

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 303 395**

(21) Número de solicitud: 200403083

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCION

B1

(22) Fecha de presentación: **24.12.2004**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2008**

Fecha de la concesión: **13.05.2009**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
23.04.2009

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **29.05.2009**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
29.05.2009

(73) Titular/es: **Instituto de Salud Carlos III
Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES**

(72) Inventor/es: **Pérez Breña, Pilar;
Coiras López, María Teresa y
Casas Flecha, Inmaculada**

(74) Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

(54) Título: **Sondas y métodos para la detección e identificación simultánea de múltiples virus causantes de infecciones respiratorias en humanos.**

(57) Resumen:

Sondas y métodos para la detección e identificación simultánea de múltiples virus causantes de infecciones respiratorias en humanos.

Se describen sondas y ensayos útiles para detectar simultáneamente, en una única muestra de ensayo, una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos de virus causantes de infecciones respiratorias en humanos seleccionados entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), metapneumovirus humano y combinaciones de los mismos.

ES 2 303 395 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Sondas y métodos para la detección e identificación simultánea de múltiples virus causantes de infecciones respiratorias en humanos.

Campo de la invención

La invención se relaciona, en general, con la detección de secuencias de ácidos nucleicos, y, en particular, con sondas y ensayos útiles para detectar simultáneamente una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos en una única muestra de ensayo. Más específicamente, la invención se relaciona con sondas y métodos para la detección, mediante hibridación, de una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos de virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, eventualmente presentes en una única muestra de ensayo, seleccionados entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), metapneumovirus humano y combinaciones de los mismos.

Antecedentes de la invención

Los signos y síntomas que causa la infección del tracto respiratorio por diferentes virus e incluso algunas bacterias, son generalmente indistinguibles desde un punto de vista clínico. Por ello, es preciso disponer de una herramienta diagnóstica que permita no sólo identificar al agente causante de la infección, sino que esta identificación se realice en un corto periodo de tiempo para que el resultado obtenido contribuya a instaurar rápidamente las medidas curativas o paliativas adecuadas y, en el caso de que esté producida por un virus, se evite la innecesaria administración de antibióticos, con la posible aparición de resistencias bacterianas. Además, el hecho de disponer de un método diagnóstico rápido y fiable de la infección viral es de importancia vital para aquellas enfermedades virales que pueden ser tratadas mediante la administración de fármacos antivirales, como es el caso de los virus de la gripe. Ello contribuiría significativamente a disminuir la morbi-mortalidad causada por estos virus en colectivos de riesgo, tales como ancianos, lactantes y pacientes inmunodeprimidos. Considerando que en un futuro próximo se podrá disponer de nuevos fármacos antivirales, habrá también una creciente demanda de métodos diagnósticos sensibles que se incluyan de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología que permitan identificar rápidamente los diferentes virus causantes de las infecciones respiratorias.

El diagnóstico de laboratorio es, por tanto, imprescindible para la detección e identificación de los virus causantes de infecciones del tracto respiratorio que causan enfermedades con signos y síntomas clínicamente indistinguibles. Erróneamente, se cree, por ejemplo, que una faringitis estreptocócica puede ser diferenciada de manera fiable de una faringitis vírica en un paciente individual. Se puede incluso realizar una estimación probabilística de ello (por ejemplo, los síntomas de un resfriado común tienen un 80% de valor predictivo negativo para el diagnóstico de una faringitis bacteriana), pero la confirmación debe realizarse mediante un análisis de laboratorio.

En general, el diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias víricas en humanos ha sido realizado, hasta el momento, utilizando métodos tradicionales, tales como el aislamiento en cultivos celulares o la técnica de inmunofluorescencia (IF) indirecta, que, aunque presentan una elevada sensibilidad, no permiten más que, salvo contadas ocasiones, distinguir la presencia de más de un virus coinfectando la muestra, lo que puede ser debido a varios factores, por ejemplo: (i) la destrucción de la monocapa de células por el virus que presente una mayor actividad citopática, lo que enmascara el crecimiento de otros virus eventualmente presentes en la muestra a ensayar que crecieran más lentamente o que produjeran un efecto citopático menos evidente, y (ii) la no disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos que permitieran la identificación de los virus que están coinfectando la muestra. Por ello, el diagnóstico de las coinfecciones está infravalorado, debido a la ausencia de técnicas lo suficientemente sensibles y específicas como para detectarlas.

Actualmente se están introduciendo cada vez más en el diagnóstico clínico rutinario ensayos basados en la detección del genoma viral en una muestra clínica o en un cultivo celular de la misma. Los tipos de ensayos que permiten detectar genomas virales se basan, en general, en métodos de hibridación o en métodos de amplificación.

En el primer caso (métodos de hibridación), los genomas virales pueden ser detectados mediante el uso de sondas u oligonucleótidos con una secuencia homóloga a la del virus eventualmente presente en la muestra a analizar. Estas técnicas suelen ser sencillas y de revelado no radiactivo, por ejemplo, mediante fluorescencia o quimioluminiscencia. Los métodos basados en técnicas de hibridación presentan, además de las ventajas de especificidad y sensibilidad, la posibilidad de poder cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos virales presentes en la muestra (carga viral), lo que puede emplearse para monitorizar la respuesta del paciente frente a la terapia antiviral.

Los métodos de amplificación genómica permiten amplificar varios millones de veces determinadas secuencias de genomas virales, de modo que puedan ser detectadas fácilmente. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto en formato simple como múltiple, ha demostrado ser un método de amplificación genómica extremadamente sensible y específico en el diagnóstico de las infecciones respiratorias causadas por virus. La amplificación genómica es relativamente habitual en ensayos para el diagnóstico de infecciones respiratorias en humanos debido a que, en general, la

cantidad de virus presente en una muestra respiratoria convencional (lavado o aspirado nasofaríngeo, frotis faríngeo, gargarismo, etc.) suele ser escasa. Por ello, para obtener el máximo de sensibilidad suele ser necesario realizar, a continuación de la primera reacción de amplificación, una segunda amplificación sobre el fragmento obtenido mediante, por ejemplo, una PCR anidada (nested-PCR). Generalmente, la primera reacción de amplificación es una RT-PCR (RT: retrotranscripción o transcripción reversa) puesto que la mayoría de los virus causantes de infecciones respiratorias en humanos poseen un genoma constituido por RNA. Aunque la realización de una PCR anidada es sencilla y fácil de introducir en la rutina de un laboratorio de diagnóstico, también supone una posible fuente de falsos positivos debido a que la enorme amplificación del fragmento génico viral puede dar lugar a contaminaciones por productos de amplificación de muestras adyacentes. Por ello, para llevar a cabo de manera rutinaria técnicas de PCR anidada es necesario tomar precauciones especiales, entre las que se encuentran, por ejemplo, el hecho de que los pasos necesarios para la realización del proceso de amplificación deben realizarse en laboratorios físicamente separados, en cabinas de flujo laminar distintas, cada una de ellas dotada de reactivos, juegos de micropipetas, tubos estériles y puntas con filtro estériles, todo ello completamente independiente. En el caso de laboratorios pequeños o dotados de escaso material y/o equipos de laboratorio, esto suele ser poco factible.

Por otra parte, los métodos basados en reacciones de amplificación permiten la detección de uno o varios agentes virales simultáneamente, pero no de todos los posibles virus causantes de infecciones respiratorias, ya que, como es bien conocido, existen dificultades técnicas para realizar PCRs múltiples que permitan la detección simultánea de varios virus, tales como la pérdida de sensibilidad al aumentar el número de iniciadores en la mezcla de la reacción o la necesidad de ajustar la situación de los iniciadores en el gen a amplificar con objeto de obtener fragmentos fácilmente diferenciables por su tamaño al analizarlos mediante electroforesis en gel de agarosa.

A pesar de todo, se ha descrito una RT-PCR múltiple para la detección y tipado simultáneo de algunos virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, concretamente, de virus influenza A, B y C, virus respiratorio sincitial A y B y adenovirus (Coiras *et al.*, 2003, J Med Virol 69:132-144).

Una aproximación alternativa interesante al diagnóstico de infecciones respiratorias de origen viral se basa en la aplicación combinada de técnicas de amplificación genómica e hibridación con sondas específicas. Esta aproximación es la seguida en el ensayo "Hexaplex", el cual se basa en una amplificación mediante RT-PCR múltiple en un sistema de hibridación con sondas y detección enzimática. Mediante esta técnica es posible detectar los siguientes virus: virus respiratorio sincitial tipos A y B, virus influenza tipos A y B y virus parainfluenza tipos 1, 2 y 3. No obstante, ese método no permite detectar otros virus causantes de infecciones respiratorias en humanos importantes tales como: adenovirus, un grupo importante de patógenos del tracto respiratorio; el virus parainfluenza tipo 4, causante de infecciones generalmente en niños menores de 2 años no tan leves como se había descrito anteriormente; enterovirus, rhinovirus, ni coronavirus, siendo estos dos últimos grupos los patógenos del tracto respiratorio superior más comunes y posibles causantes de serias complicaciones en el paciente. Además, esos tres últimos grupos de virus se encuentran repetidamente en muestras clínicas de pacientes con infección respiratoria, pero su papel como agentes causantes de infecciones respiratorias está poco definido, así como su epidemiología, debido a la dificultad de su detección mediante los métodos habituales.

Por tanto, los métodos actuales utilizados en el diagnóstico rutinario de laboratorio de los virus causantes de infección respiratoria en humanos presentan varias desventajas:

- escasa sensibilidad y/o especificidad;
- aparición de falsos negativos cuando se utilizan técnicas basadas en IF;
- aparición de falsos positivos cuando se utilizan técnicas basadas en la PCR anidada;
- pueden pasar días o incluso semanas antes de la obtención de resultados, sobre todo en el caso del aislamiento viral en cultivos celulares;
- dependencia de algunas técnicas del estado de la muestra clínica, resultado del proceso de toma, conservación y transporte de la misma. Esto es especialmente importante en el caso del aislamiento viral en cultivos celulares y de las técnicas de inmunofluorescencia, donde puede dar lugar a falsos negativos;
- la contaminación de la muestra con bacterias procedentes de la flora normal de la región donde se ha realizado la toma de la misma, puede dificultar su análisis mediante métodos como el aislamiento viral en cultivos celulares, lo que puede originar falsos negativos; y.
- la necesidad, en algunos casos, de personal cualificado o experimentado en la técnica en cuestión.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar métodos efectivos que permitan detectar e identificar simultáneamente los principales agentes virales causantes de infecciones respiratorias en humanos, que subsanen la totalidad o parte de los problemas existentes con los métodos actualmente utilizados en el diagnóstico rutinario de laboratorio de los virus causantes de infección respiratoria en humanos. Dichos métodos deberían proporcionar, de forma rápida, específica y sensible, resultados que pudieran ser utilizados por el clínico en la toma de decisiones terapéuticas, profilácticas o paliativas. A modo ilustrativo, un método diagnóstico adecuado sería aquel que permitiera diferenciar virus causantes

de infecciones respiratorias que requirieran la inmediata hospitalización o aislamiento del paciente, de otras causas más leves de infección del tracto respiratorio. Ventajosamente, dichos métodos deberían poder ser realizados en laboratorios cercanos a donde se encuentre el paciente, con instalaciones y equipos económicos, y, sin que fuera necesaria la participación de personal altamente cualificado.

Compendio de la invención

La invención proporciona una solución a la necesidad existente consistente en unas sondas y métodos que permiten detectar e identificar simultáneamente, de forma rápida, específica y sensible, los principales virus causantes de infecciones respiratorias humanas eventualmente presentes en una única muestra de ensayo. Para ello, la invención se basa en el desarrollo de un sistema de hibridación en el que se inmovilizan sobre un soporte sólido diferentes oligonucleótidos con secuencias específicas (sondas). Estas sondas han sido diseñadas para hibridar específicamente con secuencias diana presentes en el genoma de dichos virus, lo que permite no solo la detección e identificación del virus causante de la enfermedad respiratoria sino que, además, posibilita su tipado simultáneamente. Este sistema puede ser adaptado al desarrollo de kits de fácil manejo destinados a laboratorios de microbiología que requieran establecer un diagnóstico etiológico de enfermedades infecciosas respiratorias humanas.

Los virus causantes de infecciones respiratorias en humanos que pueden ser identificados mediante el método proporcionado por esta invención incluyen virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), metapneumovirus humano, y combinaciones de los mismos.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una sonda útil para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos seleccionados entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y metapneumovirus humano.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una plataforma de hibridación que comprende un soporte sólido y, al menos, una de dichas sondas inmovilizada sobre dicho soporte sólido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos seleccionados entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), metapneumovirus humano y combinaciones de los mismos, eventualmente presentes en una única muestra de ensayo, basado en la hibridación de secuencias diana presentes en el genoma de dichos virus, opcionalmente amplificadas mediante una reacción de amplificación, con dichas sondas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos seleccionados entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), metapneumovirus humano y combinaciones de los mismos, mediante dicho método que comprende, al menos, una de dichas sondas, o, al menos, una de dichas plataformas de hibridación.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la detección de cepas de referencia de virus causantes de infecciones respiratorias en humanos crecidas en cultivos celulares mediante hibridación en membrana de nylon y visualización mediante quimioluminiscencia. Los virus ensayados fueron virus influenza tipo A (VIA), virus influenza tipo B (VIB), virus respiratorio sincitial humano tipo A (RSVA), virus respiratorio sincitial humano tipo B (RSVB), adenovirus humano (ADV1), coronavirus humano tipo 229E (HCV229E), virus parainfluenza humano tipo 1 (PIV1), virus parainfluenza humano tipo 2 (PIV2), virus parainfluenza humano tipo 3 (PIV3), virus parainfluenza humano tipo 4 A (PIV4A), coronavirus humano tipo OC43 (HCVOC43), echovirus (Echo30), rinovirus (Rhino14), metapneumovirus humano (metapneumovirus) y virus influenza tipo C (VIC). Para más información véase el Ejemplo 1.

