



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 244**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01956475 .6**
86 Fecha de presentación : **15.06.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1297187**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Método para la detección de los virus de la gripe A/B en saliva.**

30 Prioridad: **15.06.2000 DE 100 28 837**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Klepp, Juergen y**
Schlipfenbacher, Reiner

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 298 244 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de los virus de la gripe A/B en saliva.

5 La invención se refiere a un método para detectar los virus de la gripe A/B, a un estuche o lote de reactivos para el análisis correspondiente así como a la utilización de saliva como material de prueba para la detección de los virus gripales A/B.

10 La gripe es una enfermedad infecciosa subestimada frecuentemente, que en particular en las personas mayores y en los pacientes de riesgo puede conducir a una tasa de morbilidad y de mortalidad. Los virus de la gripe A y/o B (llamados de forma abreviada; virus de la gripe A/B) son responsables de la auténtica gripe vírica, que padecen anualmente en el mundo entero varios cientos de millones de personas. Los virus de la gripe A y B afectan básicamente a la zona de la nariz, boca y la faringe o garganta y causan inicialmente síntomas en general respiratorios.

15 Incluso al médico experimentado no le es posible diagnosticar la gripe con gran seguridad con ayuda exclusivamente de la sintomática clínica del paciente, puesto que otros virus que atacan la zona de la nariz o de la garganta como el adenovirus, el virus parainfluenza o paragripal, o el virus respiratorio sincitial (RS), tienen una sintomática comparable.

20 Debido a la gran importancia medicinal de la infección de la gripe casi cada país de la tierra dispone de un sistema de vigilancia o control de la gripe organizado desde un punto de vista nacional. Para ello los médicos de los consultorios obtienen un frotis nasal y/o de la faringe del paciente sospechoso y éste se envía al centro de referencia nacional correspondiente. La detección del virus de la gripe A/B se realiza habitualmente por elución de la solución tampón del frotis y posterior cultivo de la muestra del paciente de células mamíferas, por ejemplo, células MDCK (células Madin-Darby Canine Kidney).

25 El cultivo en este laboratorio especial puede requerir hasta 14 días y por lo tanto no es de una relevancia inmediata como diagnóstico para cada uno de los pacientes. El cometido de los centros de referencia nacional consiste en tipificar y subtipificar los virus cultivados y comunicar los resultados a la organización mundial de la salud (OMS). El cometido del fabricante de las vacunas consiste pues en adaptar las vacunas de la gripe de años posteriores a las cepas víricas que circulan últimamente según la recomendación anual de la OMS.

30 El motivo de la mayor variabilidad genética y por tanto inmunológica, en particular en el virus A de la gripe, se debe a que además del viraje genético habitual (mutación puntual) en algunos casos puede producirse también un cambio genético ("reassortment", es decir, una nueva clasificación del gen vírico). Esto viene condicionado por el hecho de que el genoma del virus de la gripe se presenta segmentado contrariamente a otros virus y por que la gripe A es tanto patógena en el hombre como en el animal.

35 Los antígenos inmunodominantes que se asientan en la superficie del virus son la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). En la gripe A se conocen actualmente 15 subtipos de hemaglutinina (H1-H15) y 9 subtipos de neuraminidasa (N1-N9).

40 Por ejemplo, en la coinfección de una célula huésped (por ejemplo, de un cerdo) con un virus de la gripe del tipo A patógeno en el ser humano y con un virus de pájaro de la gripe del tipo A se puede producir una nueva clasificación ("reassortment") del genoma vírico y por tanto un nuevo subtipo de virus A de la gripe, que luego en la transmisión al ser humano se introduce totalmente en su sistema inmunológico. Un ejemplo reciente de ello fue la aparición del llamado virus de la gripe aviar o gripe del pollo en mayo de 1997 en Hong Kong (tipo A/H5N1/Hong Kong/156/97), que a pesar de una detección precoz y un tratamiento médico intensivo provocó la muerte de 6 de los 18 pacientes afectados.

45 Para que se produzca una gran epidemia o ciertamente una pandemia mundial se debe transmitir un subtipo nuevo de virus de la gripe directamente de hombre a hombre, como lo que ocurrió en 1918/19 en la primera aparición del subtipo H1N1 (gripe española, aproximadamente 50 millones de muertos en el mundo entero), en 1957 (H2N2, gripe asiática, aproximadamente 1 millón de víctimas) y 1968 (H3N2, gripe de Hong Kong, aproximadamente 1 millón de víctimas).

50 Desde hace poco se dispone de una nueva generación de fármacos para la gripe, los llamados inhibidores de la neuraminidasa, que posibilitan inicialmente una terapia causal de la gripe y por lo tanto se consideran entre los círculos de expertos como la verdadera irrupción en la terapia de la gripe. Los estudios clínicos sobre la admisión de esta nueva clase de sustancias han demostrado que el éxito de la terapia depende notablemente de un inicio prematuro del tratamiento tras la aparición de los primeros síntomas clínicos. Debido a esta nueva opción terapéutica, la necesidad de un inicio prematuro de la terapia por un lado y de una sintomática clínica relativamente poco específica por otro lado parece un diagnóstico individual rápido como terapia decisiva.

