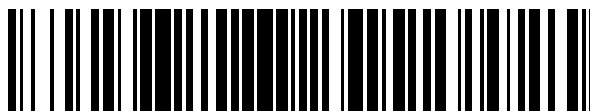


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 300**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/70** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09727056 .5**  
96 Fecha de presentación: **27.03.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2271778**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2011**

54 Título: **Método de detección de herpesvirus en una muestra de ensayo**

30 Prioridad:  
**03.04.2008 GB 0806041**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.03.2012**

73 Titular/es:  
**Genómica S.A.U.**  
**Calle Alcarria 7 Polígono Industrial de Coslada**  
**28820 Coslada, ES**

72 Inventor/es:  
**MANJÓN, Nuria y**  
**VILLAHERMOSA, María, L.**

74 Agente/Representante:  
**BALLESTER CAÑIZARES, Rosalía**

ES 2 377 300 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

**Campo de la invención**

[0001] La presente invención hace referencia a un método y kit para la detección e identificación de herpesvirus en una muestra de ensayo, concretamente el HSV-1, HSV-2 y VZV; opcionalmente también puede detectarse el HHV-6 en la muestra. También quedan aquí descritos un método y kit que permiten asimismo la detección eficiente de VZV, CMV, EBV, enterovirus, HHV-7 y HHV-8.

[0002] Se proporcionan distintas combinaciones particularmente ventajosas de cebadores de amplificación.

[0003] También quedan aquí descritos un método y kit para la detección e identificación, en caso de estar presentes en una muestra de ensayo, de uno o más agentes virales del grupo compuesto por HSV-1, HSV-2, HHV-6, VZV, CMV, EBV, Enterovirus, HHV-7 y HHV-8.

**Antecedentes de la invención**

[0004] Existen más de 100 herpesvirus conocidos pertenecientes a la familia de la *Herpesviridae*. De estos, se sabe que 8 infectan a humanos: el virus del herpes simple 1 (HSV-1), el virus del herpes simple 2 (HSV-2), el virus de la varicela zoster (VZV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el citomegalovirus (CMV), el virus del herpes 6 (HHV-6), el virus del herpes 7 (HHV-7) y el virus del herpes 8 (HHV-8).

[0005] Los herpesvirus son agentes infecciosos que, tras una infección inicial aguda, establecen una infección latente produciendo recurrencias periódicas en condiciones específicas. La recurrencia de la infección producida por herpesvirus se asocia a una patología neurológica y a alteración. Las manifestaciones clínicas más comunes de las infecciones del sistema nervioso central que se asocian a este grupo de virus son: meningitis aséptica, encefalitis, meningoencefalitis y polirradiculitis.

[0006] Además de infecciones neurológicas producidas por herpesvirus, existen otras infecciones neurológicas de origen viral causadas por virus del grupo enterovirus, como se describe en EP0789081. Tanto los enterovirus como los herpesvirus son capaces de producir síndromes neurológicos, tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos.

[0007] Las técnicas generales de laboratorio para la detección viral comprenden el aislamiento de virus en células cultivadas, técnicas serológicas y detección de material genético por PCR. Estas dos últimas técnicas son lentas y de baja sensibilidad, por lo cual se han centrado los esfuerzos más recientes en esta última técnica.

[0008] Los herpesvirus son virus con envoltura cuyo genoma constituye una molécula de ADN bicatenario, mientras que los enterovirus son virus sin cubierta con un genoma formado por una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva.

[0009] Se describen algunos ejemplos de ensayos por PCR múltiple para la detección de herpesvirus en WO93/25707, WO2004/016219 y US2007/0207453.

[0010] En WO2004/016219 se describe un método para detectar e identificar uno o más herpesvirus en una muestra, donde tal método comprende el uso de cebadores consenso para la secuencia genética de la ADN-polimerasa de los herpesvirus en conservación. La detección e identificación proceden a realizarse mediante análisis de la movilidad de heteroduplos (HMSA por sus siglas en inglés), prueba *dot blot* o PCR en tiempo real.

[0011] Asimismo, se describe en EP0789081 un método para detectar algunos virus pertenecientes a la familia de la *Herpesviridae* (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, HHV-6 y EBV) y los Enterovirus.

[0012] En EP0789081 se describen mezclas de cebadores de reacción utilizadas para la amplificación enzimática de genomas de virus pertenecientes a la familia de la *Herpesviridae*, tales como el SV-1, HSV-2, VZV, CMV, HHV-6 o el EBV, así como enterovirus. Los cebadores se utilizan en una reacción múltiple que genera fragmentos de amplificación del mismo tamaño, a partir de los cuales la identificación del agente infeccioso presente en la muestra sólo puede realizarse a través de una segunda reacción de amplificación sobre los productos resultantes de la primera reacción de amplificación, o de otra forma, por hibridación de las secuencias amplificadas con sondas de oligonucleótidos específicas.