La Figura 2 muestra la detección mediante hibridación en membrana de nylon y visualización mediante quimioluminiscencia de virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, aislados de muestras clínicas del tracto respiratorio inoculadas en cultivos celulares. Los virus detectados fueron virus influenza tipo A (Influenza A), virus influenza tipo B (Influenza B), virus respiratorio sincitial tipo A (RSVA), virus respiratorio sincitial tipo B (RSVB), adenovirus humano (ADV1) y virus parainfluenza humano tipo 3 (Parainfluenza tipo 3). Se utilizaron sondas con diferentes concentraciones con el fin de observar la sensibilidad en función de la concentración de las sondas. Para más información véase el Ejemplo 2.

La Figura 3 muestra la detección de virus influenza tipo A presente en muestras clínicas mediante hibridación en membrana de nylon (Figura 3A) y mediante PCR anidada (Figura 3B). Para una descripción del ensayo véase el Ejemplo 3. La Figura 3A muestra los resultados de la hibridación de ácidos nucleicos procedentes de las muestras clínicas ensayadas para detectar virus influenza tipo A con las sondas (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) inmovilizadas en la membrana (Carriles 1-12). No se detectó virus influenza A en las muestras 2, 7 y 8. En la Figura 3B se muestran los resultados de una PCR anidada llevada a cabo para comprobar la sensibilidad y especificidad de la técnica anterior (hibridación). Los carriles 1-12 corresponden a los carriles 1-12 observados en la Figura 3A. El carril M corresponde al marcador XIV de pesos moleculares, suministrado por Roche Diagnostics (marcador de 100 pb). En todos los carriles (excepto 2, 7 y 8) se observa una banda de 721 pares de bases (pb), correspondiente al fragmento amplificado del gen de la nucleoproteína del virus influenza humano de tipo A y una banda de 837 pb correspondiente al control interno utilizado como control del proceso de extracción del material genético a partir de la muestra, así como de la reacción de PCR (véase el Ejemplo 3). Se observa que los resultados obtenidos con ambas técnicas son concordantes.

La Figura 4 muestra la detección de coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) presente en muestras clínicas mediante hibridación en membrana de nylon y visualización por quimioluminiscencia. Se ensayaron diversas concentraciones de la sonda utilizada (SEQ ID NO: 18). Para una descripción del ensayo véase el Ejemplo 4.

La Figura 5 muestra la detección de adenovirus humano en muestras clínicas (secreciones respiratorias) procedentes de pacientes con cuadros respiratorios mediante hibridación en soporte de cristal (portaobjetos) y visualización por fluorescencia. Se observa la fluorescencia emitida por las moléculas de Cy3 presentes en el producto de amplificación obtenido mediante oligonucleótidos iniciadores específicos para adenovirus humanos. Se han utilizado para la amplificación y el marcaje mediante PCR, diluciones de adenovirus causantes de infección respiratoria en humanos pertenecientes a los serotipos 1 (imagen 1), 2 (imagen 2), 4 (imagen 3), 5 (imagen 4) y 7 (imagen 5), equivalentes estas diluciones a 10^3 copias de un plásmido que contiene el fragmento del gen de la proteína del hexón de adenovirus humano amplificado en las condiciones descritas en el Ejemplo 5. Se incluye un control negativo.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona sondas y métodos para identificar simultáneamente una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos de los principales virus causantes de infecciones respiratorias en humanos eventualmente presentes en una única muestra de ensayo.

Sondas

En un aspecto, la invención se relaciona con unas sondas, en adelante sondas de la invención, que permiten la identificación, mediante hibridación específica, de los principales virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, entre los que se encuentran virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y metapneumovirus humano.

El término “sonda”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un oligonucleótido de secuencia definida capaz de hibridar con una secuencia complementaria de un ácido nucleico, por lo que puede utilizarse para detectar e identificar secuencias complementarias, o sustancialmente complementarias, en ácidos nucleicos mediante hibridación específica. Asimismo, el término “hibridación”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la formación de una estructura de tipo dúplex por dos ácidos nucleicos debido al apareamiento de bases complementarias. La hibridación puede ocurrir entre cadenas de ácidos nucleicos totalmente complementarias o entre cadenas de ácidos nucleicos “sustancialmente complementarias” que contienen pequeñas regiones desapareadas. Las condiciones en las que hibridan cadenas de ácidos nucleicos totalmente complementarias se denominan “condiciones estrictas de hibridación” o “condiciones de hibridación específicas de secuencia”. No obstante, se pueden obtener cadenas dobles estables de ácidos nucleicos sustancialmente complementarias bajo condiciones de hibridación menos estrictas, en cuyo caso, el grado de desapareamiento tolerado puede ajustarse mediante ajuste apropiado de las condiciones de hibridación. El experto en la materia puede determinar empíricamente la estabilidad de un dúplex teniendo en cuenta diversas variables, tales como, la longitud y concentración de pares de bases de las sondas, la fuerza fónica y la incidencia de los pares de bases desapareados, siguiendo las directrices del estado de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); y Wetmur, Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol. 26 (3/4):227-259 (1991)).

Las sondas de la invención son complementarias o sustancialmente complementarias a secuencias diana específicas contenidas en los genomas de dichos virus causantes de infecciones respiratorias en humanos (virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y metapneumovirus humano) de manera que permitan la detección genérica de los mismos.

La longitud de las sondas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo aunque, por razones prácticas, se prefieren sondas de longitud pequeña, típicamente comprendida entre 15 bases y 30 bases, preferentemente, entre 19 bases y 23 bases. El empleo de sondas de mayor o menor longitud no afectaría a la sensibilidad o especificidad de la técnica, pero podría precisar de la realización de una serie de modificaciones sobre las condiciones en las que se realiza la misma al variar la temperatura de fusión de las mismas y su contenido en GC, lo cual afectaría a la temperatura y tiempo de hibridación, fundamentalmente.

En una realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus influenza tipo A mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la nucleoproteína o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Dichas sondas se pueden emplear por separado o juntas para aumentar la sensibilidad de la detección.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus influenza tipo B mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la nucleoproteína o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. Dichas sondas se pueden emplear por separado o juntas para aumentar la sensibilidad de la detección.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus influenza tipo C mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la nucleoproteína o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluye el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 5.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus respiratorio sincitial humano tipo A mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína de fusión (proteína F) o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7. Dichas sondas se pueden emplear por separado o juntas para aumentar la sensibilidad de la detección.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus respiratorio sincitial humano tipo B mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína de fusión (proteína F) o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 8.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de adenovirus humano mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína hexón o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 9.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus parainfluenza humano tipo 1 mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína hemaglutinina o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 10.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus parainfluenza humano tipo 2 mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína hemaglutinina o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 11.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus parainfluenza humano tipo 3 mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína hemaglutinina o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 12.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de virus parainfluenza humano tipos 4A y 4B mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína hemaglutinina o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido

identificado como SEQ ID NO: 13 que permite detectar la presencia de los virus parainfluenza humanos tipos 4A ó 4B pero no permite su distinción.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de enterovirus mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en la región 5' no codificante o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 14.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de rinovirus mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en la región 5' no codificante o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 15.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de coronavirus humano tipo 229E mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína espicular o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 16.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de coronavirus humano tipo OC43 mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína espicular o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 17.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína espicular o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 18.

En otra realización particular, la invención proporciona sondas para la detección e identificación de metapneumovirus humano mediante hibridación específica que incluyen polinucleótidos de 15 a 30 bases capaces de hibridar bajo condiciones estrictas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico localizada en el gen de la proteína polimerasa o su cadena complementaria. Ejemplos ilustrativos de dichas sondas incluyen el polinucleótido identificado como SEQ ID NO: 19.

Las sondas proporcionadas por esta invención permiten llevar a cabo la detección e identificación simultánea de los principales virus causantes de infección respiratoria en humanos e incluso su tipado y/o subtipado simultáneo.

Las sondas de la invención, en particular, las sondas cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en las SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 19, presentan varias ventajas ya que su corta longitud (23 bases como máximo) hace que su síntesis sea muy económica y, además, permiten la detección genérica de los principales virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, incluyendo serotipos de los mismos, tales como virus influenza de todos los subtipos del tipo A, todas las variantes de virus influenza tipo B, virus variantes de influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, todos los tipos de adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, variantes del coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y cepas variantes del metapneumovirus humano. De este modo, el empleo de dichas sondas permite detectar e identificar cientos de virus causantes de infección respiratoria con un bajo coste, por lo que constituyen un paso importante para producir una herramienta diagnóstica que reúna todas las ventajas de las técnicas de hibridación para la detección e identificación simultánea de los principales virus causantes de infección en el tracto respiratorio humano.

Otras ventajas asociadas con el empleo de sondas oligonucleotídicas para la detección e identificación de virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, tales como las sondas de la invención, incluyen:

- la posibilidad no sólo de identificar y caracterizar los virus causantes de las infecciones respiratorias sino, además, de conocer si son sensibles o resistentes a los antivirales disponibles;
- los ensayos de hibridación mediante sondas oligonucleotídicas permiten, también, cuantificar la carga viral en la muestra a analizar con el fin de monitorizar en tiempo real la eficacia de la terapia antiviral en el paciente; y
- se pueden emplear para estudios epidemiológicos en tiempo real por su rapidez en detección y tipado simultáneo de múltiples virus al mismo tiempo.

Para llevar a cabo la detección e identificación simultánea de los principales virus causantes de infección respiratoria en humanos e incluso su tipado y/o subtipado simultáneo, las sondas de la invención, ventajosamente, están inmovilizadas en un soporte sólido, tal como se describirá más adelante. Dichos soportes sólidos en los que se han inmovilizado las sondas de la invención, que constituyen unas plataformas de hibridación, representan un aspecto adicional de esta invención.

Con el fin de facilitar la inmovilización de las sondas al soporte sólido, las sondas pueden incorporar características adicionales que permitan la inmovilización al soporte pero que no alteren su característica principal (hibridar con secuencias complementarias de ácido nucleico). A modo ilustrativo, dichas sondas pueden contener un grupo amino en el extremo 5' para facilitar la inmovilización de la sonda y orientar espacialmente la sonda sobre la membrana o en caso de soporte de cristal, el tratamiento de la superficie con poli-L-lisina permite la inmovilización de las sondas sin orientación espacial.

Plataforma de hibridación

En otro aspecto, la invención se relaciona con una plataforma de hibridación que comprende un soporte sólido y, al menos, una sonda de la invención inmovilizada sobre dicho soporte sólido.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “soporte sólido” se refiere a un material insoluble, o que puede convertirse en insoluble mediante una reacción posterior. Dicho soporte sólido puede elegirse en función de su capacidad intrínseca para inmovilizar una sonda oligonucleotídica, o bien puede incorporar un receptor adicional con capacidad para inmovilizar la sonda oligonucleotídica de modo que permita una unión indirecta de la sonda al soporte sólido a través de dicho receptor. Dicho receptor adicional puede ser una sustancia cargada con una carga opuesta a la de la sonda o bien puede ser un miembro de unión específica inmovilizado sobre (o unido a) el soporte sólido con capacidad para inmovilizar la sonda a través de una reacción de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina que permite la inmovilización de sondas de oligonucleótidos biotinilados. El soporte sólido puede estar constituido por cualquier material apropiado que permita la inmovilización, directa o indirecta, de la sonda a dicho soporte sólido, por ejemplo, plásticos, plásticos derivatizados, polímeros, látex, fibra óptica, superficies de vidrio o silicio, superficies cerámicas, superficies metálicas, etc. Dichos materiales pueden utilizarse en cualquier configuración apropiada conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, en forma de membranas, láminas, films, placas, chips, etc., o bien pueden estar recubriendo, total o parcialmente, o unidos a, portadores inertes tales como papel, nylon, vidrio, films plásticos, tejidos, etc. Adicionalmente, si se desea, el soporte sólido puede estar recubierto para facilitar la inmovilización de las sondas a su superficie. En una realización particular, dicho soporte sólido es una membrana de nylon o una superficie de vidrio o cristal, por ejemplo, un portaobjetos, opcionalmente recubiertos, por ejemplo, con membranas, soportes de silicona, soportes poliméricos, etc.

En una realización particular, la sonda de la invención inmovilizada sobre dicho soporte sólido se selecciona del grupo formado por los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y sus mezclas. Aunque la plataforma de hibridación puede contener un número variable de sondas de la invención inmovilizadas sobre el soporte sólido, en una realización particular, la plataforma de hibridación de la invención comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19 de dichas sondas (SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 19). Ventajosamente, la plataforma de hibridación de la invención comprende dichas 19 sondas de la invención (SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 19).

Las sondas de la invención pueden estar dispuestas sobre el soporte sólido en una disposición orientada (conocida) o no orientada. Tal como aquí se utiliza, el término “disposición orientada” significa que la sonda está inmovilizada sobre el soporte en una localización definida (posición conocida). Por tanto, en una realización particular, la plataforma de hibridación de la invención comprende dos o más sondas de la invención inmovilizadas sobre dicho soporte sólido en una disposición no orientada. Alternativamente, en otra realización particular, la plataforma de hibridación de la invención comprende dos o más sondas de la invención inmovilizadas sobre dicho soporte sólido en una disposición orientada. Ventajosamente, las sondas de la invención están inmovilizadas sobre el soporte sólido en una disposición orientada, constituyendo una matriz o chip.