55 Por ello recientemente algunos fabricantes de diagnósticos han desarrollado pruebas rápidas inmunológicas para la gripe a base de una detección de antígenos, de manera que estas pruebas rápidas sobre frotis de la nariz y/o de la faringe o bien sobre el líquido obtenido por los enjuagues nasales se recogen como material de prueba. Los ejemplos de dichas pruebas rápidas para la gripe son el test rápido para la gripe A/B de la empresa Roche Diagnostics GMBH, el QUick Vue de Quidel y el AB FLU OIA de Biostar.

Un problema especial en la obtención de muestras consiste en que de la zona o región infectada de la nariz o de la faringe se tiene que extraer el material de prueba, que contenga una cantidad suficiente para una detección de virus de gripe A y/o de gripe B (a continuación en forma abreviada: virus de la gripe A/B). La calidad de la toma de muestra tiene por tanto un efecto directo en la tasa de positividad del test rápido, cuya sensibilidad clínica es habitualmente de alrededor del 70%, es decir en el 70% de todas las muestras evaluadas como positivas en gripe mediante el método de referencia (cultivo celular), el test o la prueba rápida inmunológica es también positiva. Los fabricantes de diagnósticos indican por tanto en las fichas de embalaje sus pruebas rápidas de gripe, de manera que la extracción de muestras únicamente pueda ser realizada por personal médico especialmente instruido para garantizar que el material de prueba obtenido contiene realmente cantidades suficientes de virus de gripe A/B.

Además resulta difícil el que en la zona de la faringe las regiones rascadas (pared posterior de la faringe, faringe, amígdalas) se puedan distinguir en función de la infección vírica existente. Esto significa por ejemplo que para la detección de una infección por estreptococo deben rascarse otras zonas de la faringe que las que corresponden a una detección del virus de la gripe A/B.

La toma de un frotis nasal o de la faringe es algo incómodo para el paciente y en particular resulta un problema en el caso de los niños (pequeños). Por otro lado los niños, al menos en la fase precoz de una epidemia de gripe, son los principales portadores de la gripe vírica debido a su contacto social (guarderías, colegio) y al sistema inmunológico a menudo no totalmente pronunciado.

Puesto que los frotis de nariz y garganta no representan ningún material de prueba homogéneo, la tasa de positividad de una detección de gripe se determina junto con la calidad del frotis mediante la elución correcta, es decir, el paso del material del frotis a la fase líquida, que sirve como verdadero "material de prueba".

En especial debido a la nueva opción terapéutica (inhibidores de neuraminidasa) existirá en el futuro una necesidad creciente de detección de virus gripales (virus de la gripe A/B) en la consulta del médico o por el propio paciente, lo que con el actual material de prueba empleado (frotis, enjuague nasal) no está en consonancia con la necesidad de una toma de muestra por un personal adiestrado (médico).

Covalciuc y cols., Journal of Clinical Microbiology 37 (1999)3971-3974, comparan la idoneidad de cuatro materiales de prueba diferentes (aspirado nasal, exudado o frotis nasofaríngeo, exudado o extensión faríngea, esputo) para la detección de virus de la gripe A y B por medio de un inmunoanálisis óptico. Según el material de prueba empleado se obtiene por tanto diferente sensibilidad, especificidad y comparabilidad con las determinaciones en un cultivo de virus.

La WO 92/12256 propone un método y unos estuches de prueba o análisis para la detección de infecciones víricas. Para la detección de infecciones en las vías respiratorias se mencionan como materiales de prueba posibles el "aspirado nasal", "los lavados nasales", "extensiones faríngeas", "exudados nasofaríngeos", "lavados de garganta", "frotis de garganta", "aspirados nasofaríngeos", "aspirados traqueales" y "aspirados bronquiales". Para la detección de la gripe se recomiendan exclusivamente las "extensiones o frotis de garganta" o los "lavados de garganta".

El cometido de la presente invención consiste en eliminar los inconvenientes de la tecnología actual. En particular el cometido de la invención consiste en preparar un método para detectar una infección por el virus de la gripe A y/o B, que pueda ser realizado de forma muy sencilla por personal no instruido o idealmente por el propio paciente. Sobre todo el cometido de la invención consistirá en hallar un material de prueba lo más homogéneo posible, que se pueda obtener fácilmente por el propio paciente o por personal no instruido, a partir del cual se puedan detectar los virus de la gripe A y/o B.