[0013] En WO 2007/056463 se describen métodos y composiciones para ser utilizados en el análisis cuantitativo y simultáneo de dos o más patógenos virales, bacteriales o protozoarios en una muestra. Los métodos de esta invención implican la adición de cebadores de oligonucleótidos específicos para cada patógeno que desea detectarse, junto con moléculas competidoras de ácido nucleico que se amplifican con cebadores específicos de un patógeno a un nivel de eficiencia similar. Markoulatos P et al. (2000, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Vol. 14, nº5, páginas 214-219) describe un método para la detección simultánea de HSV-1, HSV-2 y VZV en una muestra biológica por PCR múltiple. Asimismo, Shin CH et al. (2003, *Yonsei Medical Journal*, Vol. 44, nº 6, páginas 1001-7), detalla un método para la detección simultánea de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en una muestra también por PCR múltiple.

- [0014] EnUS 2007/0141559 se describe un método para la detección y diferenciación entre HSV-1 y HSV-2 en una muestra mediante la utilización de secuencias de cebadores específicas para HSV-1 o HSV-2 a través de PCR múltiple o independiente.
- 5 [0015] Algunos aspectos de la presente invención se relacionan, además, con métodos para reducir la detección de hibridación cruzada no específica de secuencias diana de ácido nucleico amplificadas, particularmente, aunque no de forma exclusiva, en la ejecución del método de detección tal y como se ha descrito anteriormente.
- [0016] EnWO 03/033735 se describe un sistema analítico de tira de ensayo por inmersión que comprende reactivos secos que pueden ser utilizados para detectar la presencia de secuencias específicas de ácido nucleico dentro de una muestra.
- 10 [0017] EnWO 2007/032748 se describe un método para la detección de metilación en una muestra de ADN que comprende la conversión química de residuos de citosina no metilada a uracilo, amplificando el ADN convertido químicamente con la utilización de cebadores, de los cuales el cebador superior (*upper primer*) se biotinizan, e hibridando el producto marcado a una sonda oligonucleotídica, junto con la adición de estreptavidina.
- 15 [0018] En WO99/25867 se describe un método para la detección de ácidos nucleicos en varias muestras, lo cual comprende la preparación de los ácidos nucleicos en la muestra, la eliminación de inhibidores de amplificación, la generación de productos por PCR de secciones del ácido nucleico, y la detección automática de los productos de la amplificación.
- [0019] EnUS2005/0287549 se describe un método para la detección simultánea de un número de polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Se describe particularmente el uso de un par de cebadores de los cuales el primero es biotinizado. Tras ello, se inmoviliza el producto de amplificación mediante reacciones con avidina-biotina.
- 20 [0020] EnEP0795612 se describe un método para amplificar y detectar un ácido nucleico diana en una muestra, lo cual comprende seguir un paso de incubación post-amplificación con anterioridad a la detección para inactivar las enzimas de la amplificación. Un producto amplificado con biotina puede entonces ser detectado por hibridación con un conjugado estreptavidina-enzima.
- 25 [0021] EnWO 01/094638 se describe un método para la amplificación del ácido nucleico, que incluye un protocolo de termociclado, y el uso de cebadores marcados de avance en el paso de amplificación.
- [0022] En EP1595960 se describe un método para la detección selectiva de ácido nucleico en una muestra, lo cual comprende la amplificación del ácido nucleico con dos cebadores, uno de los cuales es biotinizado, y la hibridación del producto marcado con una sonda de captura.
- 30 [0023] EnKR060015668 se describe un método para la detección de microorganismos patógenos, que comprende la amplificación de una secuencia diana con un cebador marcado y la hibridación del producto marcado con sondas inmovilizadas sobre la superficie de un biochip.
- [0024] En la base de datos Geneseq (cebador de amplificación genómica del virus de la varicela zoster) (con números de acceso a la base de datos AAT37529 y AAT37524) se describe el uso de al menos un cebador de amplificación en AAT37520-T37522 y en AAT37523-T37532 para la amplificación de las secuencias de enterovirus y herpesvirus.
- 35 [0025] En la base de datos Geneseq (sonda específica del virus herpes humano 2 con número de identificador de secuencia SEQ ID N°: 5) se describe un chip genético de herpesvirus que comprende una sonda específica de herpesvirus.
- [0026] EnUS 2004/110195 se detallan métodos por PCR capaces de identificar los 8 herpesvirus humanos, incluidos los subtipos EBV y HHV-6, mediante la amplificación del gen de la ADN-polimerasa del herpesvirus. En US 2004/110195 se describe también la amplificación tanto del HSV-1 como del HSV-5 con un único par de cebadores.
- 40 [0027] En la base de datos Geneseq (cebador de amplificación genómica del virus del herpes simple) se describe la utilización de al menos un cebador en AAT37520-T37522 y en AAT37523-T37532 para la amplificación de secuencias de enterovirus y herpesvirus.
- 45 [0028] Markoulatos Panayotis et al. (*J. Clinical Microbiology*) describe un ensayo por PCR múltiple para la amplificación en un solo tubo de HSV-1, HSV-2, VZV, CMV y EBV, seguido de la visualización de los productos amplificados por electroforesis en gel de agarosa.
- Resumen de la invención**
- 50 [0029] El problema que pretende resolver la presente invención es la consecución de un método que permita una mejor detección del HSV-1, HSV-2 y VZV que la que presentan otros métodos de trabajo hasta la fecha.
- [0030] Lo deseable es que el método previsto pueda, además, permitir la detección de HHV-6, CMV, EBV y enterovirus.

