplificación implica la transcripción inversa de moléculas de ARN a ADN complementario (ADNc). El ADNc luego sirve como plantilla para la ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena. El uso de una enzima RT termoestable (es decir, NEB RTx) permite que la reacción se complete a una temperatura única y en una reacción de mezcla única de una sola etapa.

[0030] Una “secuencia diana”, como se usa en este documento, significa una secuencia de ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*, o un complemento de esta, que se amplifica, se detecta o se amplifica y se detecta mediante el uso de uno o más de los polinucleótidos proporcionados en este documento. Además, aunque la expresión secuencia diana a veces hace referencia a una secuencia de ácido nucleico de cadena doble, los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia diana también puede ser de cadena simple, por ejemplo, ARN. Puede seleccionarse una secuencia diana que sea más o menos específica para un organismo particular. Por ejemplo, la secuencia diana puede ser específica de un género completo, de más de un género, de una especie o subespecie, serogrupo, auxotipo, serotipo, cepa, aislado u otro subconjunto de organismos.

[0031] La velocidad, especificidad y sensibilidad de las composiciones y el método de cebadores/sonda descritos en este documento son el resultado de varios aspectos. Los ejemplos de

cebadores para usar en las composiciones y métodos de acuerdo con la presente invención incluyen:

TABLA 1: Secuencias de cebadores

ID de la secuencia	Secuencia (5' a 3')
SEQ ID NO: 1	CGAAGGAATGACGGAGTA
SEQ ID NO: 2	CGCCTTAGAATATTCATCTCG
SEQ ID NO: 3	GCGACCTGATCTTATGTTAGCGCGATTGGAAGAGTCCGTA
SEQ ID NO: 4	GAACCGATGGTGTGGAGCCACCTGTGTCGGTT
SEQ ID NO: 5	CTACTAACCGTTCTCATCGC
SEQ ID NO: 6	CTGTTGATGGTGACCGTAC
SEQ ID NO: 7	AAACTATAGCGAAGGAATGACGGA
SEQ ID NO: 8	TAATTTGCCGAGTTCCTTAACGAAAG
SEQ ID NO: 9	CCCCGAAGATTCCCCTTGATCGCCGTAGAGCGATGAGAACGGTT
SEQ ID NO: 10	GGTGTGGAGCGAGGCTTTCAAGAAATAATATTCATCTCGCCACCT GTG
SEQ ID NO: 11	TGATCTTATGTTAGCGGATTTGCCTACT
SEQ ID NO: 12	TTTCTAGCTGTTGATGGTGACCGT
SEQ ID NO: 13	AACTATAGCGAAGGAATGACGGAG
SEQ ID NO: 14	TAATTTGCCGAGTTCCTTAACGAAAG
SEQ ID NO: 15	CCCCGAAGATTCCCCTTGATCGCCGTAGAGCGATGAGAACGGTT
SEQ ID NO: 16	GGTGTGGAGCGAGGCTTTCAAGAAATAATATTCATCTCGCCACCT GTG
SEQ ID NO: 17	TGATCTTATGTTAGCGGATTTGCCTACT
SEQ ID NO: 18	GTTGATGGTGACCGTACCAAAACC
SEQ ID NO: 19	ATAGCGAAGGAATGACGGAGTAAG
SEQ ID NO: 20	TAATTTGCCGAGTTCCTTAACGAAAG
SEQ ID NO: 21	CCCCGAAGATTCCCCTTGATCGCCGTAGAGCGATGAGAACGGTT
SEQ ID NO: 22	GGTGTGGAGCGAGGCTTTCAAGAAATAATATTCATCTCGCCACCT GTG

ID de la secuencia	Secuencia (5' a 3')
SEQ ID NO: 23	GACCTGATCTTATGTTAGCGGATTTGC
SEQ ID NO: 24	TTTCTAGCTGTTGATGGTGACCGT
SEQ ID NO: 25	AGAAGCGAGTCCGGGAGAT
SEQ ID NO: 26	CTGCTGAATACTACGCTCTCCTAC
SEQ ID NO: 27	CCAACATTCCAACGTCTTCTGAATCATCACTCAGCCCAGACCGCC G
SEQ ID NO: 28	GCGTAACAGCTCACCAATCGAGAATCATTGTCTTATCGACACACCC GC
SEQ ID NO: 29	TTACCCACTTAGCATAAAATTAGGGACCTTAA
SEQ ID NO: 30	ACGGGACTAAGCATAAAACCGACA
SEQ ID NO: 31	AGAAGCGAGTCCGGGAGAT
SEQ ID NO: 32	CCGGTACACCTTCTCTGCTG
SEQ ID NO: 33	AAGCCAACATTCCAACGTCTTCTGAATCATCAGCCCAGACCGCCG
SEQ ID NO: 34	GCGTAACAGCTCACCAATCGAGAATCATTGTCTTATCGACACACCC GC
SEQ ID NO: 35	TTACCCACTTAGCATAAAATTAGGGACCTTAA
SEQ ID NO: 36	ACGGGACTAAGCATAAAACCGACA
SEQ ID NO: 37	CACAGGTGGGCGAGATGAATAT
SEQ ID NO: 38	CTGACATATCCCTTTAACCTTTTGGC
SEQ ID NO: 39	ATAGTCACCCTAAAAGGCTCCCCTTATTCCAGGCGCGCGAGATAA CTTT
SEQ ID NO: 40	AGAAATGGCCCAGGCGACTGTTTAGGCAGGCGTCACACCATATAC T
SEQ ID NO: 41	GGGATAATTTGCCGAGTTCCTTAACG
SEQ ID NO: 42	AAAACACAGCACTATGCAAACCTCTAAG
SEQ ID NO: 43	CACAGGTGGGCGAGATGAAT
SEQ ID NO: 44	CTGACATATCCCTTTAACCTTTTGGC