Este cometido se resuelve mediante el objeto de la invención tal como se caracteriza en las reivindicaciones independientes. Las formas de la invención preferidas se indican en las reivindicaciones dependientes.

El objeto de la invención es un método para detectar una infección por el virus de la gripe A y/o B que incluye las etapas siguientes

- i) Obtención de una muestra de saliva del individuo que se investiga
- ii) Preparación de la muestra de saliva para la detección o para una reacción de detección; y
- iii) Detección del virus de la gripe A y/o B en la muestra de saliva, de manera que la muestra de saliva es saliva obtenida de forma espontánea, tal como se define a continuación.

Finalmente el objeto de la invención es el uso de saliva configurada de forma espontánea como material de prueba para la detección de una infección por el virus de la gripe A y/o B.

De forma inesperada se averiguó que a partir de la saliva obtenida de forma espontánea como material de prueba con un procedimiento diagnóstico establecido es posible una detección fidedigna de los virus de la gripe A/B.

ES 2 298 244 T3

En particular sorprende que la detección de los virus de la gripe A/B a partir de la saliva sea posible sin que se tengan que enriquecer los virus en la toma de muestra en saliva, sino que sea suficiente con la saliva obtenida de forma espontánea como material de prueba para la detección de los virus de la gripe A/B. Por “saliva formada de modo espontáneo” se debe entender en la presente invención que en la toma de muestra de la muestra de saliva para la detección de los virus de la gripe A/B no se realiza ningún enriquecimiento de los virus de la gripe A/B en la muestra. Únicamente se recoge de forma espontánea la saliva que se encuentra en la cavidad bucal y por ejemplo se traslada a un recipiente para la recogida de la saliva (por ejemplo, a través de esputos entre otras cosas). También es posible recoger la muestra de saliva con ayuda de un material capaz de absorber, por ejemplo, de un algodón (tampón) en la boca o bien empleando dispositivos para la recogida de saliva (como por ejemplo, los llamados “Salivette” de la empresa Sarstedt o el OraSure Specimen Collection Device de la empresa Epitepe Inc. Beaverton, OR 97008, USA).

El material de prueba conforme a la invención la saliva y la forma simple de obtener la muestra facilita, contrariamente a los materiales para muestras conocidos hasta el momento en el diagnóstico de la gripe a base de frotis nasales y de faringe y del líquido obtenido por lavado nasal, una obtención de muestras estandarizada por parte de personas no instruidas para ello o por el propio paciente y aporta por tanto una seguridad diagnóstica superior de las pruebas de los virus de la gripe A/B. Además la saliva como material de prueba es más homogénea que los otros materiales empleados hasta el momento, lo que asimismo contribuye a la seguridad diagnóstica.

En un método conforme a la invención se obtiene inicialmente una muestra de saliva. Por ejemplo, esto se puede hacer tal como se ha descrito antes a través de esputos en un recipiente, mediante absorción de una muestra de saliva con el material apropiado, por ejemplo a base de un tampón de algodón o algo similar, o utilizando un dispositivo para la obtención de saliva convencional.

Según el método de detección que se vaya a emplear (detección inmunológica o detección a través de los correspondientes ácidos nucleicos) se prepara la muestra de saliva para la reacción de detección:

Para la detección inmunológica se libera de la muestra de saliva, por ejemplo, la nucleoproteína vírica de los virus gripales A/B mediante reactivos de lisis. Dichas reacciones son conocidas por el experto y pueden contener como componentes eficaces para la lisis sales o bien medios humectantes. El reactivo para la lisis para detectar virus de la gripe contiene preferiblemente un humectante (por ejemplo, da buen resultado el Triton[®] X 100, Tween[®]20 o bien el betaoctilglucopiranosido), un medio reductor suave (por ejemplo, N-acetil-L-cisteína o el DTT=ditiotreitól), solución salina fisiológica (es decir, 0,9% en peso de NaCl en tampón fosfato 20-50 mM), un medio conservante (por ejemplo, 0,09% en peso NaN₃), y una proteína para reducir el enlace poco específico (por ejemplo, RSA=albúmina de suero bovino o RPLA=albúmina de plasma bovino). La detección inmunológica puede detectar además de la nucleoproteína vírica, por ejemplo, la proteína vírica de la matriz o las polimerasas víricas. También es posible la detección de hemaglutinina o de neuraminidasa de los virus de la gripe A/B, para lo que no se requiere ninguna lisis puesto que estos componentes víricos se asientan en la superficie del virus.

Para la detección a través de un ácido nucleico se obtiene por ejemplo un ácido nucleico vírico (ARN), se purifica y se amplifica del modo correspondiente en presencia del cebador requerido para la detección, preferiblemente por medio de la reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa invertida (RT-PCR). Estos pasos son conocidos por el experto, así como la detección de ácidos nucleicos sin amplificación previa.

La detección de virus gripales A/B en la muestra de saliva se realiza según el método conocido.