Los biochips o arrays de DNA implican la disposición en zonas puntuales de un soporte de un conjunto de sondas específicas. Puesto que la deposición de las sondas se realiza en puntos microscópicos, se puede aplicar en un solo biochip una cantidad muy elevada de sondas distintas, del orden de 10.000-500.000 sondas distintas por biochip, lo que permite detectar simultáneamente diversos patógenos virales causantes de infecciones respiratorias en humanos eventualmente presentes en una única muestra clínica. Además de detectar e identificar el virus causante de la infección, el biochip también permitiría cuantificar la carga viral e incluso identificar el fármaco antiviral frente al cual es sensible o resistente, con objeto de facilitar el tratamiento del paciente.

Prácticamente cualquier método conocido por los técnicos en la materia puede ser utilizado para inmovilizar las sondas de la invención al soporte sólido. Un método habitualmente utilizado consiste en el recubrimiento no covalente del soporte sólido con un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, estreptavidina, y la inmovilización de sondas de oligonucleótidos biotiniladas. Alternativamente, las sondas oligonucleotídicas se pueden unir directamente al soporte sólido mediante reacciones de acoplamiento de tipo epóxido/amina.

En una realización particular, el soporte sólido es una membrana que posee una superficie de carga negativa, tal como una membrana de nylon. En este caso, antes de la unión de las sondas, la membrana se trata con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) para activar los grupos carboxilo presentes en la superficie de la membrana. Las sondas, en este caso, están diseñadas para contener un grupo amino en el extremo 5' con el fin de orientar espacialmente la sonda sobre la membrana.

En otra realización particular, el soporte sólido es un portaobjetos de cristal (vidrio), tal como un portaobjetos, opcionalmente sometido a un tratamiento con poli-L-lisina con el fin de disponer sobre la superficie de cristal grupos amino que se van a unir por interacciones electroestáticas a los grupos fosfato de las sondas, que no quedan orientadas espacialmente sobre la superficie.

La concentración de las sondas en el soporte sólido puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se encuentran la naturaleza y tipo de soporte sólido, la naturaleza de la sonda, etc.; no obstante, en una realización particular, cuando el soporte sólido es una membrana de nylon, las sondas se pueden utilizar a una concentración comprendida entre aproximadamente 60 y aproximadamente 400 pmoles por carril, preferentemente, entre 0,8 y 1 pmoles/ μ l. Alternativamente, cuando el soporte sólido es un portaobjetos de cristal, la concentración de las sondas puede estar comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 40 pmol/ μ l, preferentemente, 20 pmol/ μ l aproximadamente.

Método de detección e identificación de virus causantes de infecciones respiratorias en humanos

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, en adelante método de la invención, seleccionados entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), metapneumovirus humano y combinaciones de los mismos, eventualmente presentes en una muestra de ensayo, que comprende:

- a) poner en contacto ácidos nucleicos procedentes de dicha muestra de ensayo con una plataforma de hibridación de la invención que comprende un soporte sólido y, al menos, una sonda de la invención inmovilizada sobre dicho soporte sólido, en donde cada una de dichas sondas es sustancialmente complementaria a una secuencia diana específica de cada uno de dichos virus causantes de infección respiratoria; y
- b) detectar la posible hibridación de dichas secuencias diana con dichas sondas.

Tal como aquí se utiliza, el término “muestra de ensayo” se refiere a cualquier muestra biológica sospechosa de contener uno o más virus causantes de infección respiratoria en humanos, tales como virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y metapneumovirus humano. El genoma de dichos virus contiene secuencias diana que permiten su detección e identificación mediante hibridación de dichas secuencias diana con las sondas apropiadas, posibilitando además, en ocasiones, su tipado simultáneo. La muestra de ensayo puede proceder de cualquier fuente biológica, por ejemplo, muestras de origen humano de fluidos o tejidos biológicos, tales como sangre, esputo, gargarismo, frotis (faríngeo o nasofaríngeo), aspirados (nasofaríngeo, bronquial, traqueal o pleural), etc., así como de productos de la sangre (plasma, suero, leucocitos). Asimismo, la muestra de ensayo puede proceder de cultivos celulares de virus. La muestra de ensayo puede ser utilizada bien directamente, tal como se obtiene de la fuente, o bien después de ser sometida a un tratamiento previo a su uso con el fin de modificar sus características, por ejemplo, diluyendo fluidos viscosos, inactivando agentes interferentes, convirtiendo ácidos nucleicos de cadena doble en ácidos nucleicos monocatenarios, acumulando, purificando o amplificando secuencias diana, etc.

Aunque la plataforma de hibridación puede contener una única sonda de la invención, en la práctica se prefiere que dicha plataforma de hibridación contenga dos o más sondas de la invención, preferentemente, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19 de las sondas de la invención cuyas secuencias de nucleótidos se seleccionan entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19. Ventajosamente, la plataforma de hibridación de la invención comprende dichas 19 sondas de la invención (SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 19).

Prácticamente cualquier sonda de la invención, cuya secuencia de nucleótidos sea complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia diana específica de cada uno de dichos virus causantes de infección respiratoria puede ser utilizada en la puesta en práctica del método de la invención ya que la hibridación de las sondas con las secuencias diana es indicativa de la presencia del virus correspondiente en la muestra analizada. No obstante, en una realización particular del método de la invención, las sondas de la invención inmovilizadas sobre dicho soporte sólido se seleccionan del grupo formado por los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID

ES 2 303 395 B1

NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19. En este caso:

- 5 la hibridación de una secuencia diana con una sonda seleccionada entre los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o sus mezclas es indicativa de la presencia de virus influenza tipo A en la muestra;
- 10 la hibridación de una secuencia diana con una sonda seleccionada entre los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o sus mezclas es indicativa de la presencia de virus influenza tipo B en la muestra;
- 15 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 5 es indicativa de la presencia de virus influenza tipo C en la muestra;
- 20 la hibridación de una secuencia diana con una sonda seleccionada entre los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y/o sus mezclas es indicativa de la presencia de virus respiratorio sincitial humano tipo A;
- 25 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 8 es indicativa de la presencia de virus respiratorio sincitial humano tipo B;
- 30 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 9 es indicativa de la presencia de adenovirus humano;
- 35 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 10 es indicativa de la presencia de virus parainfluenza humano tipo 1;
- 40 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 11 es indicativa de la presencia de virus parainfluenza humano tipo 2;
- 45 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 12 es indicativa de la presencia de virus parainfluenza humano tipo 3;
- 50 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 13 es indicativa de la presencia de virus parainfluenza humano tipo 4A y 4B;
- 55 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 14 es indicativa de la presencia de enterovirus;
- 60 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 15 es indicativa de la presencia de rinovirus;
- 65 la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 16 es indicativa de la presencia de coronavirus humano tipo 229E;
- la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 17 es indicativa de la presencia de coronavirus humano tipo OC43;
- la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 18 es indicativa de la presencia de coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS); y
- la hibridación de una secuencia diana con la sonda identificada como SEQ ID NO: 19 es indicativa de la presencia de metapneumovirus humano.

La detección de la hibridación de las secuencias diana con las sondas de la invención puede llevarse a cabo mediante cualquier método apropiado conocido por los expertos en la materia. El marcaje del material genético (ácidos nucleicos) a hibridar será diferente en función del método de detección seleccionado. El marcador puede estar incorporado bien en la secuencia diana a hibridar con la sonda o bien en la propia sonda. En una realización particular, la detección de la hibridación [etapa b)] se realiza mediante un método radiactivo, mientras que, en otra realización particular, la detección de la hibridación [etapa b)] se realiza mediante un método no radiactivo, por ejemplo, mediante un método fluorescente, colorimétrico o luminiscente (bioluminiscente o quimioluminiscente). A modo ilustrativo, puede efectuarse un marcaje con fluoresceína o biotina para detección quimioluminiscente, o bien un marcaje con digoxigenina para detección quimioluminiscente o quimioluminiscente, etc.

Para la puesta en práctica del método de la invención, los ácidos nucleicos virales pueden ser detectados e identificados sin necesidad de aislar las partículas virales.

En una realización particular, el método de la invención comprende la realización de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos virales antes de efectuar la etapa de hibridación [etapa a)]. Esta alternativa resulta particularmente interesante cuando la concentración de los virus causantes de infecciones respiratorias humanas a detectar presente en las secreciones respiratorias es baja (lo que sucede habitualmente) ya que entonces la cantidad de material genético (ácido nucleico) de virus que contiene la secuencia diana para la hibridación con la sonda de la invención es también baja. Para aumentar su concentración, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos antes de efectuar la etapa de hibridación [etapa a)].

Por tanto, en una realización particular, la invención proporciona un método para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, en donde dichos virus se seleccionan entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), metapneumovirus humano y combinaciones de los mismos, eventualmente presentes en una muestra de ensayo, que comprende:

- (i) poner en contacto ácido nucleico procedente de dicha muestra de ensayo con iniciadores que flanquean secuencias diana específicas de dichos virus causantes de infección respiratoria;
- (ii) someter la mezcla resultante de la etapa (i) a una reacción de amplificación enzimática para amplificar secuencias diana de dichos virus causantes de infección respiratoria eventualmente presentes en dicha muestra de ensayo;
- (iii) poner en contacto los productos de amplificación resultantes de la etapa (ii) con una plataforma de hibridación de la invención que comprende un soporte sólido y, al menos, una sonda de la invención, orientada o no, inmovilizada sobre dicho soporte sólido, en donde cada una de dichas sondas es sustancialmente complementaria a una secuencia diana específica de cada uno de dichos virus causantes de infección respiratoria eventualmente presente en la muestra de ensayo; y
- (iv) detectar la posible hibridación de dichas secuencias diana con dichas sondas.

La amplificación de una región de ácido nucleico que contiene la secuencia diana puede llevarse a cabo mediante prácticamente cualquier método de amplificación de secuencias diana, tal como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de banda [véase, en general, G. Walker *et al.*, (1992). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396; G. Walker *et al.*, (1992). Nucleic Acid Res. 20:1691-1696], la amplificación basada en la transcripción [D. Kwok *et al.*, (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177], la replicación de secuencia auto-sostenida (3SR) [J. Guatelli *et al.*, (1992). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878], el sistema de la replicasa QB [P. Lizardi *et al.*, (1988). BioTechnology 6:1197-1202], la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) [R. Lewis, (1992). Genetic Engineering News 12(9):1], la reacción de reparación en cadena (RCR) [R. Lewis, (1992). Genetic Engineering News 12(9):1] y la amplificación por la polimerasa del fago phi29 [L. Blanco *et al.*, (1989) J Biol Chem. 264:8935-8940]. Con carácter previo a la amplificación puede ser necesario llevar a cabo una reacción de transcripción reversa o retrotranscripción (RT) para obtener el cDNA, ya que la mayoría de los virus causantes de infección respiratoria en humanos poseen un genoma constituido por RNA.

Aunque la reacción de amplificación puede llevarse a cabo sin extraer los ácidos nucleicos contenidos en la muestra de ensayo, ventajosamente, se extraen dichos ácidos nucleicos presentes en la muestra antes de llevar a cabo la reacción de amplificación. Prácticamente cualquier método apropiado para extraer ácidos nucleicos puede ser utilizado; no obstante, en una realización preferida los ácidos nucleicos contenidos en la muestra de ensayo se extraen mediante el empleo de un protocolo de extracción de ácidos nucleicos en un solo paso. A partir de cualquiera de ellos se realiza una extracción del material genético de la muestra, tanto RNA como DNA, puesto que aunque prácticamente todos los virus respiratorios presentan un genoma de RNA, los adenovirus poseen un genoma de DNA. Se pueden emplear métodos comerciales como RNeasy (Qiagen) aunque también pueden utilizarse otros métodos, por ejemplo, métodos basados en la extracción con un tampón de lisis con base de tiocianato de guanidinio [Casas *et al.*, 1995, J Virol Methods 53:25-36].

En una realización particular, la amplificación de las regiones de los ácidos nucleicos virales que contienen las secuencias dianas (regiones destinadas a ser amplificadas, detectadas o analizadas), se lleva a cabo mediante RT-PCR múltiple. Para ello, se utilizarán los iniciadores apropiados que flanqueen la secuencia diana a amplificar.

Ejemplos ilustrativos de iniciadores útiles en la reacción de RT y en la PCR múltiple para amplificar la secuencia diana del genoma de virus influenza tipos A, B y C, virus respiratorio sincitial humano tipos A y B y adenovirus respiratorios se mencionan en Coiras y cols., 2003, Journal of Medical Virology 69:132-144.

Ejemplos ilustrativos de iniciadores útiles en la reacción de RT y en la PCR múltiple para amplificar la secuencia diana del genoma de virus parainfluenza humano tipos 1, 2, 3, 4A y 4B, coronavirus humanos tipos 229E y OC43, rinovirus y enterovirus se mencionan en Coiras y cols., 2004, Journal of Medical Virology 72(3):484-495.

Ejemplos ilustrativos de iniciadores útiles para amplificar la secuencia diana del genoma del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) se mencionan en Drosten y cols., 2003, N Engl Med 348(20):1967-1976.

5 Ejemplos ilustrativos de iniciadores útiles para amplificar la secuencia diana del genoma de metapneumovirus humanos se mencionan en Van Den Hoogen y cols., J Infect Dis. 2003 Nov 15; 188(10):1571-7.