ID de la secuencia	Secuencia (5' a 3')
SEQ ID NO: 45	ATAGTCACCCTAAAAGGCTCCCCTTATTCCAGGCGCGCGAGATAA CTTT
SEQ ID NO: 46	AGAAATGGCCCAGGCGACTGTTTAGGCAGGCGTCACACCATATAC T
SEQ ID NO: 47	GGGATAATTTGCCGAGTTCCTTAACG
SEQ ID NO: 48	AAAACACAGCACTATGCAAACCTCTAAG
SEQ ID NO: 49	ATTCGAAGACAGTTGGAATGT
SEQ ID NO: 50	TATTATCGGCGCAATGATTCTCGAGGCTTAGAGGCAGCAATC
SEQ ID NO: 51	GTGAGCTGTTACGCACTCT
SEQ ID NO: 52	TCGTTACTTATGCCATGGATC
SEQ ID NO: 53	TAAACGGGACTAAGCATAAAACCGACCTTCTCTGCTGAATACTACG
SEQ ID NO: 54	GATAAGACACGCGGTAGGAG
SEQ ID NO: 55	CTTACCAACGGAAATCAAACCTC
SEQ ID NO: 56	CACTTAGCATAAAATTAGGGACCTTAATCGGGGGGCTAAGCTTCGT
SEQ ID NO: 57	GCGGTCTGGGCTGTTC
SEQ ID NO: 58	TATCGGCGCAATGATTCTC
SEQ ID NO: 59	TGGGTAAGGAAGTGATGATTCTGAAGGGTGAGCTGTTACGCAC
SEQ ID NO: 60	TGGCTTAGAGGCAGCAATC
SEQ ID NO: 61	ATCGGCGCAATGATTCTCGATGGCTTAGAGGCAGCAATC
SEQ ID NO: 62	CGTTACTTATGCCATGGATCT
SEQ ID NO: 63	TAAGACACGCGGTAGGAGA
SEQ ID NO: 64	GAAATCGAAGAGATTCCCTGTG
SEQ ID NO: 65	GGTGTTGAGGTCGGTCTT
SEQ ID NO: 66	TTATCCTCAATCCTACAACCCCGAGTAGCGGCGAGCGAAAG
SEQ ID NO: 67	GGATCAGGACTCCTAGTTGAACACACTCCTTTCGTCTACGGGAC
SEQ ID NO: 68	CCTTATCAGCTCGGTTTAGGC
SEQ ID NO: 69	GGAAAGATGGATGATACAGGGTG
SEQ ID NO: 70	GTTGTAGGATTGAGGATAAAGGATC

ID de la secuencia	Secuencia (5' a 3')
SEQ ID NO: 71	TACTGGTTCACATATCGGTCATT
SEQ ID NO: 72	TCGGTCTTTCTCTCCTTTTCGTCTACTCCTAGTTGAACACATCTGGA A
SEQ ID NO: 73	CCTCAACACCTGAGTAGGACTAGACGCCTTGGAGAGTGGTCTC
SEQ ID NO: 74	GGACTATCACCTGTATCATCCA
SEQ ID NO: 75	CGTGAAACCTAGTCTGAATCTGG
SEQ ID NO: 76	TATTCCCCTTTTCGCTCGC
SEQ ID NO: 77	GGCTATTCCCCTTTTCGCTC
SEQ ID NO: 78	TTAGGCTATTCCCCTTTTCGC
SEQ ID NO: 79	GCTATTCCCCTTTTCGCTCGC
SEQ ID NO: 80	GTTTAGGCTATTCCCCTTTC
SEQ ID NO: 81	CTGAAACATCTTAGTAAGCAGAGG
SEQ ID NO: 82	GTGTCTAGTCCTACTCAGGTG
SEQ ID NO: 83	CCTACAACCCCGAGCCTTATCAAGAGATTCCCTGTGTAGCG
SEQ ID NO: 84	GGACTCCTAGTTGAACACATCTGGATTCTCTCCTTTTCGTCTACGG
SEQ ID NO: 85	GCTCGGTTTAGGCTATTCCC
SEQ ID NO: 86	AAGATGGATGATACAGGGTGATAGT
SEQ ID NO: 87	CGAACTGAAACATCTTAGTAAGCAG
SEQ ID NO: 88	CTCCTTTTCGTCTACGGGACTA
SEQ ID NO: 89	ATCAGCTCGGTTTAGGCTATTCCCGAAAAGAAATCGAAGAGATTCC CTG
SEQ ID NO: 90	GCTCGGGGTTGTAGGATTGAGGATACCTGTATCATCCATCTTTCCA GAT
SEQ ID NO: 91	CTTTCGCTCGCCGCTAC
SEQ ID NO: 92	GGATCAGGACTCCTAGTTGAACAC
SEQ ID NO: 93	CCTACAACCCCGAGCCTTATCAGAAAAGAAATCGAAGAGATTCCCT G
SEQ ID NO: 94	ATCAGCTCGGTTTAGGCTATTCCCAGAGATTCCCTGTGTAGCG

ID de la secuencia	Secuencia (5' a 3')
SEQ ID NO: 95	GCTCGGGGTTGTAGGATTGAGGATATTCTCTCCTTTCGTCTACGG
SEQ ID NO: 96	GCTCGGGGTTGTAGGATTGAGGATACTGTATCATCCATCTTTCCAG ATGT

[0032] La detección de los productos amplificados por LAMP se puede lograr mediante una variedad de métodos. En una modalidad preferida, la detección del producto se realiza añadiendo una sonda marcada con fluorescencia a la mezcla de cebadores. El término usado en este documento “sonda” hace referencia a una molécula de ácido nucleico de cadena simple que comprende una parte o partes que son complementarias, o sustancialmente complementarias, a una secuencia diana. En determinadas implementaciones, la sonda marcada con fluorescencia es una baliza molecular.

[0033] Como se usa en el presente documento, “baliza molecular” hace referencia a una sonda oligonucleotídica en forma de horquilla de cadena simple diseñada para informar la presencia de ácidos nucleicos específicos en una solución. Una baliza molecular consta de cuatro componentes; un tallo, un bucle de horquilla, un fluoróforo marcado en el extremo y un inactivador marcado en el extremo opuesto (Tyagi et ál., (1998) *Nature Biotechnology* 16:49-53). Cuando la baliza con forma de horquilla no está unida a una diana, el fluoróforo y el inactivador se encuentran cerca y se suprime la fluorescencia. En presencia de una secuencia de nucleótidos diana complementaria, el tallo de la baliza se abre para hibridarse con la diana. Esto separa el fluoróforo y el inactivador, lo que permite que el fluoróforo tenga fluorescencia. De manera alternativa, las balizas moleculares también incluyen fluoróforos que emiten en la proximidad de un donante marcado en el extremo. Las “balizas moleculares de cambio de longitud de onda” incorporan un fluoróforo recolector adicional que permite que el fluoróforo emita con más fuerza. Reseñas actuales de balizas moleculares incluyen Wang et ál., 2009, *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(5):856-870; Cissell et ál., 2009, *Anal Bioanal Chem* 393(1):125-35; Li et ál., 2008, *Biochem Biophys Res Comm* 373(4):457-61; y Cady, 2009, *Methods Mol Biol* 554:367-79.