En la detección inmunológica, por ejemplo, de la nucleoproteína vírica, se puede formar un complejo sándwich con el anticuerpo marcado del modo correspondiente y se puede detectar. Sin embargo, también son posibles formatos de detección competitivos. Aunque la detección es preferible por medio de una tira reactiva inmunocromatográfica que se evalúa visualmente como prueba rápida, la detección puede realizarse a través de todos los métodos inmunológicos habituales, por ejemplo ELISA, las pruebas turbidimétricas o de aglutinación, etc...

En la detección de los virus A/B de la gripe por medio de ácidos nucleicos como el ARN se prefiere marcar el producto de RT-PCR por medio de un cebador marcado y el marcaje del cebador (por ejemplo, una etiqueta enzimática o de fluorescencia) se detecta según la naturaleza del marcaje (etiqueta).

La invención se aclara con ayuda de los siguientes ejemplos:

Ejemplo

1. Detección de una infección por el virus de la gripe a partir de saliva como material de prueba

Para documentar la idoneidad de la saliva como material de prueba para la detección del virus de la gripe se extraían en 10 personas con sospecha de gripe y en 4 personas sin sospecha de gripe aguda dos frotis de faringe y una muestra de saliva. El material de prueba extraído del frotis de faringe se recogía con fines comparativos y se analizaba la infección por el virus de la gripe A/B. Los resultados de estos análisis se comparaban con los resultados que se obtenían con saliva como material de prueba. La tabla 1 que se muestra al final de la parte experimental del ejemplo muestra los resultados comparativos.

1.1. *Obtención de muestras*1.1.1. *Frotis de faringe*

Los frotis de faringe se extraían de la forma establecida por el experto por medio de un tampón para frotis de algodón de un solo uso de la empresa Copan Italia (I-24125 Brescia; Nr.ref.167CS01). Los dos frotis de faringe extraídos de un paciente se obtenían mediante un raspado de la faringe con un tampón para frotis con dos almohadillas dispuestas una junto a la otra. De este modo se garantizaba una comparabilidad de ambos frotis.

1.1.2. *Muestra de saliva*

La muestra de saliva la obtenía el propio paciente de forma que éste recogía unos 0,5 ml de saliva de formación espontánea en un tubito de plástico desechable con tapón de rosca (nr. ref. 62.559.001 de la empresa Sarstedt). Se rechazaba conscientemente la utilización del método o dispositivos para la obtención de saliva conocidos por el experto (como las “Salivetten” de la empresa Sarstedt o el Orasure Specimen Collection Device de la empresa Epitepe Inc. Beaverton, OR 97008, USA) para demostrar que sin la concentración previa o bien el tratamiento de la saliva también es posible la detección del virus de la gripe.

1.2 *Detección de los virus A/B de la gripe a partir de frotis de faringe (solamente para comparar)*1.2.1 *Detección de frotis de faringe por medio del cultivo celular*

El primer tampón del frotis se trasladaba directamente tras la extracción a un tubito con 1,5 ml de medio de transporte del virus de la gripe de la empresa Virotest (Rosenbergstr. 85, D-70193 Stuttgart, nr. cat. 0500300) y se cultivaba sobre células MDCK (Madine-Darby Canine Kidney-Zellen). El cultivo de las muestras se realizaba conforme al método descrito en la literatura (Diagnóstico Microbiológico, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1992, Editor Friedrich Burkhardt, página 371). Los resultados se indican en la tabla 1, donde “+” equivale a un hallazgo positivo y “-” simboliza un hallazgo negativo.

1.2.2. *Detección del frotis de faringe por medio de una prueba rápida inmunológica*

El segundo tampón correspondiente del frotis se analizaba directamente tras la extracción de la muestra de la zona de la faringe del paciente por medio de una prueba inmunológica rápida del antígeno en presencia del virus de la gripe (Influenza A/B-rapid Test de la empresa Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania, nr. cat. 2 158 663). La prueba rápida empleada corresponde básicamente a la prueba rápida inmunológica descrita como ejemplo 2 en EP-A 0 926 498. En este documento se hace expresamente referencia a ello.

Además de la valoración visual de las tiras reactivas se medía de forma cuantitativa la intensidad de la línea de detección una vez finalizada la cromatografía por medio de un aparato medidor fotométrico de la remisión (iluminación anular por medio de 24 LEDs verdes de longitud de onda 555 nm y cámara CCD con objetivo). Para ello se estudiaba la intensidad de la señal del trazo detectado en porcentaje de la remisión (%Rem: respecto a una región “blanca” de la tira reactiva, a la que se atribuía el 100% de remisión): los valores de la remisión a partir del 98,5% son reconocidos por el usuario como señal negativa; los valores de remisión entre el 96% y el 98,5% se reconocen como una señal débilmente positiva; los valores de remisión inferiores al 96% se reconocen como una señal claramente positiva. Los resultados se indican en la tabla 1, donde “+” significa una señal positiva, “(+)” una señal débilmente positiva y “-” una señal negativa.

