

POLINUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

[0001] La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud de patente estadounidense N.º 16/719,744, presentada el 18 de diciembre de 2019, que es una continuación de la solicitud de patente estadounidense N.º 16/523,609, presentada el 26 de julio de 2019, que reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/878,639 presentada el 25 de julio de 2019, cuyo contenido se incorpora en su totalidad mediante referencia.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Dicha copia ASCII, creada el 23 de julio de 2020, se denomina TSM-052WO_SL.txt y tiene un tamaño de 17,533 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 *Neisseria gonorrhoeae* 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 *Neisseria gonorrhoeae*.

20

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] *Neisseria gonorrhoeae*, el agente etiológico de la gonorrea, infecta el tracto urogenital con síntomas clínicos de gonorrea que a menudo coinciden con síntomas de otras enfermedades de transmisión sexual (STD, por sus siglas en inglés). La infección, a menudo asintomática en las mujeres, en caso de no ser tratada puede conllevar complicaciones relacionadas con la salud más serias y permanentes, como la enfermedad inflamatoria pélvica (PID, por sus siglas en inglés), dolor pélvico crónico, infertilidad tubárica y embarazo ectópico con riesgo de vida. En los hombres, la mayoría de las infecciones de la uretra provocan uretritis, lo que a veces genera epididimitis que

30

puede provocar infertilidad en caso de no ser tratada. Si bien no es tan común, los índices de infección asintomática entre los hombres también son significativos. Entre los neonatos, la conjuntivitis puede provocar ceguera. Entre los tres grupos, la *N. gonorrhoeae* no tratada puede diseminarse y provocar dermatitis aguda, síndrome de tenosinovitis y sepsis asociada a artritis, meningitis o endocarditis.

[0005] La *N. gonorrhoeae* presenta un cálculo de impacto a nivel mundial de 106 millones de casos por año. A nivel mundial, la *N. gonorrhoeae* es la segunda STD bacteriana más prevalente, así como la segunda enfermedad comunicable notificable más común en los Estados Unidos. La OMS calcula que la incidencia de la infección por *N. gonorrhoeae* ha aumentado de forma constante desde 1995, con un aumento de 11,7 % de 2005 a 2008. Un agravante de las preocupaciones clínicas y de mayor incidencia es la categorización de *N. gonorrhoeae* como amenaza de salud pública inmediata relacionada con su perfil de resistencia a antibióticos, donde se calcula que el 30 % de las cepas presenta resistencia a uno o más antibióticos de tratamiento.

[0006] Una de las principales estrategias de salud pública en la prevención y reducción de la enfermedad infecciosa es la reducción de la propagación entre individuos mediante análisis, la rápida identificación y el tratamiento eficaz. El diagnóstico específico y sensible es imprescindible a los efectos de esta estrategia.

[0007] La realización de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés) según la medición de la sensibilidad, especificidad y la facilidad del transporte de muestras supera los de cualquier otra prueba de diagnóstico actualmente disponible para el diagnóstico de infecciones gonocócicas. Los Centros para el Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos recomiendan específicamente el uso de NAAT por parte de laboratorios clínicos y de control de enfermedades para detectar la gonorrea con unas pocas excepciones limitadas. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. MMWR 2014;63(No. RR-2). Con relación a la sensibilidad y especificidad, estos ensayos han permitido el uso de métodos de recolección de muestras menos invasivos, lo que facilita el análisis de enfermedades infecciosas. Los tipos de muestras ideales recomendadas para NAAT incluyen la primera orina en el caso de los hombres y las muestras vaginales en el caso de las mujeres.

[0008] Las NAAT aprobadas por la FDA incluyen CT/NG de Abbott RealTime (plataforma del sistema Abbott m2000), Aptima COMBO o ensayos CT o GC individuales (plataforma del sistema Hologic Panther), ensayos BD ProbeTec (ensayo CT/GC de amplificación de ADN ET y ensayos CT o GC de amplificación de ADN Q^x y plataforma del sistema BD Viper), ensayo CT/NG de Cepheid

Xpert (dispositivo de centro de atención GeneXpert IV), y pruebas CT/NG de Roche Diagnostics (plataforma del sistema cobas 4800). Los ensayos de Abbott, Aptima, BD y Roche incluyen la automatización para la preparación de las muestras, la amplificación de la diana y la detección. Si bien esto significa un beneficio desde el punto de vista de la preparación de las muestras y la

5 reducción de las tareas prácticas, cada plataforma de sistema se traduce en una gran inversión de capital en equipos y requiere al menos 3 horas para alcanzar un resultado de diagnóstico. El ensayo Cepheid y su respectivo dispositivo es el único instrumento de centro de atención con menor costo y huella espacial, aunque aún requiere aproximadamente 90 minutos para generar un resultado de diagnóstico.