[0034] En una implementación, la baliza molecular comprende un fluoróforo, un inactivador y un polinucleótido, en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 5-34 de la SEQ ID NO: 97, los nucleótidos 5-31 de la SEQ ID NO: 98, los nucleótidos 3-31 de la SEQ ID NO: 99, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 100, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 101, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 102, los nucleótidos 5-26 de la SEQ ID NO: 103, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 104, los nucleótidos 7-30 de la SEQ ID NO: 105, los nucleótidos 5-27 de la SEQ ID NO: 106, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 107, los

nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 108, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 109, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 110, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 111, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 112, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 113, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 114, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 115, los nucleótidos 4-28 de la SEQ ID NO: 116, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 117, los nucleótidos 8-28 de la SEQ ID NO: 118, los nucleótidos 8-30 de la SEQ ID NO: 119 y los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 120. En una modalidad, el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 99 a la SEQ ID NO: 120. En otra modalidad, el polinucleótido consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 99 a la SEQ ID NO: 120. Los polinucleótidos que tienen las secuencias descritas anteriormente pueden incluir uno o más enlaces o nucleósidos no naturales, tales como ácido nucleico peptídico (PNA), morfolino, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicólico (GNA) y ácido nucleico treósico (TNA), entre otros. En algunas modalidades, el polinucleótido de la baliza molecular comprende de uno a seis ácidos nucleicos bloqueados. En una modalidad preferida, el polinucleótido de la baliza molecular comprende tres ácidos nucleicos bloqueados. En otra modalidad preferida, el polinucleótido de la baliza molecular comprende cuatro ácidos nucleicos bloqueados.

[0035] La baliza molecular se usa preferiblemente en una composición que también comprende un conjunto de cebadores LAMP específicos de secuencia. En una implementación, la baliza molecular comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 5-34 de la SEQ ID NO: 97, los nucleótidos 5-31 de la SEQ ID NO: 98, los nucleótidos 3-31 de la SEQ ID NO: 99, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 100, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 101, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 102, los nucleótidos 5-26 de la SEQ ID NO: 103, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 104, los nucleótidos 7-30 de la SEQ ID NO: 105, los nucleótidos 5-27 de la SEQ ID NO: 106, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 107, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 108, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 109, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 110, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 111, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 112, los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 113, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 114, los nucleótidos 5-29 de la SEQ ID NO: 115, los nucleótidos 4-28 de la SEQ ID NO: 116, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 117, los nucleótidos 8-28 de la SEQ ID NO: 118, los nucleótidos 8-30 de la SEQ ID NO: 119, los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 120, los nucleótidos 4-33 de la SEQ ID NO: 121, los nucleótidos 7-34 de la SEQ ID NO: 122, los nucleótidos 9-34 de la SEQ ID NO: 123, los nucleótidos 8-34 de la SEQ ID NO: 124, los nucleótidos 6-28 de la SEQ ID NO: 125, los nucleótidos 7-28 de la SEQ ID NO: 126, los nucleótidos 3-27 de la SEQ ID NO: 127, los nucleótidos 7-32 de la SEQ ID NO: 128, los nucleótidos 4-27 de la SEQ ID NO: 129 y los nucleótidos 6-27 de la SEQ ID NO: 130. En dicha implementación,

la baliza molecular puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97 a la SEQ ID NO: 130. Más preferiblemente, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97 a la SEQ ID NO: 130. En una implementación particularmente preferida, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular es la SEQ ID NO: 115.

[0036] Cuando se incluye en una composición que comprende un conjunto de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste en los Conjuntos 12-27, Conjuntos 39-54 y Conjuntos 66-81, la baliza molecular comprende preferiblemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 5-34 de la SEQ ID NO: 97, los nucleótidos 5-31 de la SEQ ID NO: 98, los nucleótidos 3-31 de la SEQ ID NO: 99, los nucleótidos 5-30 de la SEQ ID NO: 100, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 101, los nucleótidos 5-27 de la SEQ ID NO: 106, los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 110, los nucleótidos 6-29 de la SEQ ID NO: 112, los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 120, los nucleótidos 4-33 de la SEQ ID NO: 121 y los nucleótidos 7-34 de la SEQ ID NO: 122. Más particularmente, la baliza molecular puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 122. En determinadas implementaciones, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 122.

[0037] Cuando se incluye en una composición que comprende un conjunto de polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en el Conjunto-12, Conjuntos 14-18, Conjunto-20, Conjunto-24, Conjunto-27, Conjunto-39, Conjuntos 41-45, Conjunto-47, Conjunto-51, Conjunto-54, Conjunto-66, Conjuntos 68-72, Conjunto 74, Conjunto-78 y Conjunto-81, la baliza molecular comprende preferiblemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 6-28 de la SEQ ID NO: 125 y los nucleótidos 7-28 de la SEQ ID NO: 126. En determinadas implementaciones, la baliza molecular puede comprender una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 125 y la SEQ ID NO: 126. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular es la SEQ ID NO: 125 o la SEQ ID NO: 126.

[0038] Cuando se usa en combinación con un conjunto de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste en los Conjuntos 14-27, Conjuntos 41-54 y los Conjuntos 68-81, la baliza molecular comprende preferiblemente una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 8-31 de la SEQ ID NO: 113 y los nucleótidos 3-27 de la SEQ ID NO: 127. En algunas modalidades, el polinucleótido marcado de la baliza molecular comprende una secuencia

seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 113 y la SEQ ID NO: 127. En otras modalidades, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular es la SEQ ID NO:113 o la SEQ ID NO: 127.

[0039] Cuando se incluye en una composición que comprende un conjunto de polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en los Conjuntos 12-20, Conjuntos 22-27, Conjuntos 39-47, Conjuntos 49-54, Conjuntos 66-74 y Conjuntos 76-81, la baliza molecular comprende preferiblemente los nucleótidos 6-27 de la SEQ ID NO: 130. En algunas implementaciones, la baliza molecular comprende la SEQ ID NO:130. En otras modalidades, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular es la SEQ ID NO: 130.

[0040] Cuando se usa en combinación con un conjunto de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste en el Conjunto-13, el Conjunto-40 y el Conjuntos-67, la baliza molecular comprende preferiblemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 6-30 de la SEQ ID NO: 102 y los nucleótidos 8-29 de la SEQ ID NO: 131. En dicha modalidad, la baliza molecular puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 102 y la SEQ ID NO: 131. En otra modalidad, la secuencia de polinucleótidos de la baliza molecular es la SEQ ID NO:102 o la SEQ ID NO: 131.