[0031] Este problema ha sido resuelto con el diseño de cebadores de amplificación que, al ser utilizados en reacciones de amplificación según la presente invención, dan como resultado una mayor sensibilidad de detección.

[0032] El uso de cebadores de nuevo diseño es compatible con al menos los mismos índices de detección sensible de VZV, CMV, EBV y enterovirus que los de anteriores métodos de trabajo. Descritos aquí quedan también los cebadores para una amplificación y detección eficientes de HHV-7 y HHV-8.

[0033] La presente invención ofrece pares de cebadores que no constituyen meras alternativas a los cebadores actuales ya conocidos, sino que dan como resultado unos niveles de amplificación más eficientes.

[0034] Una ventaja del método según la presente invención es que la eficiencia de los cebadores de amplificación no se ve afectada de forma negativa por la presencia de pares adicionales de cebadores de amplificación:

- W1S y W1AS (para la amplificación del virus VZV), en el caso del método de amplificación de HSV-1 and HSV-2, o

- CMVS y CMVAS-21 (para la amplificación del virus CMV), EBVAS-23 y CMVS (para la amplificación del virus EBV), HER1 y HER4 (para la amplificación de enterovirus), HV7-FW y HV7-RW (para la amplificación del virus HHV-7), y HV8S y HV8AS (para la amplificación del virus HHV-8), en el caso del método de amplificación del HHV-6.

[0035] Las dificultades que presenta el diseño de PCR múltiples con éxito es una cuestión ampliamente reconocida por los expertos en la materia (véanse por ejemplo Markoulatos et al., 2000, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Vol. 14, nº5, páginas 214-219, o Shin et al., 2003, *Yonsei Medical Journal*, Vol. 44, nº 6, páginas 1001-7). Por tanto, es de reconocer que el diseño de cebadores para dichas reacciones múltiples no resulta una tarea rutinaria de emprender.

[0036] Otra ventaja de la presente invención es que la amplificación con cebadores de amplificación tal y como prevé la invención da como resultado productos de amplificación de diferentes tamaños, permitiendo así al usuario distinguir entre los diferentes virus de interés sin tener que realizar pasos adicionales, como una segunda reacción de amplificación de los productos resultantes de la primera reacción de amplificación, o la hibridación de las secuencias amplificadas con sondas de oligonucleótidos específicas.

#### **Breve descripción de los dibujos**

[0037]

- Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a fragmentos de amplificación del Ejemplo 1.
- Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a fragmentos de amplificación del Ejemplo 2.
- Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a fragmentos de amplificación obtenidos en condiciones experimentales.
- Figura 4. Lista de cebadores de amplificación.
- Figura 5. Comparación de los resultados obtenidos, con o sin biotinylación selectiva mediante cebador, y en presencia de un control interno, para HSV-1 y HSV-2. Panel A: sin biotinylación selectiva de los cebadores; Panel B: con biotinylación selectiva de los cebadores.
- Figura 6. Comparación de los resultados obtenidos, con o sin biotinylación selectiva, y en presencia de un control interno, para CMV y EBV. Panel A: sin biotinylación selectiva de los cebadores; Panel B: con biotinylación selectiva de los cebadores.
- Figura 7. Dibujo que ilustra la técnica de marcado de sondas para reducir la detección de hibridación cruzada.