10 [0009] Por lo tanto, se necesitan nuevos ensayos compatibles con los dispositivos de centros de atención que ofrezcan sensibilidad elevada, tiempo de respuesta significativamente menor, menor costo de equipos y la posibilidad de utilizar “sample-in-answer-out”.

COMPENDIO

15

[0010] En algunas modalidades, en la presente se proporciona una composición que comprende un conjunto de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste en el Conjunto-1 al Conjunto-27. 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.

20 [0011] En algunas modalidades, la sonda es un polinucleótido etiquetado que tiene una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 73-76 y el conjunto de polinucleótidos se selecciona de los Conjuntos 12-15.

[0012] En algunas modalidades, la etiqueta es un fluoróforo. En algunas modalidades, el fluoróforo está unido covalentemente a un extremo del polinucleótido. En algunas modalidades, la sonda es

25 una baliza molecular que comprende un inactivador. En algunas modalidades, el fluoróforo es FAM y el inactivador es BHQ1. En otras modalidades, el fluoróforo es ATTO 565 o Alexa 594 y el inactivador es BHQ1 o BHQ2.

[0013] También se proporciona en la presente una baliza molecular que comprende un fluoróforo, un inactivador y un polinucleótido, donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en

30 las SEQ ID NO: 73-76 y el conjunto de polinucleótidos se selecciona de los Conjuntos 12-15. En algunas modalidades, el fluoróforo es FAM y el inactivador es BHQ1. En otras modalidades, el fluoróforo es ATTO 565 o Alexa 594 y el inactivador es BHQ1 o BHQ2.

[0014] En la presente también se proporciona un método para detectar *Neisseria gonorrhoeae* 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-27; 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 *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra de prueba.

[0015] En algunas modalidades del método de detección de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de prueba, la amplificación en la etapa (b) de la secuencia diana se realiza entre alrededor de 60 °C y alrededor de 67 °C durante menos de 30 minutos. En algunas modalidades, la etapa de amplificación se realiza durante menos de 15 minutos. En algunas modalidades, la etapa de amplificación se realiza durante menos de diez minutos.

[0016] En algunas modalidades del método de detección de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de prueba, 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.

[0017] En algunas modalidades del método de detección de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de prueba, el polinucleótido comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 73-76 y el conjunto de secuencia-cebador específico se selecciona de los Conjuntos 12-15.

[0018] En algunas modalidades del método de detección de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de prueba, la sonda es una baliza molecular. En algunas modalidades, la mezcla de reacción comprende además una transcriptasa inversa. En algunas modalidades, *Neisseria gonorrhoeae* está presente en la muestra de prueba en una concentración de ≤ 100 CFU/mL. En algunas modalidades, *Neisseria gonorrhoeae* está presente en la muestra de prueba en una concentración de ≤ 10 CFU/mL.

[0019] También se proporciona en la presente, de acuerdo con algunas modalidades de la invención, un kit que comprende una composición que comprende un conjunto de polinucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en el Conjunto-1 al Conjunto-27 y reactivos de amplificación. En algunas modalidades, los reactivos de amplificación comprenden una polimerasa de desplazamiento de cadena. En algunas modalidades, el kit comprende además una sonda.

[0020] También se proporciona en la presente un método de detección de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de prueba, el cual 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 veinte 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 *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra de prueba.

[0021] En algunas modalidades del método, se hace reaccionar el ácido nucleico con la mezcla de reacción durante menos de quince minutos. En algunas modalidades del método, la secuencia diana se ubica en el gen citocromo C peroxidasa (*ccpA*) de *Neisseria gonorrhoeae*.

[0022] En algunas modalidades del método, *Neisseria gonorrhoeae* está presente en la muestra de prueba en una concentración de ≤ 100 CFU/mL. En algunas modalidades del método, *Neisseria gonorrhoeae* está presente en la muestra de prueba en una concentración de ≤ 10 CFU/mL.