1.3. *Detección de los virus A/B gripales a partir de saliva*1.3.1 *Detección del ácido nucleico vírico en saliva por medio del RT-PCR*

Las muestras de saliva se analizaban por medio de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa) en presencia del ácido nucleico de la gripe vírica (aquí: ácido ribonucleico, RNA). El proceso de análisis se componía de tres etapas para la preparación de la muestra habituales en el diagnóstico del ácido nucleico (para la separación de inhibidores), la amplificación y detección del ácido nucleico (compárese seguidamente en 1.3.1.a hasta 1.3.1.c).

1.3.1.a *Preparación de muestras*

Para el aislamiento del ARN de la gripe vírica se empleaba el equipo “High Pure Viral RNA kit” que se obtiene en el comercio bajo el nr. de referencia 1 858 882 de Roche Molecular Biochemicals (Sandhofer Strasse 116 en D-68305 Mannheim/Alemania). La realización se llevaba a cabo conforme al protocolo estándar detallado en la descripción del producto, en el cual inicialmente 200 μ l de saliva por recipiente de reacción (tubo filtrante) en presencia del tampón de enlace se unían a la guata de vidrio del tubo filtrante y tras retirar posibles eventuales inhibidores mediante dos etapas de lavado se eluía el ácido nucleico vírico en 200 μ l de tampón de elución. Para ello se debía tener en cuenta que el

ES 2 298 244 T3

volumen de muestra era idéntico antes (saliva) y después (eluido) de la preparación de la muestra, de manera que no se producía ninguna concentración de los virus de la gripe. Naturalmente también es posible según la invención realizar la etapa de elución con menos de la cantidad de saliva que corresponda a la cantidad de tampón de la elución y así concentrar o enriquecer los virus de la gripe en un eluido.

5

1.3.1.b RT-PCR

Todos los reactivos se referían a Roche Molecular Biochemicals, mientras no se indicara o contrario.

10 El volumen por recipiente de reacción de PCR era de 50 μ l. De estos 10 μ l eran de volumen de muestra (eluido de la preparación de la muestra) y otros 10 μ l de tampón Bicine (5 veces el tampón RT-PCR). Los otros componentes de la mezcla principal se encontraban en la concentración final siguiente: 2,5 mmolar de acetato de manganeso, 0,2 mmolar de ATP (2'-desoxiadenosin-5'-trifosfato), dCTP(2'-desoxi-citidin-5'-trifosfato), dGTP(2'-desoxi-guanosin-5'-trifosfato) y dUTP(2'-desoxi-uridina-5-trifosfato) así como dTTP 0,05 mmolar (2'-desoxi-timidina-5'-trifosfato); 0,01 U/ μ l UNG (uracil-DNA-glucosilasa); Tht-polimerasa 0,2 U/ μ l de *Thermus thermophilus* HB8; Inhibidor RNasa 0,8 U/ μ l así como un cebador de avance y reverso 1,0 μ molar.

15

La secuencia del cebador se extraía de la literatura (James C. Donofrio y cols., Detection of influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, páginas 263-268). Los cebadores son específicos del tipo para la gripe A y presentan un segmento genético muy conservado de par de bases 212 (posición 101 hasta 312). El cebador reverso del gen de la matriz se marcaba con biotina en el extremo 5' para la detección posterior del producto de amplificación en la placa de microvaloración. Los cebados específicos del tipo para la gripe B se conocen asimismo en la literatura (James C. Donofrio y cols., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR Methods and Applications 1, páginas 263-268).

20

La amplificación de la mezcla principal se realizaba en un termociclador Perkin Elmer 9600 con el perfil de temperaturas siguiente: 20 minutos a temperatura ambiente tras la adición de UNG + 45 minutos a 60°C + 2 minutos a 94°C + 10 ciclos (30 segundos 94°C + 60 segundos 50°C + 90 segundos 68°C)+ 35 ciclos (30 segundos a 94°C + 60 segundos a 60°C + 90 segundos a 68°C)+ 7 minutos a 68°C.

25

1.3.1.c Hibridación y detección

La detección del ácido nucleico amplificado por medio de RT-PCR se realizaba utilizando el PCR ELISA (detección DIG) de la empresa Roche Molecular Biochemicals, nr. ref. 1636111. A excepción del volumen de pipeteado se realizaban etapas conjuntas conforme a la ficha de embalaje. 10 μ l del producto de amplificación se mezclaban con 20 μ l de solución desnaturalizante en un recipiente de reacción de 1,5 ml y se incubaban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadían 250 μ l de una sonda de hibridación marcada con digoxigenina. La concentración de la sonda de hibridación era de 70 ng/ml.