[0041] El término “marcador”, como se usa en la presente, significa una molécula o resto que tiene una propiedad o característica que se puede detectar y, opcionalmente, cuantificar. Un marcador puede ser directamente detectable, como con, por ejemplo (y de modo no taxativo), radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes y similares; o un marcador puede ser detectable indirectamente, como, por ejemplo, con miembros de unión específica. Se entenderá que los marcadores directamente detectables pueden requerir componentes adicionales tales como, por ejemplo, sustratos, reactivos desencadenantes, restos de inactivación, luz y similares para permitir la detección y/o cuantificación del marcador. Cuando se utilizan marcadores detectables indirectamente, normalmente se utilizan en combinación con un “conjugado”. Un conjugado es típicamente un miembro de unión específica que se ha unido o acoplado a un marcador directamente detectable. Las químicas de acoplamiento para sintetizar un conjugado son bien conocidas en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, cualquier medio químico y/o medio físico que no destruya la propiedad de unión específica del miembro de unión específica o la propiedad detectable del marcador. Como se usa en este documento, “miembro de unión específica” significa un miembro de un par de unión, es decir, dos moléculas diferentes donde una de las moléculas, por ejemplo, mediante medios químicos o físicos, se une específicamente a la otra molécula. Además de los pares de unión específica antígeno y anticuerpo, otros pares de unión específica incluyen, pero no se pretende que se limiten a, avidina y biotina; haptenos y anticuerpos

específicos para haptenos; secuencias de nucleótidos complementarias; sustratos o cofactores enzimáticos y enzimas; y similares.

[0042] La baliza molecular puede estar compuesta únicamente de ácido nucleico, como ADN o ARN, o puede estar compuesta por un conjugado de ácido nucleico peptídico (PNA). El fluoróforo puede ser cualquier tinte orgánico fluorescente o un solo punto cuántico. El resto de inactivación inactiva de manera deseable la luminiscencia del fluoróforo. Puede usarse cualquier resto de inactivación adecuado que inactive la luminiscencia del fluoróforo. Un fluoróforo puede ser cualquier tinte/marcador fluorescente conocido en la técnica. Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen, de modo no taxativo, Fam, Hex, Tet, Joe, Rox, Tamra, Max, Edans, tintes Cy tales como Cy5, Fluoresceína, Cumarina, Eosina, Rodamina, Bodipy, Alexa, Cascade Blue, Yakima Yellow, Lucifer Yellow, Texas Red y la familia de tintes ATTO. Un inactivador puede ser cualquier inactivador conocido en la técnica. Los ejemplos de inactivadores incluyen, de modo no taxativo, Dabcyl, Dark Quencher, Eclipse Dark Quencher, ElleQuencher, Tamra, BHQ y QSY (todas marcas registradas). El experto sabría qué combinaciones de tinte/inactivador son adecuadas al diseñar una sonda. En una modalidad de ejemplo, se usa fluoresceína (FAM) junto con Blackhole Quencher™ (BHQ™) (Novato, CA). Luego la unión de la baliza molecular al producto amplificado se puede evaluar de forma directa y visual. De manera alternativa, se puede medir el nivel de fluorescencia mediante espectroscopía para mejorar la sensibilidad.

[0043] Una variedad de proveedores comerciales producen balizas moleculares estándar y personalizadas, incluidos Abingdon Health (UK; www.abingdonhealth.com), Attostar (US, MN; www.attostar.com), Biolegio (NLD; www.biolegio.com), Biomers.net (DEU; www.biomers.net), Biosearch Technologies (US, CA; www.biosearchtech.com), Eurogentec (BEL; www.eurogentec.com), Gene Link (US, NY; www.genelink.com) Integrated DNA Technologies (US, IA; www.idtdna.com), Isogen Life Science (NLD; www.isogen-lifescience.com), Midland Certified Reagent (US, TX; www.oligos.com), Eurofins (DEU; www.eurofinsgenomics.eu), Sigma-Aldrich (US, TX; www.sigmaaldrich.com), Thermo Scientific (US, MA; www.thermoscientific.com), TIB MOLBIOL (DEU; www.tib-molbiol.de), TriLink Bio Technologies (US, CA; www.trilinkbiotech.com). También se encuentran disponibles comercialmente una variedad de kits que utilizan balizas moleculares, como los kits de discriminación alélica de balizas moleculares Sentinel™ de Stratagene (La Jolla, Calif.) y varios kits de Eurogentec SA (Bélgica, eurogentec.com) e Isogen Bioscience BV (Países Bajos, isogen.com).

[0044] Las sondas oligonucleotídicas y los cebadores de la invención se preparan opcionalmente mediante el uso de esencialmente cualquier técnica conocida en la técnica. En determinadas modalidades, por ejemplo, las sondas oligonucleotídicas y los cebadores descritos en este

documento se sintetizan químicamente usando esencialmente cualquier método de síntesis de ácidos nucleicos, que incluye, por ejemplo, de acuerdo con el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers (1981), Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862, que se incorpora mediante referencia, u otra técnica de síntesis conocida en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador automático, como se describe en Needham-VanDevanter et ál. (1984) Nucleic Acids Res. 12:6159-6168, que se incorpora mediante referencia. Existe una amplia variedad de equipos disponibles comercialmente para la síntesis automatizada de oligonucleótidos. También se utilizan opcionalmente enfoques de síntesis de múltiples nucleótidos (por ejemplo, síntesis de trinucleótidos, etc.). Además, los ácidos nucleicos de cebadores descritos en la presente incluyen opcionalmente varias modificaciones. Para ilustrar mejor, los cebadores también se modifican opcionalmente para mejorar la especificidad de las reacciones de amplificación como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6,001,611, emitida el 14 de diciembre de 1999, que se incorpora mediante referencia. Los cebadores y las sondas también se pueden sintetizar con otras modificaciones varias como se describe en el presente documento o de otro modo conocido en la técnica.

[0045] Además, esencialmente cualquier ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, ya sea estándar o no estándar) se puede pedir de manera personalizada o estándar de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, como Integrated DNA Technologies, Midland Certified Reagent Company, Eurofins, Biosearch Technologies, Sigma Aldrich y muchos otros.

[0046] Las muestras de prueba generalmente se derivan o se aíslan de sujetos, típicamente sujetos mamíferos, más típicamente sujetos humanos, que se sospecha que tienen una infección por clamidia. Los ejemplos de muestras o especímenes incluyen sangre, plasma, suero, orina, líquido sinovial, líquido seminal, plasma seminal, líquido prostático, fluido vaginal, fluido de cuello uterino, fluido uterino, raspados de cuello uterino, líquido amniótico, raspados anales, mucosidad, esputo, tejido y similares. Esencialmente, se utiliza de manera opcional cualquier técnica para adquirir estas muestras que incluyen, por ejemplo, raspado, venopunción, hisopado, biopsia u otras técnicas conocidas en la técnica.

[0047] La expresión “muestra de prueba”, como se usa en la presente, significa una muestra tomada de un organismo o fluido biológico que se sospecha que contiene o potencialmente contiene una secuencia diana. La muestra de prueba se puede tomar de cualquier fuente biológica, como, por ejemplo, tejido, sangre, saliva, esputos, mucosidad, sudor, orina, hisopos uretrales, hisopos cervicales, hisopos vaginales, hisopos urogenitales o anales, hisopos conjuntivales, fluido del cristalino ocular, líquido cefalorraquídeo, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, caldos de fermentación, cultivos celulares, mezclas de reacción química y

similares. La muestra de prueba se puede utilizar (i) directamente como se obtiene de 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 pretratar antes de su uso, por ejemplo, mediante la preparación de plasma o suero a partir de sangre, alteración de células o partículas virales, preparación de líquidos a partir de materiales sólidos, dilución de líquidos viscosos, filtración de líquidos, destilación de líquidos, concentración de líquidos, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos, purificación de ácidos nucleicos y similares.