[0023] En algunas modalidades del método, la muestra de prueba comprende uno o más microorganismos además de *Neisseria gonorrhoeae*, y en donde la secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae* se amplifica preferentemente sobre una secuencia de polinucleótidos del o de los otros microorganismos.

[0024] 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 la SEQ ID NO: 1-76 y métodos de uso de esas secuencias de ácido nucleico para detectar *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de prueba.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0025] 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 *Neisseria gonorrhoeae*. 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 *Neisseria gonorrhoeae* 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 *Neisseria gonorrhoeae*. Por consiguiente, esto facilita la detección de *Neisseria gonorrhoeae* 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 3 (Tablas 4 y 5) que se proporciona a continuación. También se describen en la presente muchos otros aspectos de la invención.

[0026] 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)).

[0027] 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'.

[0028] 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 otra polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena. Los productos amplificados son estructuras en tallo-bucle con varias secuencias repetidas de la diana y 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.

[0029] 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, o hasta que la reacción química por lo demás se haya agotado. 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.

[0030] 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.

[0031] 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 180 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.

[0032] 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, ARNm) 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.

[0033] Una “secuencia diana”, como se usa en este documento, significa una secuencia de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae*, 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.

[0034] 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 - Cebadores LAMP

Seq ID	Secuencia (5' a 3')
SEQ ID NO: 1	CATAAGGAATACACGATGTCTTTC
SEQ ID NO: 2	GATTTTCTGCATTTCTTCGACA
SEQ ID NO: 3	AAGCAGGAGAAGCATCGCCTATTGGCATTGTCTTCACT GT
SEQ ID NO: 4	CGCCCGAAGACCAAGACCGTCGGCAAAGGTTGGAATA
SEQ ID NO: 5	GCCGCAGACTTTTCCTGA
SEQ ID NO: 6	TTTGAAACGCGCGCAAG
SEQ ID NO: 7	AAGGCAACGTCAACGC
SEQ ID NO: 8	GTCAGCACGGCCTTTG
SEQ ID NO: 9	CACCGTTGTGGCAGGCACTGAGCGAACAGGAACG
SEQ ID NO: 10	CAACCTTGAGGCACGACCTGAATTTCCAATACGGCCC
SEQ ID NO: 11	GTTGTCCATGAACGCGC
SEQ ID NO: 12	CAGAAATTCGGTCTGGTCCA
SEQ ID NO: 13	TATTCCAACCTTTGCCGAC
SEQ ID NO: 14	GCCGAAGTCCCCTTTG
SEQ ID NO: 15	CTTTGGAAAGGCGTGTTTCATACCCGTTTACCGAAGAA CAGG
SEQ ID NO: 16	CAAAGGCAATACCGTAAGCTGCCATATTGTCCACACCG GC
SEQ ID NO: 17	CAGAGTTGGTGTCCGAGTT
SEQ ID NO: 18	CTTGCCACAACCTTGCTTC
SEQ ID NO: 19	TATTTCCACAACGGCAGC
SEQ ID NO: 20	GGCTTAGATTCCATCGGTG
SEQ ID NO: 21	CCACATCTTCTTTGGAATGTCTTTGGGAGCTGGATAA GGC
SEQ ID NO: 22	GTGGATAACATCGTCGTATTCCTGACAGTTCCGGCATC GTG
SEQ ID NO: 23	CAATTGCGCCTTACCCATG
SEQ ID NO: 24	CTTTCCGGCAATGTTTCCG
SEQ ID NO: 25	TTGTCGCGTTTCGGATC