30

La secuencia de la sonda de hibridación se extraía de la literatura (James C. Donofrio y cols., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR methods and Applications 1, páginas 263-268). La sonda se dirige contra la posición 177-205 del gen de la matriz (segmento 7) de la gripe A. Las sondas correspondientes para la gripe B se conocen asimismo en la literatura (James C. Donofrio y cols., Detection of Influenza A and B in Respiratory Secretions with the PCR, 1992, PCR methods and Applications 1, páginas 263-268).

35

200 μ l de la mezcla de reacción se trasladaban a una cavidad ("pocillo") de una microplaca revestida de estreptavidina y se incubaban durante 1 hora a 37°C en un agitador. Tras el enlace del producto de hibridación a la estreptavidina de la pared de las microplacas el contenido de los pocillos era aspirado y se lavaba 3 veces con 300 μ l de solución de lavado respectivamente. Luego se añadían al pocillo 200 μ l de sustrato de anti-digoxigenin-peroxidasa (conjugado anti-DIG-POD) y la solución se incubaba durante 30 minutos a 37°C en un agitador. Tras la unión del conjugado POD se aspiraba el contenido del pocillo, se lavaba 3 veces con 300 μ l de solución de lavado y a continuación se añadían 200 μ l de sustrato de sal de diamonio de 2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolinsulfonato (6))(sustrato ABTS). Tras una posterior incubación durante 30 minutos a 37°C se medía la evolución del color a 405 nm en un lector de microplacas.

40

En cada determinación del PCR de las muestras de saliva se determinaban asimismo en paralelo varios controles negativos (DEMC-agua (Art.nr.16-001Y "Acu Gene Water, molecular biology grade, autoclaved" del fabricante Bio Whittaker Europe S.p.r.l.(Parc Industriel de Petit-Rechain, B-4800 Verviers, Bélgica) para excluir falsos valores positivos por contaminación) así como varios controles positivos (series de dilución de residuos de cultivos de MDCK que contienen gripe) por medio de la preparación de muestras y RT-PCR. Además se realizaba un control positivo interno en la microplaca para el control de los reactivos de detección.

45

Los valores de extinción de los controles negativos efectuados en la microplaca correspondían habitualmente a 100-150 mE. Los valores de los controles positivos internos realizados equivalían habitualmente a 1000-1500 mE.

50

Como señal positiva para las muestras de los pacientes se definían los valores de extinción \geq 300 mE, lo que equivalía a una señal mayor que 2 veces el valor blanco/nulo. Los resultados se pueden ver en la tabla 1, donde "+" simboliza un hallazgo positivo y "-" un hallazgo negativo.

55

ES 2 298 244 T3

1.3.2. Detección de un antígeno vírico en saliva por medio de un análisis rápido inmunológico

Para la detección de los virus A/B de la gripe en la saliva se empleaba el análisis rápido de los virus A/B de la gripe de la empresa Roche Diagnostics Nr. cat. 2 158 663. El análisis rápido allí empleado correspondía esencialmente al análisis rápido inmunológico descrito en EP-A 0 926 498. EN este documento se hace referencia a él de forma expresa.

El análisis se empleaba normalmente para detectar la nucleoproteína vírica específica en los frotis de faringe por medio de una tira reactiva de cromatografía inmunológica. EL análisis diferencia entre los virus de la gripe A y B.

Para garantizar una buena cromatografía de la tira reactiva con saliva como material de muestra se empleaba un tampón de lisis/elución especial, que no forma parte del estuche o equipo de análisis. El tampón de lisis/elución especial se compone de lo siguiente:

0,9% en peso de NaCl, KH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM, 0,095% en peso de NaN_3 , EDTA 10 mM, 1,5% en peso de albúmina serica bovina(RSA), 1,5% en peso de Tritón[®] X-100.

EL análisis se realizaba del modo siguiente:

A diferencia de cómo se ha descrito en la ficha de embalaje inicialmente para eluir un tampón de frotis de faringe como muestra del paciente con 3 fracciones (=800 μl) del tampón de lisis/elución contenido en un equipo de análisis se añadían 300 μl de saliva y 500 μl de tampón especial de lisis/elución a un recipiente de reacción y se mezclaban.

La realización del análisis se llevaba a cabo conforme a los pasos descritos en la ficha del embalaje. Esta indicaba inicialmente la adición de 2 gotas de solución de anticuerpo 1 (que contiene anticuerpo monoclonal biotinilado frente a la nucleoproteína A y la nucleoproteína B), la adición de 2 gotas de solución de anticuerpo 2 (que contiene anticuerpo monoclonal biotinilado frente a la nucleoproteína A y la nucleoproteína B), así como la cromatografía final de esta mezcla reactiva por medio de una tira reactiva.