Una RT-PCR múltiple para la detección y tipado simultáneo de los virus influenza tipos A, B y C, los virus respiratorio sincitial humano tipos A y B y una detección genérica de adenovirus humanos se describe en Coiras *et al.*, 10 2003, J Med Virol 69:132-144.

Las características de la muestra de ensayo y de la plataforma de hibridación de la invención ya han sido mencionadas previamente en relación con el método de la invención (general). Prácticamente cualquier sonda de la invención, cuya secuencia de nucleótidos sea complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia diana específica de cada uno de dichos virus causantes de infección respiratoria puede ser utilizada en la puesta en práctica del método de la invención ya que la hibridación de las sondas con las secuencias diana es indicativa de la presencia del virus correspondiente en la muestra analizada. Aunque la plataforma de hibridación puede contener una única sonda de la invención, en la práctica se prefiere que dicha plataforma de hibridación contenga dos o más sondas de la invención, preferentemente, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19 de las sondas de la invención cuyas 15 secuencias de nucleótidos se seleccionan entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19. Ventajosamente, la plataforma de hibridación de la invención comprende dichas 19 sondas de la invención (SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 19). Dichas sondas permiten la identificación de los 20 virus causantes de infecciones respiratorias en humanos previamente mencionados.

La detección de la hibridación entre las secuencias diana del genoma viral presente en los productos resultantes de la reacción de amplificación (amplicones) con las sondas de la invención puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos previamente mencionados en relación con la detección de la hibridación entre las secuencias diana del 30 genoma viral (sin amplificar) con las sondas de la invención. En una realización particular, la detección de la hibridación se realiza mediante un método radiactivo, mientras que, en otra realización particular, se realiza mediante un método no radiactivo, por ejemplo, mediante un método fluorescente, colorimétrico o luminiscente (bioluminiscente o quimioluminiscente). A modo ilustrativo, puede efectuarse un marcaje con fluoresceína o biotina para detección quimioluminiscente, o bien un marcaje con digoxigenina para detección quimioluminiscente o quimiofluorescente, etc. En este caso, el marcaje se puede realizar durante el proceso de amplificación o de manera posterior, por ejemplo 35 mediante el uso de la polimerasa Klenow en presencia de aminoalil-dUTP (Wang *et al.*, 2002, Proc Natl Acad Sci U S A. 99(24):15687-15692) o bien utilizando kits comerciales de marcaje como los kits CyScribe de Amersham Life Sciences.

40 En una realización particular, cuando el soporte sólido sobre el que se inmovilizan las sondas de la invención es una membrana de nylon, es conveniente marcar el material genético de la muestra durante el proceso de amplificación con biotina unida a un dNTP (ya sea dATP, dUTP, dCGP o dCTP), posterior tratamiento con estreptavidina-peroxidasa y revelado quimioluminiscente con luminol. En otra realización particular, cuando el soporte sólido al que están unidas las sondas es una superficie de cristal, se recomienda emplear un marcador fluorescente, tal como Cy3 o Cy5 45 (Amersham Life Sciences) unido a un dNTP (ya sea dATP, dUTP, dCGP o dCTP), lo que posibilita su posterior detección con un scanner.

Aunque los sistemas de detección pueden ser variados (métodos radiactivos o no radiactivos) se prefiere efectuar una detección quimioluminiscente cuando el soporte sea una membrana de nylon o un portaobjetos con una membrana adherida a su superficie (por ejemplo, Vivid™ Gene Array Slides, Pall Life Sciences). Para ello, como ya se ha comentado anteriormente, se añade a la reacción de PCR empleada para amplificar el material genético viral de partida uno de los nucleótidos marcado con biotina, por ejemplo dCTP (Perkin Elmer Life Sciences) o dUTP (Roche Diagnostics) para obtener productos de PCR marcados con biotina. Tras la reacción de hibridación entre las sondas fijadas al soporte y las cadenas desnaturalizadas del producto de PCR se añade estreptavidina-peroxidasa en una concentración 55 recomendada de 1:4000, que permitirá el revelado quimioluminiscente mediante el empleo de luminol en presencia de agua oxigenada (por ejemplo, ECL Detection System, Amersham Biosciences), según instrucciones del fabricante.

En el caso de utilizar un soporte de cristal funcionalizado con, por ejemplo, poli-L-lisina, se recomienda realizar el marcaje de las muestras utilizando un fluorocromo, por ejemplo los fluorocromos CyDye de Amersham Biosciences: 60 Cy3 o Cy5. Para realizar el marcaje con este fluorocromo existen kits comercializados por Amersham Biosciences para la obtención de cDNA o RNA marcados. No obstante, con estas sondas se han empleado los fluorocromos mencionados unidos a un nucleótido como dUTP o dCTP, realizando un marcaje del producto de PCR semejante al mencionado anteriormente para el caso del marcaje del producto de PCR con biotina. La lectura de los resultados se realiza utilizando un scanner apropiado.

65 Los límites de detección han sido muy similares en todos los soportes utilizados. La cuantificación de los límites de detección se ha realizado mediante plásmidos que contienen el fragmento resultado de la amplificación por PCR. El límite de detección ha sido de 10- 100 copias de plásmido en todos los casos.

El método de la invención presenta numerosas ventajas frente a otros métodos utilizados para la detección e identificación de virus, entre las que pueden citarse las siguientes:

- sensibilidad superior a la de las técnicas convencionales: aislamiento en cultivos celulares, inmunofluorescencia indirecta;
- especificidad elevada;
- escasa dependencia del tipo de muestra o de sus condiciones de conservación y transporte;
- escasa dependencia de contaminación bacteriana de la muestra;
- menor contaminación ambiental de amplicones que las técnicas de amplificación genómica (por lo que no es necesario tener dependencias separadas para los distintos pasos de la técnica);
- posibilidad de detectar e identificar (tipado) simultáneamente los principales virus causantes de infección respiratoria en humanos;
- fácil rutinización de la técnica;
- posibilidad de adaptación a distintos formatos en función de las necesidades del laboratorio (es decir, posibilidad de adaptar a distintos formatos para producir un kit diagnóstico comercializable); y
- además, al permitir la posibilidad de detectar co-infecciones causadas por dos o más virus distintos en la misma muestra e identificarlos, se pueden realizar estudios epidemiológicos precisos, lo que ayudaría a determinar la contribución de estas co- infecciones a la gravedad de la infección en el paciente, así como al pronóstico de la enfermedad.

Además, el empleo de sondas oligonucleotídicas para la detección e identificación de virus causantes de infecciones respiratorias en humanos, tales como las sondas de la invención, presenta ventajas adicionales sobre técnicas convencionales basadas en el aislamiento en cultivos celulares o IF, entre las que pueden citarse las siguientes: (i) respecto al aislamiento en cultivos celulares, las técnicas basadas en hibridación son más rápidas y sensibles (sobre todo en el caso de virus de crecimiento lento o con especiales requerimientos para ello); y (ii) respecto a las técnicas basadas en IF, son más específicas.

Kits

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante kit de la invención, para la identificación de un virus causante de infección respiratoria seleccionado entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y metapneumovirus humano, en una muestra biológica, mediante el método de la invención, que comprende, al menos, una sonda de la invención, opcionalmente inmovilizada sobre un soporte sólido (plataforma de hibridación de la invención). Ventajosamente, el kit de la invención comprende una plataforma de hibridación de la invención constituido por un soporte sólido en el que están inmovilizadas una o más sondas de la invención. En una realización particular, el kit de la invención comprende una plataforma de hibridación que comprende un soporte sólido sobre el que se han inmovilizado sondas de la invención seleccionadas del grupo formado por los polinucleótidos identificados como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y sus mezclas. Dichas sondas pueden estar dispuestas en disposiciones orientadas o no orientadas.

El kit de la invención incluye los reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención, así como instrucciones para ello. Adicionalmente puede contener, si se desea, iniciadores específicos para la amplificación de secuencias diana (en caso de que antes de la hibridación se proceda a realizar una reacción de amplificación) así como controles positivos y negativos.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Detección de cepas de referencia de patógenos virales causantes de infecciones respiratorias en muestras procedentes de cultivos celulares

La detección de cepas de referencia de patógenos virales causantes de infecciones respiratorias en muestras procedentes de cultivos celulares inoculados con dichas cepas virales, se llevó a cabo mediante un ensayo basado en la hibridación de fragmentos de material genético amplificados y marcados, con sondas inmovilizadas en membrana de nylon, siguiendo un protocolo adaptado a partir del previamente descrito por Kaufhold y cols. (Kaufhold y cols., 1994, *FEMS Microbiology Letters* 119:19-25).

1.1 Materiales

1.1.1 Muestras

Las muestras utilizadas para la realización de este ensayo fueron muestras procedentes de cepas de referencia de virus respiratorios causantes de infecciones respiratorias crecidas en cultivos celulares. Dichas cepas de referencia fueron suministradas por laboratorios de reconocido prestigio y están aceptadas como cepas de referencia por la comunidad científica internacional, según se enumeran a continuación:

<u>Virus</u>	<u>Cepa</u>
Virus influenza tipo A	A/Panama/2007/99
Virus influenza tipo B	B/Yamanashi/166/98
Virus influenza tipo C	C/Johannesburg/1/66
Virus respiratorio sincitial humano tipo A (RSVA)	Long
Virus respiratorio sincitial humano tipo B (RSVB)	RSN-2
Adenovirus humano	Serotipo 1 (ADV1)
Virus parainfluenza humano tipo 1 (PIV1)	C-35
Virus parainfluenza humano tipo 2 (PIV2)	Greer
Virus parainfluenza humano tipo 3 (PIV3)	C-243
Virus parainfluenza humano tipo 4B (PIV4B)	M-25
Coronavirus humano	229E
Coronavirus humano	OC43
Echovirus humano 30 (Echo30)	Bastianni
Rhinovirus 14 (Rhino14)	1059
Metapneumovirus humano	00

Las concentraciones de virus utilizadas fueron calculadas en cada caso: 100 TCID₅₀ en los virus influenza tipos A y B; una dilución 10⁻³ de una preparación de virus influenza tipo C con un título 2048 por inhibición de la hemaglutinación; una dilución 10⁻³ de RSVA y RSVB, equivalente a detectar una célula infectada por inmunofluorescencia indirecta; diluciones 10⁻³ de ADV1, virus parainfluenza humano tipos 1, 2, 3 y 4B, coronavirus humano 229E, coronavirus humano OC43, y metapneumovirus humano, todas ellas equivalentes a 10⁵ copias de plásmido; así como diluciones 10⁻⁴ de Echo30 y Rhino14, equivalentes a 0,1 TCID₅₀.

1.1.2 Sondas

Se han utilizado en cada caso sondas homólogas a la cadena molde de cada virus, así como a la cadena complementaria, independiente y/o conjuntamente, con el fin de comprobar el mejor resultado de sensibilidad. Las concentraciones de cada sonda son las anteriormente descritas. La localización de las sondas se especifica en cada caso (Figura 1). Las sondas utilizadas en este ensayo se indican en la Tabla 1.

TABLA 1

Sondas utilizadas

Sonda	Especificidad
SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y sus mezclas	Virus influenza tipo A
SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y sus mezclas	Virus influenza tipo B
SEQ ID NO: 5	Virus influenza tipo C
SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y sus mezclas	Virus respiratorio sincitial humano tipo A
SEQ ID NO: 8	Virus respiratorio sincitial humano tipo B
SEQ ID NO: 9	Adenovirus humano
SEQ ID NO: 10	Virus parainfluenza humano tipo 1
SEQ ID NO: 11	Virus parainfluenza humano tipo 2
SEQ ID NO: 12	Virus parainfluenza humano tipo 3
SEQ ID NO: 13	Virus parainfluenza humano tipo 4A y 4B
SEQ ID NO: 14	Enterovirus
SEQ ID NO: 15	Rhinovirus
SEQ ID NO: 16	Coronavirus humano 229E
SEQ ID NO: 17	Coronavirus humano OC43
SEQ ID NO: 19	Metapneumovirus humano

Dichas sondas poseen un grupo hexilamino en el extremo 5', según describieron Kaufhold y cols. (FEMS Microbiol. Lett. 1994 Jun 1;119(1-2):19-25). La presencia del grupo amino facilita la inmovilización de la sonda y permite orientar espacialmente la sonda sobre la membrana. Para su inmovilización sobre la membrana, las sondas se diluyeron en una solución recién preparada de NaHCO₃ 500 mM, pH 8,4, siguiendo un protocolo descrito previamente [Vinjé & Koopmans MPG. J Clin Microbiol 2000, 38:2595-2601]. En este caso, todas las sondas se utilizaron a una concentración de 0,8 µM.

1.1.3 Membrana

La membrana utilizada en este ensayo fue una membrana con superficie de carga negativa (Biodyne C, Pall Life Sciences) de un tamaño aproximado de 14,5 cm x 14,5 cm. Dicha membrana fue preparada siguiendo un protocolo descrito previamente [Vinjé & Koopmans citado *supra*]. Brevemente, antes de la unión de las sondas a la membrana, ésta se trató con una solución recién preparada de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) al 16% en agua, durante, al menos, 15 minutos, y, a continuación, se enjuagó con agua. La membrana así preparada se usó inmediatamente o bien se almacenó a 4°C en papel de filtro hasta su uso durante un máximo de 1 semana.