[0048] De manera ventajosa, la invención permite una detección rápida y fiable de *Chlamydia trachomatis* en una muestra clínica, tal como una muestra de orina.

[0049] Para ilustrar mejor, antes de analizar los ácidos nucleicos diana descritos en el presente documento, esos ácidos nucleicos pueden purificarse o aislarse de muestras que normalmente incluyen mezclas complejas de diferentes componentes. Las células en las muestras recolectadas generalmente se lisan para liberar el contenido celular. Por ejemplo, *C. trachomatis* y otras células de la muestra particular se pueden lisar poniéndolas en contacto con varias enzimas, productos químicos, y/o se pueden lisar mediante otros enfoques conocidos en la técnica, que degradan, por ejemplo, las paredes de las células bacterianas. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos se analizan directamente en el lisado celular. En otras modalidades, los ácidos nucleicos se purifican adicionalmente o se extraen de los lisados celulares antes de la detección. Esencialmente, se puede usar cualquier método de extracción de ácido nucleico para purificar ácidos nucleicos en las muestras utilizadas en los métodos de la presente invención. Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para purificar ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, hibridación a sondas inmovilizadas en soportes sólidos, extracción líquido-líquido (p. ej., extracción con fenol-cloroformo, etc.), precipitación (p. ej., mediante el uso de etanol, etc.), extracción con papel de filtro, extracción con reactivos formadores de micelas (p. ej., bromuro de cetil-trimetil-amonio, etc.), unión a tintes intercalantes inmovilizados (p. ej., bromuro de etidio, acridina, etc.), adsorción en gel de sílice o tierras diatómicas, adsorción en partículas de vidrio magnéticas o partículas de organosilano en condiciones caotrópicas y/o similares. El procesamiento de muestras también se describe en, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 5,155,018, 6,383,393 y 5,234,809, cada uno de las cuales se incorpora mediante referencia.

[0050] Una muestra de prueba puede opcionalmente haber sido tratada y/o purificada de acuerdo con cualquier técnica conocida por el experto, para mejorar la eficiencia de amplificación y/o la precisión cualitativa y/o la precisión cuantitativa. Por tanto, la muestra puede consistir exclusiva o esencialmente en ácido nucleico, ya sea obtenido por purificación, aislamiento o síntesis química. Existen medios disponibles para los expertos que deseen aislar o purificar ácidos nucleicos, como

el ADN, de una muestra de prueba, por ejemplo, para aislar o purificar ADN a partir de raspados de cuello uterino (p. ej., QIAamp-DNA Mini-Kit; Qiagen, Hilden, Alemania).

EJEMPLOS:

5 *Ejemplo 1: Selección de diana y diseño de sonda cebador*

[0051] Teniendo en cuenta el nivel de expresión alto y constitutivo de los genes ribosomales en las células bacterianas, estos genes se eligieron como dianas para el ensayo de amplificación, específicamente los genes 16S y 23S.

10 [0052] Las secuencias de genes 16S y 23S para múltiples serovares de *C. trachomatis*, especies estrechamente relacionadas como *Chlamydomphila pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*, y para otras especies que se encuentran comúnmente en la orina o el fluido vaginal, se recuperaron de la base de datos del NCBI. Las secuencias se alinearon mediante el uso de Clustal omega (Sievers, et ál. 2011. Molecular Systems Biology 7:539) y se identificaron regiones con bases específicas únicas para la especie *C. trachomatis*. Los cebadores de amplificación mediada por bucle se diseñaron
15 utilizando el diseñador de LAMP (Premier Biosoft). Para mayor especificidad, las balizas moleculares o sondas que se dirigen a los productos amplificados se diseñaron manualmente o utilizando Beacon designer (Premier Biosoft). Los conjuntos de cebadores y balizas diseñados se analizaron adicionalmente para determinar su especificidad mediante el uso de BLAST contra el genoma humano y la base de datos de nucleótidos del NCBI. Varios conjuntos de cebadores y sondas se
20 diseñaron y se evaluaron para determinar la velocidad de reacción.

[0053] Los conjuntos de cebadores de la invención se resumen en la Tabla 2, que incluyen, como mínimo, un cebador interno directo (FIP) y un cebador interno inverso (BIP). Además, los conjuntos de cebadores también suelen incluir al menos dos cebadores adicionales seleccionados del cebador externo directo (F3), el cebador externo inverso (B3), el cebador de bucle directo (LF) y el cebador
25 de bucle inverso (LB).

TABLA 2: Conjuntos de cebadores LAMP

Conjunto	F3	B3	FIP	BIP	LF	LB
Conjunto-1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
Conjunto-2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
Conjunto-3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
Conjunto-4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
Conjunto-5	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
Conjunto-6	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
Conjunto-7	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42

Conjunto	F3	B3	FIP	BIP	LF	LB
Conjunto-8	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48
Conjunto-9	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 54
Conjunto-10	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 60
Conjunto-11	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 63
Conjunto-12	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69
Conjunto-13	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75
Conjunto-14	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 86
Conjunto-15	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 86
Conjunto-16	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 86
Conjunto-17	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 86
Conjunto-18	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 86
Conjunto-19	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 86
Conjunto-20	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86
Conjunto-21	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 92
Conjunto-22	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 86
Conjunto-23	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 86
Conjunto-24	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 86
Conjunto-25	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 92
Conjunto-26	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 92
Conjunto-27	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 92
Conjunto-28	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	---	---
Conjunto-29	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	---	---
Conjunto-30	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	---	---
Conjunto-31	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	---	---
Conjunto-32	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	---	---
Conjunto-33	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34	---	---
Conjunto-34	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	---	---
Conjunto-35	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46	---	---
Conjunto-36	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 53	---	---
Conjunto-37	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 59	---	---
Conjunto-38	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 53	---	---
Conjunto-39	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	---	---
Conjunto-40	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73	---	---
Conjunto-41	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-42	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-43	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-44	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-45	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-46	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 84	---	---