#### **Descripción detallada de las realizaciones de la invención**

[0038] Definiciones. Los siguientes términos albergan los significados indicados en la especificación, a menos que se indique de forma expresa lo contrario:

- Cebadores de amplificación: ácidos nucleicos que unen y permiten la amplificación de una o más secuencias diana.
- Tubo AT: recipiente de matriz individual con forma y tamaño típicos de un recipiente de reacción de laboratorio (por ejemplo, un tubo Eppendorf de 1,5 ml) con una micromatriz o *microarray* fijada en su interior, y en el cual se pueden realizar pruebas basadas en dicha micromatriz.
- Recipiente de matriz: recipiente de reacción con base plana que comprende una micromatriz. Las moléculas de sonda de la micromatriz pueden estar impresas en un soporte sólido, el cual puede constituir el fondo de un recipiente de matriz, o un soporte sólido diferente fijado a la base de un recipiente de matriz.
- Micromatriz: distribución de sondas moleculares sobre una superficie, en la que la posición de cada sonda se hace de forma separada.
- Reacciones por PCR múltiple y RT-PCR: reacciones por PCR y RT-PCR que permiten la amplificación de dos o más secuencias de ácidos nucleicos si se hallan presentes.

- Sondas: ácido nucleico apto para unirse específicamente a una secuencia diana de ácido nucleico. Se incluyen el ADN, ARN, APN y cualquier otra forma o modificación del mismo.
- Sensibilidad de detección: número mínimo de copias detectadas. Se entenderá aquí por "sensibilidad mejorada" un número mínimo de copias detectables más bajo.
- Tira de recipientes: conjunto de recipientes de matriz, normalmente 8, cada uno con una micromatriz en su interior, en los que se pueden llevar a cabo pruebas basadas en micromatriz.
- Secuencias diana: secuencias que se desea detectar.
- Sondas diana específicas: sondas que hibridan de forma específica con secuencias diana amplificables en las reacciones de amplificación.

10 **Cebadores de amplificación originales para la detección del HSV-1 y HSV-2:**

[0039] SEQ ID N° 1 (CGCATCATCTACGGGGACACGGA) y SEQ ID N° 2 (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT) (Mencionadas en EP0789081 con los números de identificador de secuencia SEQ ID N° 4 y 9 respectivamente; véanse Figura 2 y Ejemplo 1 de EP0789081).

[0040] El producto de amplificación fue común a HSV-1 y HSV-2.

15 [0041] Para distinguirlos, se efectuó una segunda amplificación del producto de amplificación, como muestra el Ejemplo 9 de EP0789081.

**Condiciones de amplificación para la detección del HSV-1 y HSV-2 según la presente invención:**

[0042]

- Amplificación del HSV-1: Cebador de nuevo diseño de SEQ ID N° 3 HSV1S-18 (CCTTCGAACAGCTCCTGG), y de SEQ ID N° 2, el cebador HSV1AS (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT), referido como cebador SEQ ID N° 9 en EP0789081.
- Amplificación del HSV-2: Cebador de nuevo diseño de SEQ ID N° 4 HSV2S-20 (TCCATTTTCGTTTTGTGCCG), y de SEQ ID N° 2, el cebador HSV1-AS (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT), referido como cebador de SEQ ID N° 9 en EP0789081.

25 [0043] La amplificación con los nuevos pares de cebadores de amplificación da como resultado una mayor sensibilidad de detección en comparación con la amplificación con los cebadores originales, como puede observarse en la Figura 1 correspondiente al Ejemplo 1.

[0044] Asimismo, la amplificación con los cebadores HSV1S-18 y HSV1-AS es específica para el HSV-1, y produce un fragmento de 262 bp si el HSV-1 está presente en la muestra, mientras que la amplificación con los cebadores HSV2S-20 y HSV1-AS es específica para el HSV-2 y produce un fragmento de 170 bp si el HSV-2 se halla en la muestra.

[0045] Los productos de 262 y 170 bp se pueden distinguir en la electroforesis en gel de agarosa, evitando así tener que hacer otra amplificación del producto de amplificación.

**Cebadores de amplificación originales para la detección de HHV-6:**

35 [0046] SEQ ID N° 5 (GAGGTAATTTATGGTGATACGGA) y SEQ ID N° 6 (TGTCTACCAATGTATCTTTTTTTT), referidos como SEQ ID N° 7 y 12 respectivamente en EP0789081 (ver Figura 2 y Ejemplo 1 en EP0789081).