1.2 Métodos

1.2.1 Extracción de material genético

A partir de las muestras (apartado 1.1.1) se llevó a cabo la extracción del material genético, tanto RNA como DNA, mediante métodos convencionales. En este caso se empleó un método de extracción basado en el uso de tiocianato de guanidinio, descrito previamente por Casas y cols (Casas y cols., 1995, J Virol Methods 53:25-36).

1.2.2 Amplificación enzimática

El material genético extraído se sometió a una reacción de amplificación enzimática con el fin de amplificar fragmentos que contenían las secuencias homólogas a las sondas utilizadas (Tabla 1) para la detección de los distintos patógenos virales (virus influenza tipos A, B y C, RSVA, RSVB, ADV1, PIV1, PIV2, PIV3, PIV4, coronavirus, echovirus, rinovirus y metapneumovirus) inmovilizadas sobre una membrana de nylon.

Las reacciones de amplificación enzimática de los distintos fragmentos se llevaron a cabo utilizando los iniciadores descritos por Coiras y cols. (Coiras y cols., Journal of Medical Virology 69:132-144 (2003); y Coiras y cols., Journal of Medical Virology 72(3):484-495 (2004)). La amplificación se llevó a cabo en presencia de dATP, dGTP y dCTP 200 μ M, dTTP 130 μ M y biotina-16-dUTP 70 μ M, por reacción con el fin de marcar el material genético (productos de amplificación o amplicones) a hibridar.

1.2.3 Inmovilización de las sondas a la membrana de nylon

La inmovilización de las sondas utilizadas en este ensayo (Tabla 1) a la membrana de nylon se llevó a cabo siguiendo sustancialmente un protocolo descrito previamente [Vinjé J, Koopmans MPG. J Clin Microbiol 2000, 38:2595-2601].

Para su inmovilización sobre la membrana, las sondas se diluyeron en una solución recién preparada de NaHCO₃ 500 mM, pH 8,4, siguiendo el protocolo descrito previamente. Asimismo, antes de la unión de las sondas a la membrana de nylon, ésta se trató con una solución recién preparada de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) al 16% en agua, durante, al menos, 15 minutos, y, a continuación, se enjuagó con agua. La membrana así preparada se usó inmediatamente o bien se almacenó a 4°C en papel de filtro hasta su uso durante un máximo de 1 semana.

Las sondas sometidas al tratamiento previamente indicado se inmovilizaron sobre la membrana de nylon previamente preparada por métodos convencionales [Vinjé & Koopmans citado *supra*] basándose en el hecho de que el grupo amino presente en las sondas se une covalentemente a los grupos carboxilo activados procedentes del tratamiento de la membrana con EDAC. Para ello, brevemente, la membrana de nylon se introdujo en un miniblotter de 45 canales (Biometra). Los canales que no iban a contener sonda se rellenaron con una solución recién preparada de NaHCO₃ 500 mM, pH 8,4, mientras que los canales que iban a contener las sondas se rellenaron con diluciones de las sondas preparadas en el momento tal como se ha indicado previamente. Las sondas se incubaron en contacto con la membrana a temperatura ambiente (18-22°C) durante 10 minutos. A continuación, el líquido fue aspirado de los canales con una bomba de vacío. Los grupos ésteres que permanecían activados en la membrana se hidrolizaron mediante incubación a temperatura ambiente con una solución de NaOH 100 mM durante un periodo de tiempo no superior a 10 minutos. Finalmente, la membrana con las sondas se enjuagó con agua destilada ultrapura varias veces. La concentración de las sondas en la membrana de nylon era de, aproximadamente, 0,8-5 pmoles/ μ l (ó 120-750 pmoles por carril) en un volumen final de 150 μ l, que llenaba completamente el carril del miniblotter (Biometra). Las sondas se dispusieron sobre la membrana siguiendo siempre el mismo orden en los carriles. El análisis de los resultados se hizo mediante una plantilla que permitía identificar rápidamente los virus que habían sido detectados en la(s) muestra(s).

1.2.4 Hibridación del material genético, amplificado y marcado con las sondas inmovilizadas en la membrana de nylon

Antes de proceder a hibridar el material genético (producto de amplificación) marcado, la membrana con las sondas se sometió a un tratamiento de prehibridación. Para ello, la membrana con las sondas se lavó con una solución de SSPE 2X (NaCl 360 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,2) en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% durante 10 minutos a 56°C.

Para la hibridación del material genético con las sondas inmovilizadas, la membrana con las sondas se colocó en un miniblotter girada 90° con respecto a la posición anterior. Diez microlitros del material genético marcado se diluyeron en 150 μ l de tampón de hibridación (SSPE 2x, 0,5% SDS). Dado que el producto a hibridar es DNA de doble cadena, se sometió durante 10 minutos a un calentamiento a 99°C y posteriormente se enfrió rápidamente durante 1 minuto a 4°C. Después de mantener a temperatura ambiente durante 1 minuto se procedió a efectuar la hibridación. El proceso de hibridación se llevó a cabo durante 2 horas aproximadamente, a 48°C aproximadamente, con agitación suave.

A continuación, la membrana se lavó a través de los colectores de filtración o "manifolds" (Biometra) con 150 ml de una solución de SSPE 2x con 0,5% de SDS (dodecilsulfato sódico). La membrana se sacó del miniblotter y se lavó dos veces más con 50 ml de la solución anterior, en agitación, durante 10 minutos cada vez, a 40°C.

1.2.5 Detección e identificación de los patógenos virales

La membrana de nylon con las sondas y los productos de amplificación marcados, que eventualmente habían hibridado con las sondas, se incubó con estreptavidina-peroxidasa (1:4000), durante un periodo de tiempo de 45 minutos, a 37°C. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno utilizando en los dos primeros solución de SSPE2x 0,5% SDS y SSPE2x 0,1% SDS, respectivamente, a 37°C y con agitación, y el tercero con una solución de SSPE2x sólo, a temperatura ambiente, con agitación. Finalmente se procedió a efectuar el revelado quimioluminiscente con luminol en presencia de agua oxigenada utilizando un kit comercial (ECL Detection System, Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La visualización de los resultados se realizó mediante impresión de películas de rayos X (Kodak) durante 5 minutos, 30 minutos y 4 horas.

1.3 Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1 y ponen de manifiesto la especificidad y sensibilidad de la técnica ensayada que permite identificar simultáneamente las cepas prototipo de diferentes patógenos virales causantes de infecciones respiratorias. Cada producto de amplificación marcado con biotina interacciona de manera específica solamente con su sonda complementaria, y, en ningún caso, se observan hibridaciones inespecíficas, a pesar de que la cantidad de molde utilizado para la reacción de amplificación era elevado. Mediante la aplicación de una plantilla sobre la película impresionada es posible identificar rápida y claramente el(los) virus que ha(n) sido detectado(s) por la técnica.

Ejemplo 2

Detección de virus respiratorios aislados de muestras clínicas del tracto respiratorio inoculadas en cultivos celulares

La detección de diversos virus respiratorios causantes de infecciones respiratorias en muestras procedentes de cultivos celulares se llevó a cabo mediante un ensayo basado en la hibridación a las sondas inmovilizadas en una membrana de nylon, de los fragmentos de material genético amplificados y marcados con biotina.

2.1 Materiales

2.1.1 Muestras

Las muestras utilizadas para la realización de este ensayo fueron muestras procedentes de los virus respiratorios causantes de infecciones respiratorias, aislados de muestras clínicas del tracto respiratorio inoculadas en cultivos celulares. Dichos virus fueron los siguientes: virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus respiratorio sincitial humano tipo A (RSVA), virus respiratorio sincitial humano tipo B (RSVB), adenovirus humano (ADV) (varios serotipos) y virus parainfluenza humano tipo 3 (PIV3).

Con el fin de comprobar la sensibilidad de la técnica se emplearon diluciones seriadas en base diez, de virus aislados en cultivos celulares a partir de muestras respiratorias de pacientes. Las diluciones empleadas para cada virus fueron las siguientes: las diluciones iniciales, marcadas como -1 (Figura 2), fueron de 100 TCID₅₀ en los virus influenza tipos A (carriles 1-4) y B (carriles 5-8), una dilución 10⁻³ de RSVA (carriles 9-12) y RSVB (carriles 13-16), ADV (carriles 17-20), equivalentes a detectar una célula infectada por inmunofluorescencia indirecta, y una dilución 10⁻³ de virus parainfluenza humano tipo 3 (carriles 21-24), equivalente a detectar 10⁵ copias de un plásmido que contiene el fragmento amplificado por la RT-PCR.

2.1.2 Sondas

Se han utilizado en cada caso sondas homólogas a la cadena molde de cada virus, así como a la cadena complementaria, independiente y/o conjuntamente, con el fin de comprobar el mejor resultado de sensibilidad. Las sondas utilizadas en este ensayo se indican en la Tabla 2.

TABLA 2

Sondas utilizadas

Sonda	Especificidad
SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2	Virus influenza tipo A
SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4	Virus influenza tipo B
SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7	Virus respiratorio sincitial humano tipo A
SEQ ID NO: 8	Virus respiratorio sincitial humano tipo B
SEQ ID NO: 9	Adenovirus humano
SEQ ID NO: 12	Virus parainfluenza humano tipo 3

Las sondas diseñadas para la detección de los virus influenza tipos A y B y RSVA se utilizaron conjunta o separadamente, a una concentración final de 0,8 µM. Las demás sondas se utilizaron a concentraciones de 5, 1 y 0,8 µM con objeto de observar la diferente sensibilidad en función de la variación de la concentración.

ES 2 303 395 B1

Dichas sondas poseen un grupo hexilamino en el extremo 5', según describieron Kaufhold y cols. (FEMS Microbiol Lett. 1994 Jun 1; 119(1-2):19-25). La presencia del grupo amino facilita la inmovilización de la sonda y permite orientar espacialmente la sonda sobre la membrana. Para su inmovilización sobre la membrana, las sondas se diluyeron en una solución recién preparada de NaHCO₃ 500 mM, pH 8,4, siguiendo un protocolo descrito previamente [Vinjé Jy Koopmans MPG.. J Clin Microbiol 2000, 38:2595-2601].

2.1.3 Membrana

La membrana utilizada en este ensayo fue una membrana con superficie de carga negativa (Biodyne C, Pall Life Sciences), de un tamaño aproximado de 14,5 cm x 14,5 cm. Dicha membrana fue preparada siguiendo un protocolo descrito previamente [Vinjé & Koopmans citado *supra*]. Brevemente, antes de la unión de las sondas a la membrana, ésta se trató con una solución recién preparada de EDAC al 16% en agua, durante, al menos, 15 minutos, y, a continuación, se enjuagó con agua. La membrana así preparada se usó inmediatamente o bien se almacenó a 4°C en papel de filtro hasta su uso durante un máximo de 1 semana.

2.2 Métodos

2.2.1 Extracción de material genético

A partir de las muestras (apartado 2.1.1.) se llevó a cabo la extracción del material genético, tanto RNA como DNA, mediante métodos convencionales. En este caso se empleó un método de extracción basado en el uso de tiocianato de guanidinio, descrito previamente por Casas y cols (J Virol Methods, 1995, 53:25-36).

2.2.2 Amplificación enzimática

El material genético extraído se sometió a una reacción de amplificación enzimática con el fin de amplificar fragmentos que contenían las secuencias homólogas a las sondas utilizadas (Tabla 2) para la detección de los distintos patógenos virales (virus influenza tipos A y B, RSVA, RSVB, ADV y virus parainfluenza humano tipo 3), inmovilizadas sobre una membrana de nylon.

Las reacciones de amplificación enzimática de los distintos fragmentos específicos de los patógenos virales virus influenza tipos A y B, RSVA, RSVB, ADV y virus parainfluenza humano tipo 3 se llevaron a cabo utilizando los iniciadores descritos por Coiras y cols. (Coiras y cols., Journal of Medical Virology 69:132-144 (2003); y Coiras y cols., Journal of Medical Virology 72(3):484-495 (2004)). En todos los casos, la amplificación se llevó a cabo en presencia de dATP, dGTP, y dCTP 200 µM, dTTP 130 µM y biotina-16-dUTP 70 µM, por reacción con el fin de marcar el material genético (productos de amplificación o amplicones) a hibridar.

2.2.3 Inmovilización de las sondas a la membrana de nylon

La inmovilización de las sondas utilizadas en este ensayo (Tabla 2) a la membrana de nylon se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.3.

2.2.4 Hibridación del material genético amplificado con las sondas inmovilizadas en la membrana de nylon

La hibridación del material genético amplificado con las sondas inmovilizadas en la membrana de nylon se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.4.

2.2.5 Detección e identificación de los patógenos virales

La detección e identificación de los patógenos virales se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.5.

2.3 Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2 y ponen de manifiesto la especificidad y sensibilidad de la técnica ensayada que permite identificar diferentes patógenos virales causantes de infecciones respiratorias, aislados de muestras clínicas del tracto respiratorio inoculadas en cultivos celulares. Se aprecia la variación en la sensibilidad de la detección en función de la dilución del virus y de la distinta concentración de la sonda utilizada, así como de si las sondas para la detección de virus influenza tipos A y B y del RSV tipo A se utilizan juntas o por separado. La especificidad es, en todos los casos, muy elevada.

Ejemplo 3

Detección de virus influenza tipo A presente en muestras clínicas

- 5 La detección directa de virus influenza tipo A presente en la muestra clínica ensayada se llevó a cabo mediante un ensayo basado en la hibridación de fragmentos de material genético amplificados y marcados con sondas inmovilizadas en membrana de nylon.