Conjunto	F3	B3	FIP	BIP	LF	LB
Conjunto-47	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-48	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90	---	---
Conjunto-49	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-50	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-51	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-52	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 95	---	---
Conjunto-53	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 95	---	---
Conjunto-54	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 95	---	---
Conjunto-55	---	---	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	---	---
Conjunto-56	---	---	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	---	---
Conjunto-57	---	---	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	---	---
Conjunto-58	---	---	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	---	---
Conjunto-59	---	---	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	---	---
Conjunto-60	---	---	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34	---	---
Conjunto-61	---	---	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	---	---
Conjunto-62	---	---	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46	---	---
Conjunto-63	---	---	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 53	---	---
Conjunto-64	---	---	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 59	---	---
Conjunto-65	---	---	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 53	---	---
Conjunto-66	---	---	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	---	---
Conjunto-67	---	---	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73	---	---
Conjunto-68	---	---	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-69	---	---	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-70	---	---	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-71	---	---	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-72	---	---	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-73	---	---	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-74	---	---	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-75	---	---	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90	---	---
Conjunto-76	---	---	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-77	---	---	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-78	---	---	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 84	---	---
Conjunto-79	---	---	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 95	---	---
Conjunto-80	---	---	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 95	---	---
Conjunto-81	---	---	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 95	---	---

Ejemplo 2: Cinética de la reacción de amplificación

[0054] Una matriz de orina negativa se enriqueció con *C. trachomatis* titulada (cepa Z054, D-UW3 (Zeptomatrix) o ATCC serovar D cepa VR-885) a dos concentraciones diferentes (10^3 IFU/mL y 10 IFU/mL). Los ácidos nucleicos se extrajeron mediante el uso de métodos de extracción estándar y la muestra se amplificó usando conjuntos de cebadores LAMP como se describe en la Tabla 2. Se usó tinte YoPro™ (Life Technologies; tinción de ácido nucleico de carbocianina verde fluorescente) para la detección del producto amplificado. En este ejemplo, una reacción de 25 µl contenía amortiguador de amplificación isotérmico 1X (New England Biolabs) complementado con 4,8 mM o 6 mM de $MgCl_2$, 1,4 mM o 1,6 mM de dNTP, 200 nM de tinte YO-PRO-1 (Life Technologies), cebadores (0,2 µM de F3 y B3, cuando están presentes; 1,6 µM de FIP y BIP; 0,4-0,8 µM de LF y LB, cuando están presentes), 8 o 12 unidades de polimerasa Bst2 (New England Biolabs), 7,5 unidades de RTx Warmstart (transcriptasa inversa; New England Biolabs) y el ácido nucleico extraído (como plantilla) o agua (como control sin plantilla). Las reacciones se incubaron a 63 o 65 °C y la cinética se controló mediante el uso de un Lightcycler96 de tiempo real de Roche (Roche).

[0055] Este ejemplo muestra que utilizando este conjunto de cebadores y el método de amplificación mediada por bucle se logra una cinética de amplificación rápida. Los resultados se resumen en la Tabla 3, en la que el Tiempo hasta Positivo (T_p) se calculó mediante el instrumento. NT indica concentraciones no probadas. Los resultados se clasifican por el tiempo hasta positivo (NT significa “no probado” y “sin confirmación” indica que no se detectó amplificación).

TABLA 3: Tiempo hasta la detección positiva de tinte

cebadores	T_p 10^3 IFU/mL	T_p 10 IFU/mL	NTC
Conjunto-1	6,1	7,8	25,12
Conjunto-2	8,6	10,8	36,81
Conjunto-3	6,6	9,1	28,59
Conjunto-4	8,2	19,8	36,77
Conjunto-5	7,9	11,1	31,42
Conjunto-6	8,8	12,2	38,28
Conjunto-7	11,0	14,4	21,05
Conjunto-8	10,9	14,2	19,86
Conjunto-9	NT	7,0	42,89
Conjunto-10	NT	6,8	32,68
Conjunto-11	NT	11,0	27,34
Conjunto-12	4,1	6,54	48,03
Conjunto-13	7,3	10,13	46,55

Conjunto-14	4,4	5,18	29,24
Conjunto-15	4,6	5,21	20,34
Conjunto-16	4,6	5,40	43,24
Conjunto-17	4,5	5,36	23,37
Conjunto-18	3,9	6,00	23,78

Ejemplo 3: Efecto de ubicación de diseño de baliza en la cinética del ensayo

[0056] Las reacciones de amplificación que contienen algunos de los conjuntos de cebadores anteriores y el tinte intercalante dieron como resultado la detección de un producto de amplificación cuando se utilizó agua o extracción de orina negativa o el ADN de una especie estrechamente relacionada como *C. pneumoniae* o *C. psittaci* como plantillas en frecuencias que oscilaron entre 0 % al 75 % del tiempo (Tabla 4), dentro de intervalos variables de nuestra ventana de corte para el tiempo de ensayo. Los resultados se clasifican por el tiempo hasta positivo (“sin confirmación” indica que no se detectó amplificación).

TABLA 4: Reactividad cruzada – Detección de tinte

Conjunto de cebadores	NTC (agua)		ADN de <i>C. pneumoniae</i>		ADN de <i>C. psittaci</i>	
Conjunto-9	42,9	1 de 2	15,2	1 de 1	NT	--
Conjunto-10	32,7	1 de 2	9,4	1 de 1	NT	--
Conjunto-11	27,3	1 de 2	18,0	1 de 1	NT	--

[0057] Para una mayor especificidad, se diseñaron balizas moleculares de acuerdo con estos conjuntos de cebadores para asegurarse de que solo se detecte la señal de la diana *C. trachomatis* (secuencias enumeradas en la tabla 5). Cada sonda de baliza molecular se diseñó con modificaciones fluoróforo 5'/inactivador 3' (6-carboxifluoresceína (FAM) y Black Hole Quencher 1 (BHQ1)) incluidas para proporcionar detección fluorescente específica de la diana.

TABLA 5: Secuencias de sonda

ID	Fluoróforo	Inactivador	Secuencia (5' a 3')	ID de la secuencia
MB1	FAM	BHQ1	CGCGCACATCTGGAAAGATGGATGATACAGGGT GCGCG	SEQ ID NO: 97