**Cebadores de amplificación para la detección de HHV-5 según la presente invención:**

[0047] Cebador de nuevo diseño HHV6A-AS (GGCGACTTGAACAGACGATC), de SEQ ID N° 7, y cebador de SEQ ID N° 5 HV6S (GAGGTAATTTATGGTGATACGGA), mencionado como SEQ ID N° 7 en EP0789081.

40 [0048] Se consigue una mejora aún mayor cuando, en la mezcla de cebadores HHV6A-AS y HV6S, el 50% de la cantidad del cebador HHV6A-AS es sustituido por el cebador de nuevo diseño HHV6B-AS (GGCGATTTGAACAAGCGATC) de SEQ ID N° 8. La razón de esta diferencia es que el cebador HHV6A-AS amplifica de forma específica el subtipo A del HHV-6, mientras que el HHV6B-AS amplifica específicamente el subtipo B del HHV-6.

45 [0049] El Ejemplo 2 y su correspondiente Figura 2 muestran la mejora de la sensibilidad obtenida con los nuevos cebadores de amplificación con respecto a la obtenida con la mezcla original de cebadores de amplificación de SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 6 (referidas en EP0789081 como SEQ ID N° 7 y SEQ ID N° 12, respectivamente).

[0050] Quedan también aquí descritas las condiciones de amplificación que permiten la amplificación de VZV, CMV, EBV y enterovirus en, al menos, los mismos índices de detección sensible que los de anteriores métodos de trabajo. Asimismo, se describen aquí los cebadores necesarios para una amplificación y detección eficientes del HHV-7 y HHV-8. Se proporcionan algunas imágenes representativas en las Figuras 1 a 3, correspondientes a los Ejemplos 1 y 2 que se muestran más abajo.

**[0051]** En una realización preferente de la presente invención, los cebadores de amplificación corresponden a los de la Figura 4.

**[0052]** Los cebadores para la amplificación de enterovirus permite la amplificación de los diferentes tipos de enterovirus: ecovirus, poliovirus y el virus de Coxsackie, si se hallan presentes en la muestra.

5 **[0053]** En un aspecto preferente, el método para detectar HSV-1, HSV-2, HHV-6, VZV, CMV, EBV, HHV-7, HHV-8 y enterovirus comprende la amplificación de material genético viral en dos reacciones independientes:

Una reacción correspondiente a HSV-1, HSV-2 y VZV (tubo 1), y otra correspondiente a HHV-6, CMV, EBV, HHV-7, HHV-8 y enterovirus (tubo 2), donde los correspondientes cebadores respectivos se incuban con la muestra de interés. En un aspecto preferente, la reacción del tubo 1 es una PCR, y la del tubo 2 una RT-PCR.

10 **[0054]** En un aspecto preferente de la presente invención, los tubos 1 y 2 comprenden los siguientes componentes:

Tubo 1:

**[0055]**

Reactivos de la PCR múltiple 1	Volumen (µl)
Muestra	5
Buffer de ADN-polimerasa 10X	5
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	2
dNTPs, 10 mM	1
HSV1S-18, 0,1µg/µl	0,8
HSV1-AS, 0,1µg/µl	1,6
HSV2S-20, 0,1µg/µl	0,8
W1S, 0,1µg/µl	0,8
W1AS, 0,1µg/µl	0,8
ADN-polimerasa	0,8
Agua libre de nucleasas	hasta un volumen final de 50 µl

15 **[0056]** En una realización preferente, el par de cebadores utilizado para la amplificación del HSV-1 se compone de HSV1S-18 y HSV1-AS; el par de cebadores para HSV-2 está formado por HSV2S-20 y HSV1-AS; y el par de cebadores para VZV es: W1S (AAGGTTATATATGGAGATACGGA), SEQ ID N° 9, y W1AS (ATTACCCCAATGTACTTTTCTT), SEQ ID N° 10. (Estos últimos cebadores corresponden, respectivamente, a los de SEQ ID N° 5 y 10 de la Figura 2 de EP0789081).