Seq ID	Secuencia (5' a 3')
SEQ ID NO: 26	CCAACCTTTGCCGACTG
SEQ ID NO: 27	CATCACTACCGCATTGGG
SEQ ID NO: 28	CAGACCGAATTTCTGGAAGG
SEQ ID NO: 29	GCTCAGGGCGTTGACGTGTTTGAGCGTACCCTGC
SEQ ID NO: 30	GCGCGTTCATGGACAACGCGTGCCTCCAAGGTTG
SEQ ID NO: 31	CCATTTGGTCGGCGTCA
SEQ ID NO: 32	GCTGTATTGCCTGCCACA
SEQ ID NO: 33	CTTAGATTCCATCGGTGCG
SEQ ID NO: 34	GGCAATGTTTCCGAATCAGC
SEQ ID NO: 35	GCGATGCTTCTCCTGC
SEQ ID NO: 36	GTGTCCGAGTTTGACCTG
SEQ ID NO: 37	GAAGCGGAAGGAACGGCTTTTCCGAGACCGAAGCG
SEQ ID NO: 38	CTCGCCCGAAGACCAAGACTCTGCATTTCTTCGACAGT C
SEQ ID NO: 39	GGCCTGTACTTGGAAGC
SEQ ID NO: 40	GCGCAAGGTGTATTCCAAC
SEQ ID NO: 41	GTGTCCGAGTTTGACCTGT
SEQ ID NO: 42	CAACCTTGCTTCCGCC
SEQ ID NO: 43	TCATTCGCCATTTCCACC
SEQ ID NO: 44	ATGCGGTAGGCGAGTTGCGTGGACAATATGCCGACC
SEQ ID NO: 45	GGGCAGCCAGTTTTGGGAGATTACCAAAGGCCCG
SEQ ID NO: 46	CCCTTTGTGCCCCTGAC
SEQ ID NO: 47	GTGCCGCCGATGTTGA
SEQ ID NO: 48	AACTCGGACACCAACTC
SEQ ID NO: 49	CATTCAATGCGGTAGGC
SEQ ID NO: 50	AGCAAGGTTGTGGCAAGAGGGTATGAACCACGCCTT
SEQ ID NO: 51	CGCCGGTGTGGACAATGAACTGCCCTTTGTGC
SEQ ID NO: 52	CAGCTTACGGTATTGCCTT
SEQ ID NO: 53	ATGCCGACCAGTCAGG
SEQ ID NO: 54	ATATGCCGACCAGTCAG
SEQ ID NO: 55	GGGAACTTTGGCGATTT
SEQ ID NO: 56	AGCAGCGCAGCATTCAATGCACAAAGGGCAGTTC

Seq ID	Secuencia (5' a 3')
SEQ ID NO: 57	TGTTGAAGAACAGGCTGGCGCGAATCATTCGCCATT
SEQ ID NO: 58	GTAGGCGAGTTGCGTC
SEQ ID NO: 59	TTGGTGAATCCGGTGGA
SEQ ID NO: 60	GAGTTGCGTCCGCCGAAGTGCCTCTTGCCACAACCTTG CTTCCG
SEQ ID NO: 61	ACCGCATTGAATGCTGCGCTGCTGCCCCGCCAGCCTGTT CTTC
SEQ ID NO: 62	TGACTGGTCGGCATATTGTCCACAC
SEQ ID NO: 63	CGGACGTGCCGCCGATGTT
SEQ ID NO: 64	CCTTTCCAAAGGCAATACCGTAAGC
SEQ ID NO: 65	TCGCCATTTCCACCGGATTCAC
SEQ ID NO: 66	TGCGGTAGGCGAGTTGCGGGACAATATGCCGACCAGT
SEQ ID NO: 67	TTGAATGCTGCGCTGCTGGCAGCCTGTTCTTCAACATC G
SEQ ID NO: 68	CGAACTGCCCTTTGTGCC
SEQ ID NO: 69	TTGGGACGGACGTGCC
SEQ ID NO: 70	TGCCACAACCTTGCTTCC
SEQ ID NO: 71	CGAATCATTCGCCATTTCCA
SEQ ID NO: 72	CTTTGGAAAGGCGTGGTTCATACAAATCCGTCCGTTTAC CG

[0035] 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.

[0036] 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.

[0037] 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 las SEQ ID NO: 73-76. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en los nucleótidos 6-22 de la SEQ ID NO: 73, los nucleótidos 5-24 de la SEQ ID NO: 74, los nucleótidos 3-21 de la SEQ ID NO: 75 y los nucleótidos 3-24 de la SEQ ID NO: 76. 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.

[0038] 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.

[0039] 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.

[0040] 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).

[0041] 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 Setts. 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.

[0042] 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.

[0043] 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 *N. gonorrhoeae*. 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.

[0044] 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.

[0045] De manera ventajosa, la invención permite una detección rápida y fiable de *N. gonorrhoeae* en una muestra clínica, tal como una muestra de orina.

[0046] 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, *N. gonorrhoeae* 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.

[0047] 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.

- 5 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:

- 10 [0048] Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se ha intentado asegurar la exactitud de las cifras utilizadas (por ejemplo, cantidades,
- 15 temperaturas, etc.), pero se debe considerar la posibilidad de ciertos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura se encuentra en grados centígrados y la presión es atmosférica o similar.