Como se sabe de la EP-A 0 926 498 la tira reactiva contiene un vellón conjugado, que se impregna de forma reversible con un conjugado de oro soluble en líquido de muestra. Las partículas de oro se cargan por absorción de un anticuerpo monoclonal contra la digoxigenina.

En otra zona de la tira reactiva en la dirección de la cromatografía aguas abajo se encuentra una membrana de nitrocelulosa en la cual se impregnan de forma irreversible la poliestreptavidina como línea de detección y un anticuerpo policlonal PAK<ratón Fc γ >S-IgG como línea de control.

El complejo sándwich a base de anticuerpo biotinilado/nucleoproteína/anticuerpo de digoxigenina formado en presencia del analito en el recipiente de reacción, se cromatografía por medio de la tira reactiva, se une al anticuerpo antigripal marcado con digoxigenina del complejo sándwich tras disolverse el conjugado de oro de éste sobre el anticuerpo-antidigoxigenina, y seguidamente es captado en la membrana de nitrocelulosa en un trazo de poliestreptavidina sobre el anticuerpo antigripal marcado con biotina del complejo sándwich. Todo ello es visible mediante un trazo rojo en la membrana de nitrocelulosa que equivale a una señal positiva del análisis.

El conjugado de oro que sobra se cromatografía aguas abajo y es absorbido en un trazo de control de la membrana de nitrocelulosa como otra línea roja visible por medio del PAK<Maus Fc γ >S-IgG.

Además de la evaluación visual de la tira reactiva se medía de forma cuantitativa la intensidad de la línea de detección una vez finalizada la cromatografía por medio de un aparato medidor fotométrico de la remisión (iluminación anular por medio de 24 LEDs de color verde de longitud de onda 555nm y cámara CCD con objetivo). De este modo se analizaba la intensidad de la señal del trazo detector en cuanto al porcentaje de remisión (% Rem.; respecto a un trazo "blanco" de la tira reactiva, al que se atribuía una remisión del 100%): Los valores de remisión a partir del 95% son reconocidos por el usuario como valor negativo; los valores de remisión entre el 96% y el 98,5% son reconocidos como señal débilmente positiva; los valores de remisión inferiores al 96% se conocen como señal claramente positiva. Los resultados se indican en la tabla 1, donde "+" corresponde a una señal positiva, "(+)" una señal débilmente positiva y "-" una señal negativa.

1.4 Resultados

A continuación se indican a modo de ejemplo algunos resultados obtenidos con muestras de pacientes (tabla 1).

Los resultados visualizados se refieren exclusivamente a la detección de virus de gripe A, puesto que en el momento de la toma de la muestra únicamente se hallaron pacientes con virus de la gripe A y ningún paciente con virus de gripe B. El experto sabe que la gripe B contrariamente a la gripe A no circula en cada temporada de invierno y que o aparece de forma conjunta en virus de gripe A/B o bien la gripe B siempre presenta una prevalencia claramente inferior.

ES 2 298 244 T3

5 Aquí no nos podemos olvidar de que muestras de saliva positivas en gripe B fabricadas artificialmente (muestras de saliva almacenadas, que se han creado con excesos de cultivos de virus de la gripe B) también han sido adecuadas en el análisis del ácido nucleico así como en el ensayo inmunológico, para la detección de virus gripales a partir de la saliva. Los resultados visualizados no presentan por tanto ninguna limitación en el sentido de la invención para la detección conjunta o aislada de virus de la gripe B además de virus de la gripe A a partir de saliva. La saliva es lo más adecuado como material de muestra para detectar los virus gripales A/B.

TABLA 1

10

Persona Nr. ^A	Muestras de frotis de faringe (solo de comparación)			Muestras de saliva		
	Cultivo ^B	Análisis rápido in- munológico		Resultado PCR ^E	Análisis rápido in- munológico	
		visual ^C	fotométrico ^D		visual ^C	fotométrico ^D
1	+	+	+	+	+	+
2	+	(+)	(+)	+	+	+
3	+	(+)	(+)	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	(+)	(+)	+	+	+
7	+	-	-	+	(+)	(+)
8	+	-	-	+	(+)	(+)
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-

35 A: En las personas N° 1-10 se trata de personas con sintomática tipo gripal. En las personas N° 11-14 se trata de personas sin sintomática aguda respiratoria.
 B: Cultivo en células MDCK (compare en 1.2.1.arriba); +positivo; - negativo
 C: Realización del análisis rápido tal como se describe en 1.2.2 y 1.3.2 (ver antes);+Positivo;(+)débilmente positivo;-negativo
 D: Determinación cuantitativa de la intensidad del trazo de detección por medio de un aparato medidor fotométrico de la remisión (compare en 1.2.2. y 1.3.2 arriba); aquí solamente se indican los resultados relativos (+positivo;(+)débilmente positivo;-negativo), que se dan conforme a la escala indicada en el texto.
 E: Se han medido los valores de extinción de la microplaca a 405 nm(compare en 1.3.1. antes); aquí se indican solamente los resultados negativos (+positivo;-negativo), que se dan conforme a la escala indicada en el texto