10 3.1 *Materiales*3.1.1 *Muestras*

- 15 Las muestras utilizadas para la realización de este ensayo fueron frotis faringeos tomados a pacientes que presentaban síntomas indicativos de cuadro gripal, con objeto de intentar identificar el virus productor de dicho cuadro clínico.

20 3.1.2 *Sondas*

- Las sondas utilizadas en este ensayo (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) se diseñaron con un grupo hexilamino en el extremo 5', según describieron Kaufhold y cols. (FEMS Microbiol Lett. 1994 Jun 1;119(1-2):19-25). La presencia del grupo amino facilita la inmovilización de la sonda y permite orientar espacialmente la sonda sobre la membrana. Para su inmovilización sobre la membrana, las sondas se diluyeron en una solución recién preparada de NaHCO₃ 500 mM, pH 8,4, siguiendo un protocolo descrito previamente [Vinjé Jy Koopmans MPG.. J Clin Microbiol 2000, 38:2595-2601]. En este caso, todas las sondas se utilizaron a una concentración de 0,8 µM.

30 3.1.3 *Membrana*

- La membrana utilizada en este ensayo fue una membrana con superficie de carga negativa (Biodyne C, Pall Life Sciences) de un tamaño aproximado de 14,5 cm x 14,5 cm. Dicha membrana fue preparada siguiendo un protocolo descrito previamente [Vinjé & Koopmans citado *supra*]. Brevemente, antes de la unión de las sondas a la membrana, ésta se trató con una solución recién preparada de EDAC al 16% en agua, durante, al menos, 15 minutos, y, a continuación, se enjuagó con agua. La membrana así preparada se usó inmediatamente o bien se almacenó a 4°C en papel de filtro hasta su uso durante un máximo de 1 semana.

40 3.2 *Métodos*3.2.1 *Extracción de material genético*

- A partir de las muestras (apartado 3.1.1) se llevó a cabo la extracción del material genético, tanto RNA como DNA, mediante métodos convencionales. En este caso se empleó un método de extracción basado en el uso de tiocianato de guanidinio, descrito previamente por Casas y cols. (Casas y cols., 1995, J Virol Methods 53:25-36).

3.2.2 *Amplificación enzimática*

- 50 El material genético extraído se sometió a una reacción de amplificación enzimática con el fin de amplificar fragmentos que contenían las secuencias homólogas a las sondas utilizadas (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) para la detección del patógeno viral (virus influenza tipo A) fijadas a una membrana de nylon. La reacción de amplificación enzimática (RT-PCR) de los distintos fragmentos se llevó a cabo utilizando los iniciadores y las condiciones descritos por Coiras y cols. (Coiras y cols., Journal of Medical Virology 69:132-144 (2003)). En todos los casos, la amplificación se llevó a cabo en presencia de dATP, dGTP, y dCTP 200 µM, dTTP 130 µM y biotina-16-dUTP 70 µM por reacción, con el fin de marcar el material genético (productos de amplificación o amplicones) a hibridar.

60 3.2.3 *Inmovilización de las sondas a la membrana de nylon*

La inmovilización de las sondas utilizadas en este ensayo (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) a la membrana de nylon se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.3.

- 65 3.2.4 *Hibridación del material genético amplificado con las sondas inmovilizadas en la membrana de nylon*

La hibridación del material genético amplificado con las sondas inmovilizadas en la membrana de nylon se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.4.

3.2.5 Detección e identificación del patógeno viral

La detección e identificación del patógeno viral se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.5.

3.2.6 PCR anidada

Con el fin de comprobar la sensibilidad de la técnica utilizada previamente basada en la hibridación de productos amplificados y marcados, con sondas inmovilizadas en una membrana de nylon, se procedió a realizar una PCR anidada siguiendo una metodología descrita previamente (Coiras y cols., Journal of Medical Virology, 2003, 69:132-144). Los iniciadores utilizados tanto para la amplificación de los fragmentos que contenían secuencias homólogas a las sondas, como los utilizados para realizar la PCR anidada, así como las condiciones de realización de la PCR anidada se describen en dicha publicación (Coiras y cols., 2003, citado *supra*).

3.3 Resultados

En la Figura 3A se observan los resultados de la hibridación del material genético procedente de los virus de la muestra clínica, con las sondas inmovilizadas en la membrana (Carriles 1-12). No se detectó virus influenza A en las muestras 2, 7 y 8. Estos resultados ponen de manifiesto la especificidad y sensibilidad de la técnica ensayada que permite identificar el virus influenza tipo A en muestras clínicas.

Con objeto de analizar esta sensibilidad y especificidad utilizando una técnica referenciada, se realizó simultáneamente al proceso de hibridación una PCR anidada, cuyos resultados se muestran en la Figura 3B, donde los carriles 1-12 corresponden a los carriles 1-12 observados en la Figura 3A. El carril M de la Figura 3B corresponde con el marcador XIV de pesos moleculares, suministrado por Roche Diagnostics (marcador de 100 pb). En todos los carriles (excepto 2, 7 y 8) se observa una banda de 721 pares de bases (pb), correspondiente al fragmento amplificado del gen de la nucleoproteína del virus influenza tipo A, y una banda de 837 pb, correspondiente al control interno utilizado como control del proceso de extracción del material genético a partir de la muestra, así como de la reacción de PCR (el plásmido del control interno y los iniciadores para su amplificación se describen en Coiras y cols., (2003) citado *supra*, donde se describen asimismo los iniciadores y las condiciones para realizar la PCR anidada).

Ejemplo 4

Detección del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS)

La detección del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) se llevó a cabo mediante un ensayo basado en la hibridación de fragmentos de material genético amplificados y marcados, con sondas inmovilizadas en membrana de nylon.

4.1 Materiales

4.1.1 Muestras

Las muestras utilizadas para la realización de este ensayo fueron material genético procedente de virus inactivado y de un plásmido que incluye un fragmento de la polimerasa de coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), amablemente cedidos por el Dr. Christian Drosten (Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, National Reference Center for Tropical Infectious Diseases, Hamburgo, Alemania). Se han empleado diluciones seriadas del virus inactivado a partir de la dilución 10^{-3} , equivalentes a diluciones seriadas realizadas a partir de una dilución 10^5 de plásmido que incluye el fragmento del gen de la polimerasa amplificado a partir del genoma del CoV-SARS.

4.1.2 Sondas

La sonda utilizada en este ensayo (SEQ ID NO: 18) se diseñó con un grupo hexilamino en el extremo 5', según describieron Kaufhold y cols. (FEMS Microbiol Lett. 1994 Jun 1; 119(1-2):19-25). La presencia del grupo amino facilita la inmovilización de la sonda y permite orientar espacialmente la sonda sobre la membrana. Se ensayaron dos concentraciones de dicha sonda (0,8 gM y 5 μ M) tal como se recoge en la Figura 4. Para su inmovilización sobre la membrana, las sondas se diluyeron en una solución recién preparada de NaHCO_3 500 mM, pH 8,4, siguiendo un protocolo descrito previamente [Vinjé Jy Koopmans MPG. J Clin Microbiol 2000, 38:2595-2601].

4.1.3 Membrana

La membrana utilizada en este ensayo fue una membrana con superficie de carga negativa (Biodyne C, Pall Life Sciences) de un tamaño aproximado de 14,5 cm x 14,5 cm. Dicha membrana fue preparada siguiendo un protocolo descrito previamente [Vinjé & Koopmans citado *supra*]. Brevemente, antes de la unión de las sondas a la membrana, ésta se trató con una solución recién preparada de EDAC al 16% en agua, durante, al menos, 15 minutos, y, a continuación, se enjuagó con agua. La membrana así preparada se usó inmediatamente o bien se almacenó a 4°C en papel de filtro hasta su uso durante un máximo de 1 semana.

4.2 Métodos

4.2.1 Extracción de material genético

A partir de las muestras (apartado 4.1.1) se llevó a cabo la extracción del material genético, tanto RNA como DNA, mediante métodos convencionales. En este caso se empleó un método de extracción basado en el uso de tiocianato de guanidinio, descrito previamente por Casas y cols (1995, J Virol Methods 53:25-36).

4.2.2 Amplificación enzimática

El material genético extraído se sometió a una reacción de amplificación enzimática con el fin de amplificar fragmentos que contenían las secuencias homólogas a las sondas utilizadas (SEQ ID NO: 18) para la detección del patógeno viral (coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS)) fijadas a una membrana de nylon. La reacción de amplificación enzimática de los distintos fragmentos se llevó a cabo utilizando los iniciadores y las condiciones descritas por Drosten C y cols. (Drosten C y cols., 2003, N Engl J Med. May 15;348(20):1967-76). La amplificación se llevó a cabo en presencia de dATP, dGTP, y dCTP 200 µM, dTTP 130 µM y biotina-16-dUTP 70 µM, por reacción con el fin de marcar el material genético (productos de amplificación o amplicones) a hibridar.

4.2.3 Inmovilización de las sondas a la membrana de nylon

La inmovilización de la sonda utilizada en este ensayo (SEQ ID NO: 18) a la membrana de nylon se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.3.

4.2.4 Hibridación del material genético amplificado con las sondas inmovilizadas en la membrana de nylon

La hibridación del material genético amplificado con la sonda inmovilizada en la membrana de nylon se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.4.

4.2.5 Detección e identificación del patógeno viral

La detección e identificación del patógeno viral se llevó a cabo de forma sustancialmente idéntica a como se menciona en el Ejemplo 1.2.5.

4.3 Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4 y ponen de manifiesto la validez de la sonda utilizada para la detección del material genético procedente del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y la sensibilidad del ensayo.

Ejemplo 5

Detección de adenovirus humano presente en muestras clínicas

La detección genérica de adenovirus humanos presentes en muestras clínicas se llevó a cabo mediante un ensayo basado en la hibridación de fragmentos de material genético amplificados y marcados, con sondas inmovilizadas, no orientadas, en portaobjetos de cristal.

5.1 Materiales

5.1.1 Muestras

5 Las muestras utilizadas para la realización de este ensayo fueron secreciones respiratorias procedentes de pacientes con cuadros respiratorios. El material genético se extrajo directamente de las muestras clínicas y se analizó el posible virus presente en las mismas mediante dos RT-PCR múltiples seguidas de PCRs anidadas descritas previamente por Coiras y cols. (Coiras y cols., Journal of Medical Virology, 2003, 69:132-144; y Coiras y cols., Journal of Medical Virology, 2004, 72(3):484-495). Una vez conocida la presencia de adenovirus humanos en dichas muestras clínicas, el mismo material genético fue utilizado para ser hibridado con la sonda SEQ ID NO: 9, diseñada para poder hibridarse a cualquier adenovirus de origen humano, independientemente de su serotipo.

5.1.2 Sondas

15 La sonda utilizada en este ensayo (SEQ ID NO: 9) se inmovilizó directamente sobre una superficie de cristal (portaobjetos), en disposición no orientada en el espacio, a una concentración de 20 μ M. Las sondas se preparan a la concentración recomendada en un volumen aproximado de 40 μ l diluidas en SSC 3x, dispuestas en pocillos de una placa de 96, preferiblemente de fondo en U o en V para facilitar el acceso de las agujas de impresión.

20 A diferencia del método de hibridación en membrana de nylon, estas sondas no presentan modificaciones en el extremo 5'.

5.1.3 Soporte de cristal

25 Se han empleado portaobjetos comunes a los que se somete a un tratamiento con poli-L-lisina con objeto de disponer sobre la superficie de cristal grupos amino que se van a unir covalentemente a los grupos fosfato de las sondas. Las sondas no quedan orientadas espacialmente sobre la superficie del portaobjetos funcionalizado con poli-L-lisina, sino que quedan adheridas a ella en toda su longitud. Este tratamiento fue descrito por (Schena y cols., 1995, Science 270(5235):467-470.).

5.2 Métodos

5.2.1 Extracción de material genético

35 A partir de las muestras (apartado 5.1.1) se llevó a cabo la extracción del material genético, tanto RNA como DNA, mediante métodos convencionales. En este caso se empleó un método de extracción basado en el uso de tiocianato de guanidinio, descrito previamente por Casas y cols. (J Virol Methods, 1995, 53:25-36).

5.2.2 Amplificación enzimática

45 El material genético extraído se sometió a una reacción de amplificación enzimática con el fin de amplificar fragmentos de la secuencia del gen de la proteína del hexón, homólogas a la sonda utilizada (SEQ ID NO: 9) para la detección de adenovirus, fijada a una membrana de nylon. La reacción de amplificación enzimática se llevó a cabo utilizando los iniciadores y las condiciones descritas en Coiras y cols. (Journal of Medical Virology, 2003, 69:132-144). La amplificación se llevó a cabo en presencia de dATP, dGTP, y dTTP 200 μ M, dCTP 180 μ M y Cy3-dCTP 20 μ M por reacción, con el fin de marcar el material genético (productos de amplificación o amplicones) a hibridar.

5.2.3 Inmovilización de las sondas al soporte de cristal

55 La inmovilización de la sonda utilizada en este ensayo (SEQ ID NO: 9) a la superficie de cristal se realizó disponiendo dicha sonda por triplicado sobre el portaobjetos mediante un sistema de Pin&Ring con un Arrayer GMS 417 (Affymetrix Inc.). Los grupos amino que han quedado libres en la superficie del portaobjetos funcionalizado e impreso, se bloquean con anhídrido succínico disuelto, en un disolvente polar (n-metil-pirrolidinona), según describen Eisen y Brown, 1999, Methods Enzymol 303:179-205. A continuación los portaobjetos se sumergen en agua a 90°C durante 2 minutos y luego en etanol absoluto momentáneamente con objeto de facilitar su secado, que se completa mediante centrifugación a temperatura ambiente. Una vez bloqueados, los portaobjetos se almacenan en desecador, protegidos de la luz, a temperatura ambiente, al menos 24 horas antes de realizar la hibridación con las muestras.