20 *Ejemplo 1: Selección de la diana, Análisis de Secuencias y Diseño del Ensayo*

- [0049] Las secuencias para *Neisseria gonorrhoeae* y las especies estrechamente relacionadas que incluyen *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria sicca* y *Neisseria cinerea* se obtuvieron de las bases de datos del Centro Nacional para la Información Bioteconológica (NCBI, por sus siglas en inglés) o el Centro para la Integración de Recursos de Patosistemas (PATRIC). Las
- 25 secuencias se alinearon mediante el uso de Clustal Omega (Sievers, et ál. (2011). Molecular Systems Biology 7:539) o MAFFT (Katoh, Standley 2013. Molecular Biology and Evolution 30:772-780) y se seleccionaron regiones únicas para *N. gonorrhoeae* para el diseño de cebadores y sondas de balizas moleculares.

- [0050] Los ensayos de detección basados en cebador/sonda fueron diseñados para utilizar
- 30 amplificación isotérmica mediada por bucle dirigida al ARN a través de la adición de una transcriptasa inversa (RT-LAMP) a la reacción. Se incluyó una sonda de baliza molecular con modificaciones de fluoróforo 5'/inactivador 3', 6-carboxifluoresceína e inactivador de agujero negro 1 para proporcionar detección fluorescente específica de la diana. Los conjuntos de cebadores RT-LAMP de *N. gonorrhoeae* (Tabla 1 y Tabla 2) se diseñaron usando una combinación de programas

de software que incluyen LAMP Designer de PremierBiosoft, Beacon Designer, un script interno y diseños manuales. Los amplicones previstos resultantes se hicieron pasar adicionalmente por el programa Blast contra la base de datos de nucleótidos NCBI, que incluye el transcriptoma humano, y contra las especies distintas de gonorrea individuales dentro del género *Neisseria* para predecir adicionalmente la especificidad del ensayo.

[0051] 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 de bucle inverso (LB).

TABLA 2 - Conjuntos de cebadores LAMP

Conj unto	F3	B3	FIP	BIP	LF	LB
Conju nto-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
Conju nto-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
Conju nto -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
Conju nto -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
Conju nto -5	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
Conju nto -6	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
Conju nto -7	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
Conju nto -8	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 34
Conju nto -9	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40

Conj unto	F3	B3	FIP	BIP	LF	LB
Conju nto - 10	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 18
Conju nto - 11	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47
Conju nto - 12	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 53
Conju nto - 13	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59
Conju nto - 14	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63
Conju nto - 15	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69

[0052] Comúnmente, 3 a 5 µL de material de ácido nucleico extraído o controles negativos (NU = orina negativa; NTC = agua sin nucleasa o amortiguador Tris, control sin plantilla) sirvieron como plantilla para las reacciones de RT-LAMP. Se prepararon reacciones con un volumen total de 10-25 µl en hielo como mezclas que contenían formulaciones que incluyen amortiguador de amplificación 1x que comprende Tris-HCl 10-40 mM, Tween 20 al 0-0,5 %, Trehalosa 0-300 mM, KCl 5-70 mM, MgSO₄ 4-10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10-20 mM, TCEP 0-2 mM y dCTP, dGTP, dATP y dTTP 1,6-2 mM cada uno. Enzimas de polimerasa NEB Bst2 (NEB CNN.º M0537L) y transcriptasa inversa RTx Warmstart (NEB CNN.º M0380S). Se agregaron cebadores (cebadores internos de 2 µM, cebadores externos de 0,2 µM y cebadores de bucle de 0,8 µM) a las reacciones individuales o directamente a las mezclas maestras según fuera necesario de acuerdo al diseño experimental. También se agregaron balizas moleculares (0,2 µM) o tinte 200 nM Yo-Pro-1, Yo-Pro-3 o To-Pro a la mezcla maestra, como se indica en los ejemplos a continuación. Se prepararon reacciones de amplificación con la mezcla de 6 cebadores estándar o una mezcla de 7 cebadores según indicación (Conjuntos

16-27). Las mezclas maestras se distribuyeron a plantillas de muestras individuales, se agitaron en vórtex y se centrifugaron brevemente y cada reacción se cargó en pocillos individuales de una placa de 96 o 384 pocillos (Roche CNN.° 4729692001 o BioRad CNhsl9605). Las reacciones se llevaron a cabo a temperaturas que oscilaron entre 60-67 °C y la fluorescencia se controló en un instrumento de PCR en tiempo real de Roche LightCycler 96 o un ciclador en tiempo real de BioRad CFX96. La amplificación de la diana se controló mediante tinte intercalante o unión de la sonda de la baliza molecular con la diana, lo que genera la liberación de la inactivación intramolecular fluorescente de la baliza molecular.