20 **[0057]** Los tamaños esperados de los correspondientes cebadores de amplificación son los siguientes:

Virus	Tamaño (bp)
HSV-1	262
HSV-2	170
VZV	193

Tubo 2:

[0058]

Reactivos de la RT-PCR múltiple 2	Volumen (µl)
Muestra	5
Buffer de RT-PCR 5x	10
dNTPs, 10 mM	2
HV6S, 0,1µg/µl	0,8
HHV6A-AS + HHV6B-AS, 0,1µg/µl (50% cada uno)	0,8
CMVS, 0,1 µg/µl	1,6
CMVAS-21, 0,1µg/µl	0,8
EBVAS-23, 0,1µg/µl	0,8
HV7-FW, 0,1µg/µl	0,8
HV7-RW, 0,1µg/µl	0,8
HV8S, 0,1µg/µl	0,7
HV8AS, 0,1µg/µl	0,7
HER1, 20 µM	0,4
HER4, 40 µM	0,2
Agua libre de nucleasas	hasta un volumen final de 50 µl

5 [0059]En un aspecto preferente, el par de cebadores utilizados para la amplificación del HHV-6 está formado por HV6S (SEQ ID N° 5, referida como SEQ ID N° 7 en la Figura 2 de EP0789081) y una mezcla de los cebadores HHV6A-AS y HHV6B-AS, con números SEQ ID N° 7 y 8 respectivamente (ver la información anterior y la Figura 4 para las secuencias correspondientes). El par de cebadores para CMV está compuesto por SEQ ID N° 11 CMVS (correspondiente a SEQ ID N° 6 de la Figura 2 en EP0789081) y SEQ ID N° 12 CMVAS-21 (Ver Figura 4). El par de cebadores para EBV es: SEQ ID N° 13 EBVAS-23 (Ver Figura 4) y SEQ ID N° 11 CMVS (correspondiente a SEQ ID N° 6 de la Figura 2 en EP0789081). Los pares de cebadores que quedan son: HV7-FW y HV7-RW para HHV-7, HV8S y HV8AS para HHV-8, y HER1 y HER4 para enterovirus (ver Figura 4).

[0060]Los tamaños esperados de los correspondientes cebadores de amplificación son:

Virus	Tamaño (bp)
HHV-6	122
CMV	106
EBV	132
HHV-7	207
HHV-8	192
Enterovirus	328

15 [0061]En un aspecto preferente, las reacciones por PCR de los Tubos 1 y 2 se efectúan en un termociclador programado con el siguiente perfil de ciclo:

1 ciclo	45°C 45 min
1 ciclo	95°C 15 min
45 ciclos	95°C 30 seg
	56°C 1 min 30 seg
	72°C 1 min
1 ciclo	72°C 10 min

Las diferencias entre los tamaños de los fragmentos permiten distinguir qué virus se halla en la muestra, sin necesidad de llevar a cabo una segunda reacción de amplificación.

5 **[0062]** Además, los valores de sensibilidad obtenidos con el método según la presente invención son, al menos, los mismos que los obtenidos con los pares de cebadores actuales (ver Ejemplos 1 y 2, así como las Figuras 1 a 3).

10 **[0063]** En otra realización preferente, uno o ambos tubos de reacción comprenden también controles internos. En una realización preferente, el protocolo de la presente invención incluye un control interno del paso de extracción de ácidos nucleicos. En otra realización preferente, el protocolo de la presente invención incluye un control interno del paso de amplificación del ácido nucleico.

**[0064]** Un control interno preferente constituiría un plásmido de ADN susceptible de amplificación mediante cebadores de amplificación RTS (GCTTGGGCGTGTCTCAAAATCT, SEQ ID N° 20) y RTA (GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT, SEQ ID N° 21). De forma preferente, el control interno sería:

Reactivos múltiples	Volumen (µl)
Control interno de ADN, 10 <sup>3</sup> copias	5
RTS 20 µM	0,5
RTA 20µM	0,5

15

**[0065]** En un volumen final de reacción de 50 µl.

**[0066]** El producto de la amplificación correspondiente al control interno de ADN es un fragmento de ADN de 885 bp.

20 **[0067]** Otros controles internos preferentes aquí descritos constituirían un fragmento de ARN que se añadiría preferentemente a la muestra de ensayo con anterioridad a la extracción del ácido nucleico. Otro control interno preferente sería un fragmento de ARN que se añadiría de forma preferente a los ácidos nucleicos con posterioridad a la extracción de la muestra de ensayo. En un aspecto de mayor preferencia, el fragmento de ARN estaría presente dentro del recipiente que contiene los reactivos de amplificación, con anterioridad a la incubación con los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra de ensayo.

25 **[0068]** En un aspecto de mayor preferencia, el fragmento de ARN podría obtenerse por transcripción del ARN de un plásmido. En otro aspecto preferente, el fragmento de ARN podría obtenerse por síntesis química.

**[0069]** Un problema inherente a las PCR múltiples constituye la presencia de varios cebadores en la misma reacción de amplificación, lo cual puede llevar a una interacción entre los cebadores presentes que podría impedir su hibridación con las secuencias diana y la correspondiente amplificación. Este impedimento técnico fue superado con la combinación específica de cebadores de amplificación de las PCR múltiples correspondientes al Tubo 1 y al Tubo 2.