65

5.2.4 Hibridación del material genético amplificado con las sondas inmovilizadas en el soporte de cristal

La hibridación del material genético amplificado y marcado, con la sonda inmovilizada en el soporte de cristal, se llevó a cabo mediante el protocolo siguiente. Brevemente, 10 μ l del material genético marcado se diluyeron en 15-20 μ l de tampón de hibridación (SSC 2x, 0,2% SDS), se calentaron a 95°C durante 10 minutos y posteriormente se enfriaron rápidamente 1 minuto a 4°C. La muestra se depositó sobre la región del portaobjetos donde estaban impresas las sondas y se tapó con un cubreobjetos. A continuación se introdujo en una cámara de hibridación donde se mantuvo en condiciones de humedad y saturación de sales, y la hibridación se realizó durante 2 horas a 42°C en agitación suave.

5.2.5 Detección e identificación del patógeno viral

La detección e identificación del patógeno viral se llevó a cabo después de realizar lavados de los portaobjetos con SSC 1x-SDS 0,2%, SSC 0,1x-SDS 0,2%, y por último con SSC 0,1x, durante 10 minutos cada uno, en agitación, a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Después de secarlos en una centrifuga de portaobjetos se procedió a la lectura inmediata de los resultados.

5.3 Resultados

La lectura de los resultados se realizó utilizando un Scanner GMS 418 (Affymetrix Inc.). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5 y ponen de manifiesto la validez de la sonda utilizada para la detección del material genético procedente de muestras clínicas infectadas con cualquier adenovirus de origen humano. En la Figura 5 se observa la fluorescencia emitida por las moléculas de Cy3 presentes en el producto de amplificación obtenido mediante los oligonucleótidos iniciadores específicos para adenovirus humano. Se han utilizado para la amplificación y el marcaje mediante PCR (condiciones y oligonucleótidos en Coiras y cols., Journal of Medical Virology 69:132-144 (2003)), diluciones de adenovirus humanos causantes de infección respiratoria y pertenecientes a los serotipos 1 (imagen 1), 2 (imagen 2), 4 (imagen 3), 5 (imagen 4) y 7 (imagen 5), equivalentes estas diluciones a 10^3 copias de un plásmido que contiene el fragmento del gen de la proteína del hexón amplificado en las condiciones descritas.

REIVINDICACIONES

1. Una plataforma de hibridación para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos seleccionados entre el virus influenza tipo A, el virus influenza tipo B, el virus influenza tipo C, el virus respiratorio sincitial humano tipo A (RSVA), el virus respiratorio sincitial humano tipo B (RSVB), adenovirus humano, el virus parainfluenza humano tipo 1 (PIV1), el virus parainfluenza humano tipo 2 (PIV2), el virus parainfluenza humano tipo 3 (PIV3), los virus parainfluenza humano tipo 4A y 4B (PIV4A/4B), enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante de SARS y metapneumovirus humano eventualmente presentes en una muestra de ensayo que comprende un soporte sólido, **caracterizada** por un conjunto de sondas inmovilizadas sobre dicho soporte sólido, constituido por las secuencias SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18 y SEQ ID No 19.

2. Plataforma de hibridación según la reivindicación 1, en la que dichas sondas están inmovilizadas sobre dicho soporte sólido en una disposición orientada.

3. Plataforma de hibridación según la reivindicación 1, en la que dichas sondas están inmovilizadas sobre dicha soporte sólido en una disposición no orientada.

4. Un método para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos seleccionados entre el virus influenza tipo A, el virus influenza tipo B, el virus influenza tipo C, el virus respiratorio sincitial humano tipo A (RSVA), el virus respiratorio sincitial humano tipo B (RSVB), adenovirus humano, el virus parainfluenza humano tipo 1 (PIV1), el virus parainfluenza humano tipo 2 (PIV2), el virus parainfluenza humano tipo 3 (PIV3), los virus parainfluenza humano tipo 4A y 4B (PIV4A/4B), enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante de SARS y metapneumovirus humano eventualmente presentes en una muestra de ensayo **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

- a) Poner en contacto ácidos nucleicos diana procedentes de dicha muestra de ensayo con una plataforma de hibridación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- b) Detectar la posible hibridación de dichas secuencias diana con las sondas constitutivas de dicha plataforma de hibridación.

5. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con una sonda seleccionada entre las secuencias SEQ ID No 1 y/o SEQ ID No 2 identifica la presencia del virus influenza tipo A.

6. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con una sonda seleccionada entre las secuencias SEQ ID No 3 y/o SEQ ID No 4 identifica la presencia del virus influenza tipo B.

7. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 5 identifica la presencia del virus influenza tipo C.

8. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con una sonda seleccionada entre las secuencias SEQ ID No 6 y/o SEQ ID No 7 identifica la presencia del virus respiratorio sincitial humano tipo A (RSVA).

9. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 8 identifica la presencia del virus respiratorio sincitial humano tipo B (RSVB).

10. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 9 identifica la presencia del adenovirus humano.

11. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 10 identifica la presencia del virus parainfluenza humano tipo 1 (PIV1).

12. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 11 identifica la presencia del virus parainfluenza humano tipo 2 (PIV2).

13. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 12 identifica la presencia del virus parainfluenza humano tipo 3 (PIV3).

14. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 13 identifica la presencia de los virus parainfluenza humano tipo 4A y 4B (PIV4A/4B).

15. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 14 identifica la presencia de enterovirus.

16. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 15 identifica la presencia del rinovirus.

17. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 16 identifica la presencia del coronavirus humano tipo 229E.

18. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 17 identifica la presencia del coronavirus humano tipo OC43.

19. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 18 identifica la presencia del coronavirus causante de SARS.

20. Un método según la reivindicación 4 **caracterizado** porque la hibridación de una secuencia diana de una muestra de ensayo con la sonda correspondiente a la secuencia SEQ ID No 19 identifica la presencia del metapneumovirus humano.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra sospechosa de contener uno o más virus causantes de infección respiratoria en humanos seleccionados entre virus influenza tipo A, virus influenza tipo B, virus influenza tipo C, virus respiratorio sincitial humano tipo A, virus respiratorio sincitial humano tipo B, adenovirus humano, virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipo 2, virus parainfluenza humano tipo 3, virus parainfluenza humano tipos 4 A y 4 B, enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), metapneumovirus humano y sus mezclas.

22. Método según la reivindicación 21, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra biológica de origen humano o una muestra procedente de un cultivo celular de virus.

23. Método según la reivindicación 22, en el que dicha muestra biológica de origen humano es una muestra de un fluido biológico o una muestra de un tejido biológico.

24. Método según la reivindicación 23, en el que dicha muestra biológica de origen humano se selecciona entre sangre, esputo, gargarismo, frotis faríngeo, frotis nasofaríngeo y aspirado nasofaríngeo, bronquial, traqueal o pleural.

25. Método según la cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que dicho soporte sólido es una membrana de nylon o una superficie de vidrio o cristal.

26. Método según la cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que dichas sondas están dispuestas sobre el soporte sólido en una disposición orientada.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que dichas sondas están dispuestas sobre el soporte sólido en una disposición no orientada.

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que dichas sondas están dispuestas sobre el soporte sólido constituyendo un array.

29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que dicho soporte sólido es un biochip en el que las sondas inmovilizadas están dispuestas en una disposición orientada constituyendo un array.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que la detección de la hibridación [etapa b)] se realiza mediante un método radiactivo.

31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que la detección de la hibridación [etapa b)] se realiza mediante un método no radiactivo.

32. Método según la reivindicación 31, en el que dicho método no radiactivo es un método fluorescente, colorimétrico, luminiscente, bioluminiscente o quimioluminiscente.

33. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en el que, antes de realizar la etapa a), se lleva a cabo una reacción de amplificación de los ácidos nucleicos de dichos virus causantes de infección respiratoria en humanos eventualmente presentes en la muestra de ensayo, utilizando iniciadores que flanquean secuencias diana específicas de cada uno de dichos virus causantes de infección respiratoria.

34. Método según la reivindicación 33, en el que dicha reacción de amplificación comprende una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex o una reacción de transcripción inversa (RT) - PCR multiplex.

35. Un Kit para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos seleccionados entre el virus influenza tipo A, el virus influenza tipo B, el virus influenza tipo C, el virus respiratorio sincitial humano tipo A (RSVA), el virus respiratorio sincitial humano tipo B (RSVB), adenovirus humano, el virus parainfluenza humano tipo 1 (PIV1), el virus parainfluenza humano tipo 2 (PIV2), el virus parainfluenza humano tipo 3 (PIV3), los virus parainfluenza humano tipo 4A y 4B (PIV4A/4B), enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante de SARS y metapneumovirus humano eventualmente presentes en una muestra de ensayo **caracterizado** porque comprende una plataforma de hibridación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

36. Un Kit según la reivindicación 35 **caracterizado** porque comprende un conjunto de sondas constituido por las secuencias SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18 y SEQ ID No 19.

37. Una sonda para identificar virus causantes de infecciones respiratorias en humanos seleccionados entre el virus influenza tipo A, el virus influenza tipo B, el virus influenza tipo C, el virus respiratorio sincitial humano tipo A (RSVA), el virus respiratorio sincitial humano tipo B (RSVB), adenovirus humano, el virus parainfluenza humano tipo 1 (PIV1), el virus parainfluenza humano tipo 2 (PIV2), el virus parainfluenza humano tipo 3 (PIV3), los virus parainfluenza humano tipo 4A y 4B (PIV4A/4B), enterovirus, rinovirus, coronavirus humano tipo 229E, coronavirus humano tipo OC43, coronavirus causante de SARS y metapneumovirus humano eventualmente presentes en una muestra de ensayo **caracterizada** porque tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18 y SEQ ID No 19.