10 *Ejemplo 2: LAMP con detección de tinte*

[0053] Una matriz de orina negativa se enriqueció con *N. gonorrhoeae* titulada (diluida en serie en PBS, Zeptomatrix CN n.° 0801482, ATCC CN n.° 19424 o ATCC CN n.° 49226). Los ácidos nucleicos se extrajeron de la muestra enriquecida mediante el uso de métodos de extracción estándar y la muestra se amplificó usando cebadores LAMP (como se describe en la Tabla 2). Se usó tinte YoPro™ o una versión de longitud de onda compatible dentro de la misma familia de conjuntos de tinte (Life Technologies; tinción de ácido nucleico de carbocianina verde fluorescente) para la detección del producto amplificado. La mezcla maestra se preparó como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se resumen en la Tabla 3. NT indica condiciones no probadas. “No Amp” indica que no se detectó amplificación.

20

TABLA 3 - Tiempo hasta la detección positiva de tinte

Conjunto	5x10 ³ CFU/mL	5 CFU/mL	NTC	NU
Conjunto-12	12,89	21,66	No Amp	No Amp
Conjunto-13	6,28±0,18	9,22±0,26	42,2 (1 de 2)	No Amp
Conjunto-14	7,55	10,93	29,03	34,98
Conjunto-15	4,68	6,88	39,71	42,84
Conjunto-2	5,5±0,099	7,94±0,13	26,36±1,46	45,18±1,95

Conjunto	5x10 ³ CFU/mL	5 CFU/mL	NTC	NU
Conjunto -3	9,47±0,11	13,64±0,37	No Amp	No Amp
Conjunto -4	5,90±0,03	8,63±0,20	33,09±5,23	34,87±4,18
Conjunto -5	5,15±0,15	7,57±0,16	29,72±10,81	24,31±4,96
Conjunto -6	9,58±0,01	14,10±1,00	No Amp	No Amp
Conjunto -7	6,59±0,01	9,42±0,09	No Amp	35,84±3,22
Conjunto -8	5,26±0,19	7,57±0,01	36,17±1,19	29,5±1,53
Conjunto -1	12,56±0,94* (*5x10 ² CFU/mL)	No Amp	No Amp	NT
Conjunto -9	4,25 (*5x10 ² CFU/mL)	5,00±0,68	37,31 (1 de 3)	NT
Conjunto -10	7,42 (*5x10 ² CFU/mL)	11,18±0,25	No Amp	NT
Conjunto -11	4,90 (*5x10 ² CFU/mL)	5,92±1,15	25,52±1,15 (3 de 3)	NT

Ejemplo 3: Especificidad

[0054] Un subconjunto de los conjuntos de cebadores descritos en el Ejemplo 2 se analizó adicionalmente para determinar la especificidad al comparar las reacciones con 5x10³ y 5 CFU/mL de plantilla de ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* (NG) extraída con las reacciones con 5x10⁵-1x10⁶ CFU/mL de plantilla de ácido nucleico extraída de especies de *Neisseria* estrechamente relacionadas (las soluciones madre fueron adquiridas en Zeptomatrix), *Neisseria meningitidis* (NM), *Neisseria lactamica* (NL) y *Neisseria sicca* (NS), extracciones de orina negativas, o controles sin plantilla (NTC). Cuando se llevaron a cabo las reacciones de amplificación como se describió en el Ejemplo 1, algunos de los conjuntos de cebadores analizados demostraron cierto nivel de reactividad cruzada contra especies de *Neisseria* adicionales (Tabla 4).