30 **[0070]** En una realización preferente, los tipos de muestra que pueden procesarse mediante la presente invención son frotis, biopsias parafinadas, solución salina, plasma y líquido cefalorraquídeo.



[0071] En otra de las realizaciones preferentes, la extracción del material genético puede llevarse a cabo mediante las últimas técnicas automáticas o manuales.

5 [0072] En una realización aún más preferente, el sistema de extracción automática que puede emplearse para el aislamiento tanto de las muestras de ADN como de ARN de la presente invención es el NucliSENS easyMAG de BioMérieux (EP1694813), que utiliza partículas magnéticas en combinación con la tecnología BOOM® de BioMérieux para el aislamiento universal de ácidos nucleicos a partir de una amplia variedad de volúmenes y tipos de muestras.

[0073] El experto en la materia es conocedor de las técnicas y métodos de procesamiento manual de muestras para extraer ADN y otros ácidos nucleicos; cualquiera de estos métodos puede ser empleado.

10 [0074] En un ejemplo en concreto, los ácidos nucleicos se extraen a partir de una muestra de ensayo de 50 µl. Tras efectuar el paso de extracción, el precipitado es resuspendido en 25 µl de agua libre de RNasa.

[0075] En una realización preferente/concreta, 5 µl de los 25 µl que comprenden el material genético extraído de la muestra de ensayo son añadidos al recipiente que contiene los reactivos de amplificación, en un volumen final de 50 µl.

15 [0076] En una realización preferente de la presente invención, los productos de la PCR obtenidos con los cebadores de amplificación según la invención pueden caracterizarse aún más mediante la tecnología con micromatriz. Dicha tecnología ofrece una detección simultánea de marcadores moleculares múltiples para uso diagnóstico y proporciona los controles necesarios para asegurar la fiabilidad de los resultados.

20 [0077] En una realización preferente de la presente invención, se puede introducir un marcador al ADN amplificado durante el proceso de amplificación para permitir una detección posterior, preferiblemente un marcador que ofrezca una señal que pueda ser detectada por métodos colorimétricos. En la realización más preferente, dicho marcador es biotina. No obstante, se puede emplear cualquier otro tipo de marcador conocido en el ámbito (p. ej. digoxigenina). Se pueden utilizar marcadores radioactivos o fluoróforos en ciertas realizaciones. En una realización preferente, el marcador del ADN amplificado puede lograrse mediante la adición de nucleótidos modificados que llevan un marcador (p. ej. derivados de digoxigenina-dUTP y biotina-dUTP) a la mezcla de amplificación. En otra realización aún más preferente, el marcador está contenido en los cebadores de amplificación.

25 [0078] En una realización preferente de la presente invención, el ADN amplificado, previamente desnaturalizado, es hibridado con las secuencias diana específicas para minimizar el problema de las PCR múltiples, que consiste en la obtención de fragmentos de amplificación específicos, debido a la presencia de varios cebadores.

30 [0079] En una realización preferente, la desnaturalización del ADN amplificado puede realizarse mediante su calentamiento. Asimismo, se pueden utilizar otros procedimientos para preparar ADN monocatenario después de la amplificación, por ejemplo, haciendo uso de medios químicos.

[0080] Los cebadores de la presente invención, marcados con biotina, fueron analizados para comprobar su eficacia de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa. Se analizó el marcado tanto de uno como de ambos cebadores de cada par. Las condiciones seleccionadas fueron las siguientes:

La presencia de X indica la condición escogida.

	HSV-1	HSV-2	VZV	CMV	EBV	HHV-6	HHV-7	HHV-8	Entero
1 cebadormarcado						X			X
2 cebadores marcados	X	X	X	X	X		X	X	

35 [0081] En general, el marcado de uno o de ambos cebadores con biotina no afectó la eficacia de amplificación de los cebadores. En la mayoría de casos, se seleccionó el marcado de ambos cebadores.

40 [0082] No obstante, cuando los productos de amplificación fueron desnaturalizados e hibridados con sondas específicas de cada virus, surgieron problemas de hibridación cruzada (esto es, de la unión con sondas específicas para otro virus). Se produjo hibridación cruzada entre el producto de amplificación del HSV-1 con la sonda específica para HSV-2, y entre el producto de amplificación del EBV con la sonda específica para CMV. No fue fácil resolver este problema debido a las secuencias homólogas de los virus.