ID	Fluoróforo	Inactivador	Secuencia (5' a 3')	ID de la secuencia
MB2	FAM	BHQ1	CGTCCAGGACTCCTAGTTGAACACATCTGGACG	SEQ ID NO: 98
MB3	FAM	BHQ1	CCGGATCAGGACTCCTAGTTGAACACATCTGATC CGG	SEQ ID NO: 99
MB4	FAM	BHQ1	CGGCCAGGACTCCTAGTTGAACACATCTGGCCG	SEQ ID NO: 100
MB5	FAM	BHQ1	CGTCCGGATCAGGACTCCTAGTTGAACACCGGACG	SEQ ID NO: 101
MB6	FAM	BHQ1	CTCGCCACGTGAAACCTAGTCTGAATCTGGCGAG	SEQ ID NO: 102
MB7	FAM	BHQ1	CCGTGGATGATACAGGGTGATAGTCCACGG	SEQ ID NO: 103
MB8	FAM	BHQ1	CGTGGGATGATACAGGGTGATAGTCCCACG	SEQ ID NO: 104
MB9	FAM	BHQ1	CGGCTCGAGATTCCCTGTGTAGCGGCGAGCCG	SEQ ID NO: 105
MB10	FAM	BHQ1	CGCCAGGATCAGGACTCCTAGTTGAACCTGGCG	SEQ ID NO: 106
MB11	FAM	BHQ1	CACCGGGATGATACAGGGTGATAGTCCCGGTC	SEQ ID NO: 107
MB12	FAM	BHQ1	CACCGGGATGATACAGGGTGATAGTCCCGGTG	SEQ ID NO: 108
MB13	FAM	BHQ1	TCGCGGGATGATACAGGGTGATAGTCCCGCGG	SEQ ID NO: 109
MB14	FAM	BHQ1	CAGCGGGATCAGGACTCCTAGTTGAACCCGCTG	SEQ ID NO: 110
MB15	FAM	BHQ1	CACGCTCGAGATTCCCTGTGTAGCGGCGAGCGTG	SEQ ID NO: 111
MB16	FAM	BHQ1	CAGGCGGATCAGGACTCCTAGTTGAACACCGCC TG	SEQ ID NO: 112
MB17	FAM	BHQ1	CAGCGACAGAAATCGAAGAGATTCCCTGTGTCTG CTG	SEQ ID NO: 113
MB18	FAM	BHQ1	CACGGGATGATACAGGGTGATAGTCCCGTC	SEQ ID NO: 114
MB19	FAM	BHQ1	CACGGGATGATACAGGGTGATAGTCCCGTG	SEQ ID NO: 115
MB20	FAM	BHQ1	CACGATGGATGATACAGGGTGATAGTCCATCGTG	SEQ ID NO: 116
MB21	FAM	BHQ1	CACCGATGGATGATACAGGGTGATAGTCCCATC GGTG	SEQ ID NO: 117
MB22	FAM	BHQ1	CGCGATCGAGGATAAAGGATCAGGACTCGATCG CG	SEQ ID NO: 118
MB23	FAM	BHQ1	CGCGATCATTGAGGATAAAGGATCAGGACTGAT CGCG	SEQ ID NO: 119
MB24	FAM	BHQ1	CGCGATCCTCCTAGTTGAACACATCTGGAGATCG CG	SEQ ID NO: 120
MB25	FAM	BHQ1	CGCGATCAGGACTCCTAGTTGAACACATCTGGA TCGCG	SEQ ID NO: 121
MB26	FAM	BHQ1	CGCGACTCAGGACTCCTAGTTGAACACATCTGG AGTCGCG	SEQ ID NO: 122

ID	Fluoróforo	Inactivador	Secuencia (5' a 3')	ID de la secuencia
MB27	FAM	BHQ1	CGCGATCCGGATAAAGGATCAGGACTCCTAGTT GGGATCGCG	SEQ ID NO: 123
MB28	FAM	BHQ1	CGCGAGTAGGATTGAGGATAAAGGATCAGGACT CGCG	SEQ ID NO: 124
MB29	FAM	BHQ1	CGCGATCCCTGTGTAGCGGCGAGCGAGATCGCG	SEQ ID NO: 125
MB30	FAM	BHQ1	CGCGATCCTGTGTAGCGGCGAGCGAAAGATCGC G	SEQ ID NO: 126
MB31	FAM	BHQ1	CGGCTCGGGTTGTAGGATTGAGGATACGAGCC G	SEQ ID NO: 127
MB32	FAM	BHQ1	CCGGAGCCTACAACCCCGAGCCTTATCAGCTCC GG	SEQ ID NO: 128
MB33	FAM	BHQ1	GCGCAGCTCGGTTTAGGCTATTCCCCTGCGCG	SEQ ID NO: 129
MB34	FAM	BHQ1	CGCGGTCTCTCCTTTCGTCTACGGGACCGCG	SEQ ID NO: 130
MB35	FAM	BHQ1	CGCAGTGAGAGAAAGACCGACCTCAACACTGCG	SEQ ID NO: 131

[0058] Una matriz de orina negativa se enriqueció con *C. trachomatis* titulada (cepa Z054, D-UW3 (Zeptomatrix) o ATCC serovar D cepa VR-885) a dos concentraciones diferentes (10^3 IFU/mL y 10^4 IFU/mL). Los ácidos nucleicos se extrajeron mediante el uso de métodos de extracción estándar y la muestra se amplificó usando un conjunto de cebadores LAMP (según Tabla 2) y una de las balizas moleculares (según Tabla 4) se usó para la detección del producto amplificado. En este ejemplo, una reacción de 25 µl contenía amortiguador de amplificación isotérmico 1X (New England Biolabs) complementado con 4,8 mM o 6 mM de $MgCl_2$, 1,4 mM o 1,6 mM de dNTP, 200 nM de baliza molecular (Sigma-Aldrich), cebadores (0,2 µM de F3 y B3, si están presentes; 1,6 µM o 2 µM de FIP y BIP; 0,4-0,8 µM de LF y LB, si están presentes), 8 o 12 unidades de polimerasa Bst2 (New England Biolabs), 7,5 unidades de RTx Warmstart (transcriptasa inversa; New England Biolabs) y el ácido nucleico extraído (como plantilla) o agua (como control sin plantilla). Las reacciones se incubaron a 63 °C y la cinética se controló mediante el uso de un Lightcycler96 de tiempo real de Roche (Roche). El tiempo hasta positivo para cada combinación de cebador-sonda se informa en la Tabla 6. Los resultados se clasifican por el tiempo hasta positivo (Tp) desde el inicio de la reacción de la siguiente manera: "NT" indica que esta combinación no se probó y "sin confirmación" indica que no se detectó amplificación.