TABLA 4 - Reactividad cruzada (Detección de tinte)

Conjunto	T _p NG 5x10 ³ CFU/mL	NL	NS	NM	NTC	Orina neg
Conjunto-12	12,89	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp
Conjunto-13	6,28±0,18	No Amp	No Amp	No Amp	42,2 (1 de 2)	No Amp
Conjunto-14	7,55	30,88	37,03	No call	29,03	34,98
Conjunto-15	4,68	35,38	49,98	47,75	39,71	42,84
Conjunto-2	5,5±0,099	29,87 ± 13,72	44,95±3,75	28,41±11,02	26,36±1,46	45,18±1,95
Conjunto-3	9,47±0,11	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp
Conjunto-4	5,90±0,03	18,46 ± 4,28	18,53 ± 7,46	18,48 ± 7,55	33,09±5,23	34,87±4,18
Conjunto-5	5,15±0,15	34,5±0,55	22,10±2,38	35,98±9,96	29,72±10,81	24,31±4,96
Conjunto-6	9,58±0,01	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp
Conjunto-7	6,59±0,01	26,3 (1 de 2)	No Amp	No Amp	No Amp	35,84±3,22
Conjunto-8	5,26±0,19	30,18±3,00	30,45±3,97	33,53±5,54	36,17±1,19	29,5±1,53
Conjunto-1	12,56±0,94* (*5x10 ² CFU/mL)	No Amp	No Amp	24,33±0,52	No Amp	NT
Conjunto-9	4,25 (*5x10 ² CFU/mL)	NT	NT	NT	37,31 (1 de 3)	NT

Conjunto -10	7,42 (*5x10 ² CFU/mL)	NT	NT	NT	No Amp	NT
Conjunto -11	4,90 (*5x10 ² CFU/mL)	NT	NT	NT	25,522,15 (3 de 3)	NT

Ejemplo 4: Detección de la baliza molecular

[0055] A los efectos de proporcionar un nivel adicional de detección basada en secuencia directa del producto amplificado (a diferencia de la detección indirecta del tinte), se diseñaron y utilizaron las balizas moleculares, MB1 a MB4 (SEQ ID NO: 73-76, respectivamente) dirigidas a nucleótidos exclusivos dentro del amplicón de *N. gonorrhoeae* de los conjuntos de cebadores con Tp prometedores combinados con sensibilidad, para la detección de la amplificación a partir de ácido nucleico extraído de bacterias vivas (Tabla 5). La 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')	Secuencia ID
MB1	FAM	BHQ1	CCGCAACGTGCCGCGATGTTGCGG	SEQ ID NO: 73
MB2	FAM	BHQ1	GCGTGACGGACGTGCCGCGATGTCACGC	SEQ ID NO: 74
MB3	FAM	BHQ1	CGTTGGGACGGACGTGCCGCCAACG	SEQ ID NO: 75
MB4	FAM	BHQ1	CGGGGACGGACGTGCCGCGATGTCCCCG	SEQ ID NO: 76

[0056] Se evaluaron reacciones con un volumen total de 10-25 µl utilizando eluido de extracciones de 5 a 5x10³ CFU/mL de *N. gonorrhoeae* como plantilla de entrada de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1. Si bien el uso de una baliza molecular para la detección dio como resultado un leve aumento en el Tp de la reacción, la capacidad de detectar directamente los productos de

amplificación en función de la secuencia y, de esta manera, distinguir las especies estrechamente relacionadas, es un resultado deseable.

TABLA 6 - Tiempo hasta la reactividad cruzada positiva (detección de sonda)

Cebadores	Baliza	5x10 ³ CFU/mL	5 CFU/mL	NL	NS	NM	NC	NU	NTC
Conjunto-13	MB1	9,49	13,61	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp	No Amp
Conjunto -13	MB2	8,42	12,01	NT	NT	NT	NT	NT	No Amp
Conjunto -13	MB3	8,82±0,71	12,54±0,81	No Amp	No Amp	No Amp	19,8	No Amp	No Amp
Conjunto -13	MB4	8,25±0,89	11,72±0,60	No Amp	No Amp	No Amp	22,01	No Amp	No Amp
Conjunto -14	MB1	10,55±0,03	14,47±0,39	No Amp	No Amp	No Amp	21,32	No Amp	No Amp
Conjunto -14	MB2	12,44±0,04	16,94±0,11	No Amp	No Amp	No Amp	25,14	No Amp	No Amp
Conjunto -14	MB3	10,95±0,16	14,71	No Amp	No Amp	No Amp	23,04	No Amp	No Amp
Conjunto -14	MB4	11,15±0,06	14,94±0,03	No Amp	No Amp	No Amp	24,01	No Amp	No Amp
Conjunto -15	MB1	4,74±0,60	7,76±0,73	No Amp	No Amp	No Amp	18,16	13,48	No Amp
Conjunto -15	MB2	8,09±0,06	11,26±0,11	No Amp	No Amp	No Amp	31,33	No Amp	No Amp
Conjunto -15	MB3	7,43±0,12	10,18±0,47	No Amp	No Amp	No Amp	24,17	32,86	No Amp
Conjunto -15	MB4	7,97±0,13	10,4±0,10	35,23	No Amp	No Amp	27,53	No Amp	No Amp