50

A partir de los resultados que se muestran en la tabla 1 se puede poner de manifiesto lo siguiente:

55

- No todas las personas clasificadas como pacientes por gripe debido a la sintomática clínica (Nr.1-10) eran realmente positivas. Las personas nr. 9 y 10 dieron negativo tanto en el cultivo del frotis de faringe como en el PCR de la saliva y también con el análisis rápido de saliva y frotis de faringe. Esto aclara lo realizado anteriormente y la afirmación conocida en el círculo de expertos de que un diagnóstico definitivo de la gripe no es posible a base exclusivamente de la sintomática clínica.

60

- Los frotis de faringe y las muestras de saliva de las personas asintomáticas (Nr. 11-14) dieron negativo con todos los métodos de ensayo indicados y ponen de manifiesto claramente la especificidad clínica de estos métodos.

65

- De las 8 personas halladas positivas en gripe A por medio del cultivo celular en el frotis de la faringe (Nr. 1-8; los llamados pacientes de cultivo positivo), 6 personas fueron asimismo diagnosticadas como positivas con el ensayo rápido inmunológico en frotis de faringe. Eso explica que la sensibilidad clínica de este ensayo rápido disponible hasta

ES 2 298 244 T3

el momento a partir de frotis como material de muestra se encuentre por debajo del cultivo celular reconocido hasta el momento como estándar de oro (sensibilidades clínicas de distintos ensayos rápidos inmunológicos según la ficha de embalaje del fabricante respectivo: Quidel 73% para frotis nasal, Roche 70% para frotis de faringe, Biostar 62% para frotis de faringe y 83% para frotis nasofaríngeo).

5

- Por el contrario, las correspondientes muestras de saliva de los 8 pacientes positivos en el cultivo dieron positivo con el ensayo rápido inmunológico.

10

- Además de la comparación de los valores de remisión (no visualizada en la tabla) se deduce que las intensidades del trazo detector en las tiras reactivas rápidas inmunológicas con muestra de saliva eran algo más intensas que las intensidades correspondientes al utilizar frotis de faringe.

15

- Los resultados del ensayo rápido en saliva se aseguran con los resultados PCR correspondientes en saliva y justifican por tanto que a partir de la saliva como material de muestra incluso sin previo enriquecimiento en la obtención de la muestra se puedan detectar con seguridad los virus de la gripe A/B.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de una infección con el virus de la gripe A y/o B que incluye los pasos

- i) Obtención de una muestra de saliva;
- ii) Preparación de la muestra de saliva para la detección; y
- iii) Detección del virus de la gripe A y/o B en la muestra de saliva

que se **caracteriza** porque la muestra de saliva que se obtiene en el paso i) es saliva formada espontáneamente, de manera que en la toma de la muestra de saliva no se realiza ningún enriquecimiento de virus en la muestra, sino que solamente se recoge la saliva que se encuentra en la boca de forma espontánea.

2. Método conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** porque la muestra de saliva en el paso i) se obtiene con un dispositivo para obtener saliva sin enriquecimiento específico de virus.

3. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 2, que se **caracteriza** porque en el paso ii) se obtiene de la muestra de saliva el B-RNA de la gripe A y/o B, que se amplifica por medio de RT-PCR y se detecta en el paso iii).

4. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 2, que se **caracteriza** porque se analiza siguiendo un método inmunológico la muestra de saliva en el paso iii) para ver si existen virus de gripe A y/o B.

5. Método conforme a la reivindicación 4, que se **caracteriza** porque la muestra de saliva del paso ii) se trata con un tampón de lisis, de manera que se libera la nucleoproteína vírica del virus de la gripe A y/o B y esta nucleoproteína es detectada por un método inmunológico en el paso iii).

6. Utilización de la saliva como material de muestra para detectar una infección por el virus de la gripe A y/o B, que se **caracteriza** porque la saliva es saliva formada de manera espontánea, de modo que en la toma de muestra no se realiza ningún enriquecimiento de virus en la muestra sino que se recoge la saliva que se encuentra de forma espontánea en la boca.

7. Uso de la saliva conforme a la reivindicación 6, que se **caracteriza** porque la muestra de saliva se obtiene con un dispositivo para obtener saliva sin enriquecimiento específico de virus.

8. Uso de la saliva conforme a una de las reivindicaciones 6 hasta 7, que se **caracteriza** porque la detección de una infección con el virus de la gripe A y/o B se realiza por medio de un ensayo inmunológico.

9. Uso de la saliva conforme a una de las reivindicaciones 6 hasta 7, que se **caracteriza** porque la detección de una infección por el virus de la gripe A y/o B se realiza por medio de la detección de ácido nucleico.