TABLA 6: Tiempo hasta la detección positiva de sonda

Cebadores	Baliza	10 ³ IFU/mL	10 IFU/mL	NTC
Conjunto-12	MB1	5,6	7,6	sin confirmación
Conjunto-12	MB2	4,8	6,7	sin confirmación
Conjunto-12	MB3	5,2	7,2	sin confirmación
Conjunto-12	MB4	6,3	8,4	sin confirmación
Conjunto-12	MB5	5,6	7,4	sin confirmación
Conjunto-13	MB2	14,6	20,9	sin confirmación
Conjunto-13	MB6	8,9	11,2	sin confirmación
Conjunto-14	MB11	4,8	6,7	sin confirmación
Conjunto-14	MB12	5,2	6,7	sin confirmación
Conjunto-14	MB13	5,1	6,9	sin confirmación
Conjunto-14	MB15	5,5	7,0	sin confirmación
Conjunto-14	MB18	4,8	6,5	sin confirmación
Conjunto-14	MB19	5,8	7,3	sin confirmación
Conjunto-14	MB2	4,9	6,5	sin confirmación
Conjunto-14	MB7	4,8	6,3	sin confirmación
Conjunto-14	MB8	4,9	6,7	sin confirmación
Conjunto-14	MB9	5,2	7,0	sin confirmación
Conjunto-15	MB2	4,4	6,4	sin confirmación
Conjunto-16	MB2	4,2	7,4	sin confirmación
Conjunto-17	MB2	4,3	6,0	sin confirmación
Conjunto-18	MB2	4,8	6,6	sin confirmación
Conjunto-19	MB11	6,0	8,0	sin confirmación
Conjunto-19	MB12	5,9	7,9	sin confirmación
Conjunto-19	MB13	5,9	8,0	sin confirmación
Conjunto-19	MB18	5,6	7,4	sin confirmación
Conjunto-19	MB19	6,6	8,7	sin confirmación
Conjunto-19	MB2	4,7	6,6	sin confirmación
Conjunto-19	MB20	5,7	7,7	sin confirmación
Conjunto-19	MB21	5,7	7,6	sin confirmación
Conjunto-20	MB11	5,2	7,3	sin confirmación
Conjunto-20	MB12	5,2	6,7	sin confirmación

Cebadores	Baliza	10 ³ IFU/mL	10 IFU/mL	NTC
Conjunto-20	MB13	4,9	6,7	sin confirmación
Conjunto-20	MB15	5,1	7,2	sin confirmación
Conjunto-20	MB18	4,7	6,7	sin confirmación
Conjunto-20	MB19	5,5	7,3	sin confirmación
Conjunto-20	MB20	5,6	7,2	sin confirmación
Conjunto-20	MB21	5,1	7,2	sin confirmación
Conjunto-20	MB3	5,8	7,7	sin confirmación
Conjunto-20	MB4	5,0	6,7	32,7
Conjunto-20	MB7	5,0	6,8	sin confirmación
Conjunto-20	MB8	5,0	6,9	sin confirmación
Conjunto-20	MB9	4,9	7,1	sin confirmación
Conjunto-21	MB10	6,8	8,5	sin confirmación
Conjunto-21	MB14	6,7	8,9	sin confirmación
Conjunto-21	MB16	6,4	8,4	sin confirmación
Conjunto-21	MB17	2,7	3,5	sin confirmación
Conjunto-21	MB3	8,2	10,3	sin confirmación
Conjunto-21	MB4	6,9	8,9	sin confirmación
Conjunto-22	MB19	7,3	9,3	sin confirmación
Conjunto-23	MB19	11,8	14,8	sin confirmación
Conjunto-24	MB19	6,5	8,4	sin confirmación
Conjunto-24	MB20	6,3	8,3	sin confirmación
Conjunto-24	MB21	5,9	8,1	sin confirmación
Conjunto-25	MB19	7,3	9,7	sin confirmación
Conjunto-25	MB20	7,6	10,0	sin confirmación
Conjunto-25	MB21	7,2	8,4	sin confirmación
Conjunto-26	MB19	19,0	25,5	41,4
Conjunto-27	MB19	7,9	10,0	sin confirmación
Conjunto-76	MB19	17,3	NT	sin confirmación
Conjunto-78	MB19	12,2	NT	sin confirmación
Conjunto-79	MB19	28,6	NT	sin confirmación
Conjunto-81	MB19	22,1	NT	sin confirmación

[0059] El uso de balizas moleculares para la detección dio como resultado un ligero aumento en el Tp de la reacción; sin embargo, la mejora significativa en la especificidad del ensayo proporcionó una compensación razonable, no se observó amplificación en la muestra de agua o ADN de una especie relacionada cercana dentro del período de prueba de 45 min (ver Ejemplo 4, Tabla 7).

5

Ejemplo 4: Prueba de especificidad

[0060] Una matriz de orina negativa se enriqueció con *C. trachomatis* titulada o con organismos comúnmente asociados con infecciones de transmisión sexual (p. ej., *Neisseria gonorrhoeae*) o especies estrechamente relacionadas con *C. trachomatis* (*C. pneumonia* o *C. psittaci*). Las soluciones madre bacterianas se diluyeron en serie en PBS antes de la adición a la matriz de orina a la concentración deseada. Se usaron los ácidos nucleicos extraídos o ADN correspondientes de las especies de prueba como plantillas en reacciones RT-LAMP que contenían los cebadores LAMP y la sonda de baliza molecular, de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3 que antecede

15 . NT indica reacciones no probadas.

TABLA 7: Reactividad cruzada – Detección de sonda

Cebadores	Baliza	10 ³ IFU/mL	10 IFU/mL	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>N. gonorrhea</i> ;	NTC
Conjunto-14	MB2	4,4	6,2	13,5	13,2	20,2	19,6
Conjunto-14	MB11	NT	6,7	18,6	14,4	32,1	23,3
Conjunto-20	MB2	4,7	7,0	22,5	23,5	21,8	21,1
Conjunto-20	MB11	NT	6,7	26,4	27,1	27,8	20,4
Conjunto-21	MB2	6,6	8,6	sin confirmación	sin confirmación	sin confirmación	sin confirmación
Conjunto-19	MB19	NT	8,1	sin confirmación	sin confirmación	sin confirmación	sin confirmación
Conjunto-20	MB19	NT	7,8	33,4	28,6	sin confirmación	sin confirmación
Conjunto-14	MB19	NT	7,3	20,1	14,9	sin confirmación	sin confirmación

[0061] Este ejemplo muestra que el ensayo CT23S y su formulación de reacción pueden diseñarse para ser altamente específicos, limitando la reactividad cruzada con secuencias de organismos estrechamente relacionados y aquellos comúnmente asociados con infecciones de transmisión sexual.

5

Ejemplo 5: Prueba de sensibilidad

[0062] Se diluyó un estándar molecular de ARN a varias concentraciones para evaluar la sensibilidad de las combinaciones de conjunto de cebadores/baliza molecular indicadas (Tabla 8).

10 Los estándares se diluyeron en serie con 0,1 mg/mL de ARN portador de Poli A en PBS (Sigma) y se utilizaron como plantilla para amplificación en reacciones RTLAMP. Las concentraciones finales en las reacciones fueron 40, 8 o 4 copias/uL. Las condiciones de reacción fueron equivalentes a las descritas anteriormente en el Ejemplo 3. La señal de amplificación se obtuvo con concentraciones tan bajas como 4 copias/uL (ver Tabla 8).

15

TABLA 8: Sensibilidad con LAMP y baliza molecular

Conjunto de cebadores	Baliza	40 copias/uL	8 copias/uL	4 copias/uL
Conjunto-14	MB2	6,5	7,6	12,3
Conjunto-20	MB2	6,5	7,8	9,9

20

25

30