5

[0057] Se prepararon reacciones con un volumen total de 25 µl con eluido de la extracción para 3 CFU/mL de *Neisseria gonorrhoeae* como plantilla de entrada. Las reacciones se realizaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

TABLA 7 - Tiempo hasta la detección positiva de sonda

Cebadores	Baliza	3 CFU/mL	Frec. de positivo	NTC
Conjunto-13	SEQ ID NO: 75	18,76±2,34	67%	No Amp
Conjunto-15	SEQ ID NO: 75	18,28±0,21	67%	No Amp

Ejemplo 5: Evaluación de sensibilidad de laboratorio ampliada

[0058] Se analizó un conjunto matriz de orina de múltiples donantes anónimos para confirmar un estado negativo de *N. gonorrhoeae*, dividido en alícuotas y almacenado a -80 °C. *N. gonorrhoeae* (ATCC CNN.°19424) se diluyó en serie en medio de Mueller Hinton y alícuotas de orina agrupadas descongeladas enriquecidas con *N. gonorrhoeae* hasta una concentración final de 10X, 3X, 1X, 0,5X o 0,25X de la sensibilidad del ensayo según se calcula mediante extracción de laboratorio y banco húmedo de RT-LAMP. Las muestras se prepararon con o sin la inclusión de una solución estabilizadora. También se incluyó un control de orina negativo con o sin solución estabilizadora. Véase la Tabla 8 para entradas de volumen de solución estabilizadora y muestra específicas.

[0059] Los ácidos nucleicos se extrajeron de la muestra enriquecida usando métodos de extracción estándar y la muestra se amplificó usando el Conjunto de cebadores LAMP-15, como se describió en el Ejemplo 2. Se utilizó la baliza molecular, SEQ ID NO. 75, para la detección del producto amplificado. Se preparó la mezcla maestra como se describió en el Ejemplo 1. Los resultados se resumen en la Tabla 9. NT indica condiciones no probadas. "No Amp" indica que no se detectó amplificación.

TABLA 8 – Volúmenes de orina y estabilizador utilizados para la preparación de la muestra

Muestra	Preparación de la muestra		Análisis
	Estabilizador (mL)	Orina enriquecida (mL)	Vol. procesado (mL)
orina limpia, sin estabilizador	0	1	1

orina + estabilizador	3	6	1
--------------------------	---	---	---

TABLA 9 – Tiempo hasta la detección positiva de sonda

Conc. (CFU/mL)	¿Estabilizador? S/N	Tp (min.)	Frec. de positivo
2	N	8,43±0,37	20/20
0,6		8,79±0,29	45/45
0,2		9,80±1,16	38/45
0,1		10,51±1,31	45/45
0,05		11,08±1,11	43/45
0		No Amp	0/5

[0060] Si bien la invención que antecede se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, será evidente para los expertos en la técnica a la luz de las indicaciones de la presente invención que se pueden realizar determinados cambios y modificaciones a esta sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el fin de describir solamente modalidades particulares y no se pretende que sea taxativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[0061] Por consiguiente, lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se comprenderá que los expertos en la técnica podrán concebir distintas configuraciones que, si bien no se describen ni muestran expresamente en la presente, incorporan los principios de la invención y se encuentran dentro de su espíritu y alcance. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional descritos en la presente pretenden principalmente ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos que contribuyen los inventores para fomentar la técnica, y se deberán interpretar como que no limitan dichos ejemplos y condiciones específicamente descritos. Además, todo lo expuesto en la presente en cuanto a principios, aspectos y modalidades de la invención, así como ejemplos específicos de estos, pretende comprender tanto equivalentes estructurales como funcionales de estos. Adicionalmente, se pretende que dichos equivalentes incluyan tanto equivalentes conocidos en la actualidad como equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, todo elemento desarrollado que lleve a cabo la misma función, sin importar la estructura.

Por lo tanto, no se pretende que el alcance de la presente invención se limite a los ejemplos de modalidades que se muestran y se describen en la presente. En cambio, el alcance y el espíritu de la presente invención están comprendidos por las reivindicaciones adjuntas.