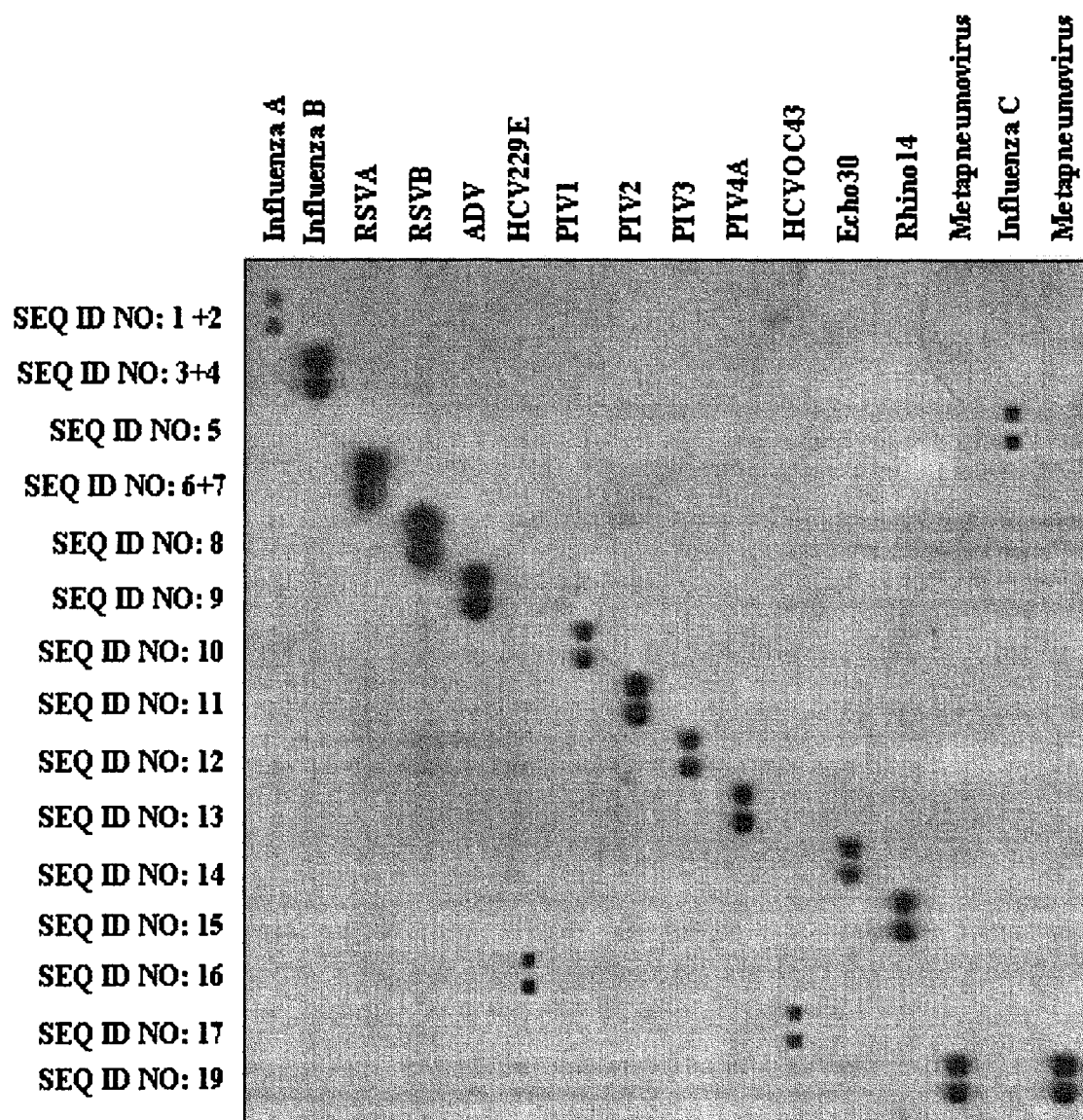


Figura 1

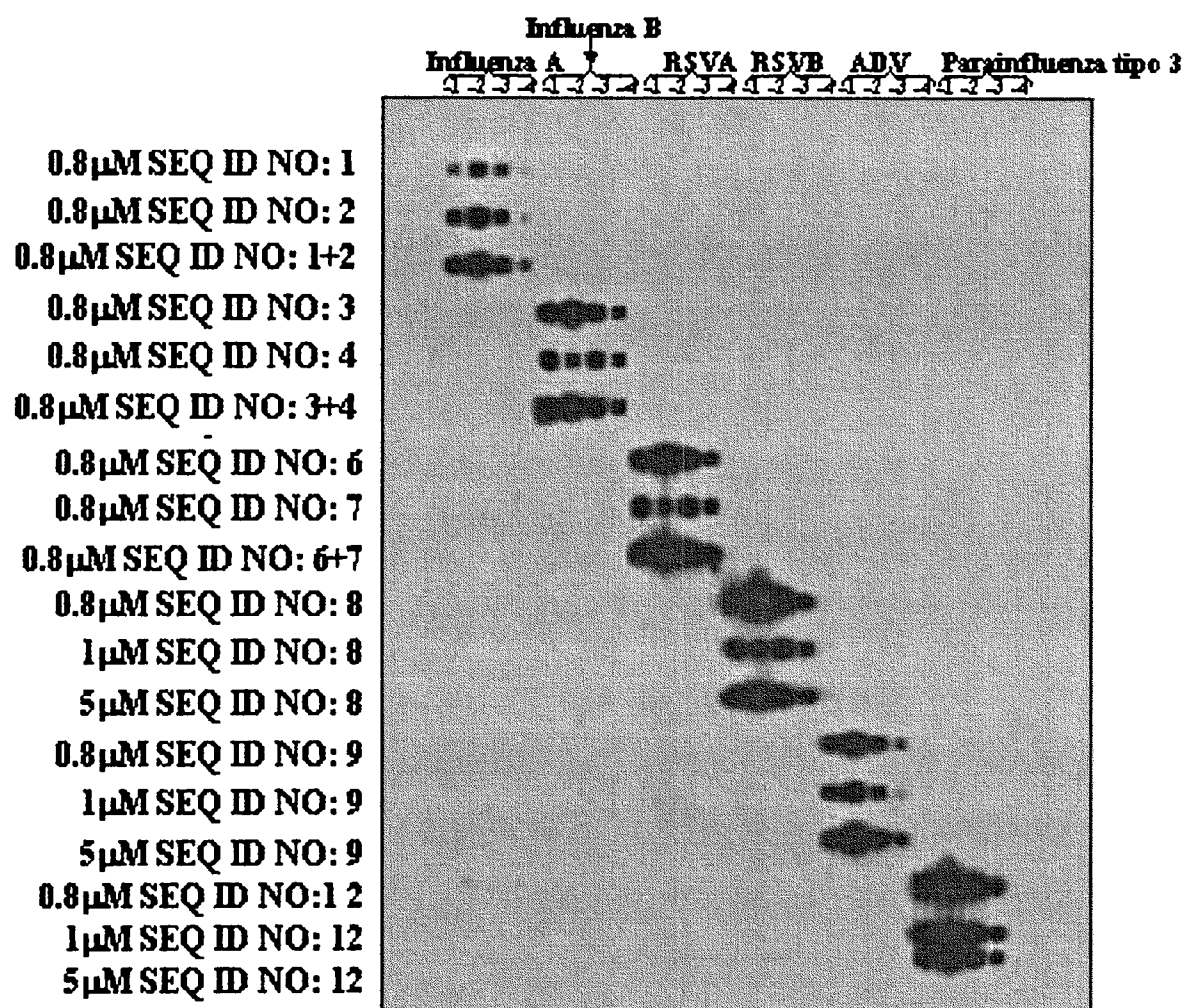


Figura 2

Figura 3A

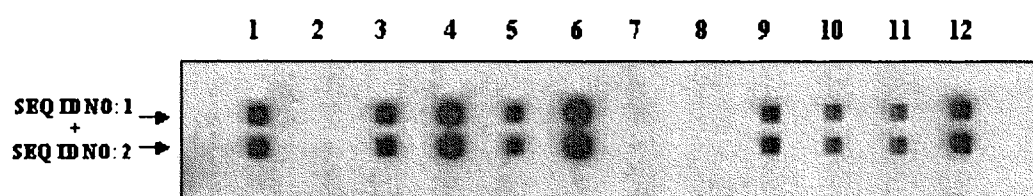


Figura 3B

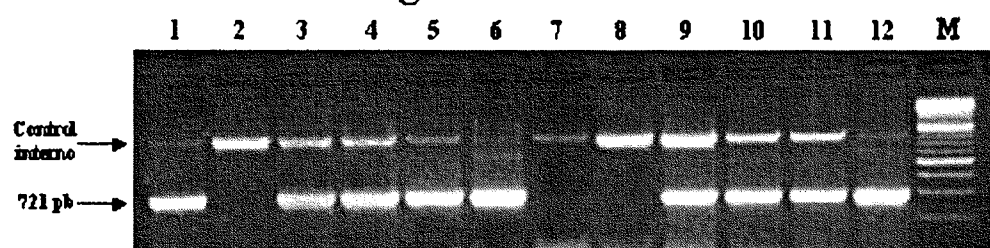


Figura 3

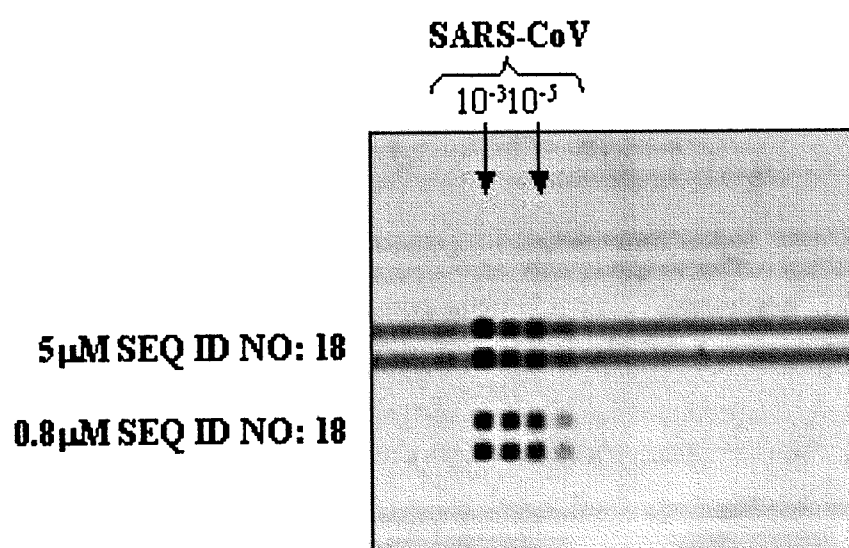


Figura 4

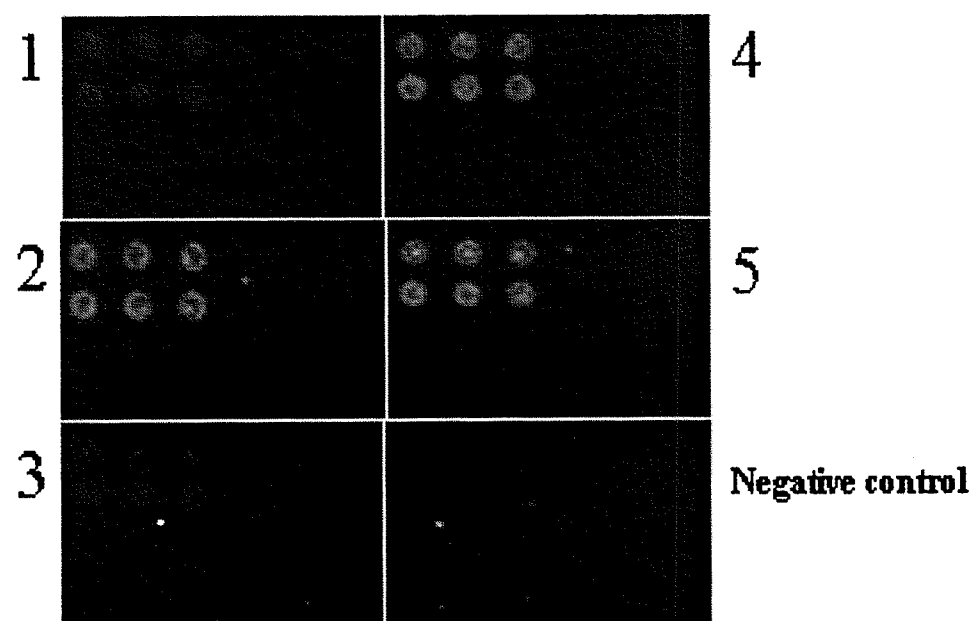


Figura 5

ES 2 303 395 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> INSTITUTO DE SALUD CARLOS III	
5	<120> SONDAS Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE MÚLTIPLES VIRUS CAUSANTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS EN HUMANOS	
	<160> 19	
10	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<223> sonda para detectar la presencia de virus influenza tipo A mediante hibridación	
20	<400> 1	
	cccagratgt gctctctgat gca	23
	<210> 2	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<223> sonda para detectar la presencia de virus influenza tipo A mediante hibridación	
	<400> 2	
35	catgccaatcc ayaccarytg rc	22
	<210> 3	
40	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<223> sonda para detectar la presencia de virus influenza tipo B mediante hibridación	
	<400> 3	
50	cagatgatgg tcaaagctgg act	23
	<210> 4	
	<211> 23	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> sonda para detectar la presencia de virus influenza tipo B mediante hibridación	
60	<400> 4	
	tcttcwatgt ctgcaatccc tgg	23
65	<210> 5	
	<211> 23	

ES 2 303 395 B1

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<223> sonda utilizada para detectar la presencia de virus influenza tipo C mediante hibridación	
	<400> 5	
10	cgatgatgaa attgaatcaa tag	23
	<210> 6	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> sonda para detectar la presencia de virus respiratorio sincitial humano tipo A mediante hibridación	
20	<400> 6	
	gtcaaaacat cactgaagaa ttt	23
25	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<223> sonda para detectar la presencia de virus respiratorio sincitial humano tipo A mediante hibridación	
35	<400> 7	
	ttacattggt wtttttggya ttg	23
40	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<223> sonda para detectar la presencia de virus respiratorio sincitial humano tipo B mediante hibridación	
	<400> 8	
50	tgaggtgagg tacaatgcat taa	23
	<210> 9	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<223> sonda para detectar la presencia de adenovirus humano mediante hibridación	
	<400> 9	
65	ccmgcrttrc ggtrgtggtt raa	23
	<210> 10	

ES 2 303 395 B1

	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<223> sonda para detectar la presencia de virus parainfluenza humano tipo 1 mediante hibridación	
	<400> 10	
10	taaattcaga tatgtatcct gat	23
	<210> 11	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<223> sonda para detectar la presencia de virus parainfluenza humano tipo 2 mediante hibridación	
	<400> 11	
25	tacctaagt atggaatcaa tcg	23
	<210> 12	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> sonda para detectar la presencia de virus parainfluenza humano tipo 3 mediante hibridación	
35	<400> 12	
	acagatgtat atcaactgtg ttc	23
40	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<223> sonda para detectar la presencia de virus parainfluenza humano tipos 4A y 4B mediante hibridación	
50	<400> 13	
	atggtgaaaa gaacatggag att	23
55	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<223> sonda para detectar la presencia de enterovirus mediante hibridación	
	<400> 14	
65	tggtgctta tggtgacaat	20

ES 2 303 395 B1

	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<223> sonda para detectar la presencia de rinovirus mediante hibridación	
10	<400> 15	
	gggaygggac cractacttt	20
15	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<223> sonda para detectar la presencia de coronavirus humano tipo 229E mediante hibridación	
	<400> 16	
25	ggacttggca ctgtggacgc	20
	<210> 17	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<223> sonda para detectar la presencia de coronavirus humano tipo OC43 mediante hibridación	
	<400> 17	
40	atcagatcag tggatacact	20
	<210> 18	
	<211> 27	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<223> sonda para detectar la presencia de coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) mediante hibridación	
	<400> 18	
55	tggattggct ttgatgtaga gggctgt	27
	<210> 19	
	<211> 19	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<223> sonda para detectar la presencia de metapneumovirus humano mediante hibridación	

ES 2 303 395 B1

<400> 19

ctgttaatat cccacacca

19

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 303 395

⑫ N° de solicitud: 200403083

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 24.12.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9716570 A1 (HENRICKSON, K. J.) 09.05.1997, ver tabla 7.	37
A	COIRAS, M.T. et al., "Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays.", J. MED. VIROL., 2004 Mar, Vol. 72, No. 3, páginas 484-495. Todo el documento.	1-37
A	COIRAS, M.T. et al., "Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay.", J. MED. VIROL., 2003, Vol 69, No. 1, páginas 132-144. Todo el documento.	1-37
A	OSIOWY, C., "Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay.", J. CLIN. MICROBIOL., 1998, Vol. 36, No. 11, páginas 3149-54. Todo el documento.	1-37
A	WANG, D. et al., "Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens.", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 2002, Vol. 99, No. 24, páginas 15687-92. Todo el documento.	1-37

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

03.07.2008

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1