[0083] Dicho problema fue resuelto de la siguiente forma: se marcó con biotina sólo un cebador de cada par de cebadores de amplificación de los virus en los que se produce hibridación cruzada (esto es, HSV-1 o EBV). De esta

forma, no se marca la cadena de ácido nucleico de los fragmentos de amplificación que hibridan con la sonda específica para otro virus (es decir, se produce hibridación cruzada) y, por tanto, no se produce ninguna señal.

**[0084]** Así, aunque la cadena complementaria hibrida con la sonda correspondiente al otro virus, no se genera señal.

5 **[0085]** En este caso, no se marcó la cadena de HSV-1 en la que se produce hibridación cruzada con HSV-2, ni la cadena de EBV en la que se produce hibridación cruzada con CMV. En concreto, no fue marcado el HSV1S-18 para la amplificación del HSV-1, y el HSV1-AS fue marcado con biotina. Para la amplificación del EBV, no fue marcado el EBVAS-23, y el CMVS fue marcado con biotina. Los dos cebadores para la amplificación del HSV-2 (HSV1-AS y HV2S-20) y el del CMV (CMVS y CMVAS-21) se marcaron con biotina.

**[0086]** Se puede utilizar cualquier método de marcado.

10 **[0087]** En la Figura 7 se muestra un dibujo del plan marcado seguido.

**[0088]** Las condiciones adecuadas de amplificación de las reacciones de la PCR múltiple 1 y la RT-PCR múltiple 2 son las siguientes:

Reactivos de la PCR múltiple 1	Volumen (µl)
Muestra	5
Buffer de ADN-polimerasa 10X	5
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	2
dNTPs, 10 mM	1
HSV1S-18, 0,1µg/µl	0,8
B- HSV1-AS, 0,1µg/µl	1,6
B- HSV2S-20, 0,1µg/µl	0,8
B- VV1S, 0,1µg/µl	0,8
B- VV1AS, 0,1µg/µl	0,8
ADN-polimerasa	0,8
Agua libre de nucleasas	hasta un volumen final de 50 µl

Reactivos de la RT-PCR múltiple 2	Volumen (µl)
Muestra	5
Buffer de RT-PCR 5x	10
dNTPs, 10 mM	2
HV6S, 0,1µg/µl	0,8
B- HHV6A-AS + B- HHV6B-AS, 0,1µg/µl (50% cada uno)	0,8
B- CMVS, 0,1µg/µl	1,6
B- CMVAS-21, 0,1µg/µl	0,8
EBVAS-23, 0,1µg/µl	0,8
B- HV7-FW, 0,1µg/µl	0,8
B- HV7-RW, 0,1µg/µl	0,8

B- HV8S, 0,1µg/µl	0,7
B- HV8AS, 0,1µg/µl	0,7
B- HER1, 20 µM	0,4
HER4, 40 µM	0,2
Agua libre de nucleasas	hasta un volumen final de 50 µl

**[0089]** De forma preferente, una o ambas reacciones múltiples también comprende(n) un control interno de ADN, por ejemplo en forma de plásmido de ADN, así como cebadores para su amplificación. A modo de ejemplo:

Reactivos	Volumen (µl)
Control interno de ADN, 10 <sup>3</sup> copias	5
RTS 20 µM	0,5
RTA 20µM	0,5

5 **[0090]** La introducción de los componentes anteriormente mencionados en cualquiera de las reacciones múltiples no afecta el resultado obtenido.

**[0091]** La comparación de los resultados obtenidos bajo las condiciones preferentes arriba mencionadas, tanto con biotilización selectiva del cebador como sin ella, y en presencia del control interno anteriormente descrito, se muestran, para los casos de HSV-1 / HSV-2 y CMV / EBV respectivamente, en las Figuras 5 y 6.

10 **[0092]** Los fragmentos amplificados obtenidos fueron hibridados en un tubo AT con diferentes sondas selectivas correspondientes a cada virus, tal y como se indica.

15 **[0093]** En una realización preferente de la presente invención, se incuba el ADN monocatenario con una pluralidad de sondas diana específicas dispuestas en una micromatriz. Al menos una de ellas, aunque preferiblemente más de una con capacidad de hibridar con cada secuencia diana, se hallan dispuestas en la micromatriz. En ciertas realizaciones de la invención, el ADN monocatenario puede incubarse con sondas diana específicas en solución; no obstante, es preferible que las sondas se hallen sobre una superficie sólida.

20 **[0094]** En una realización preferente de la presente invención, las sondas se presentan dentro de una micromatriz, que puede colocarse en un portaobjetos o en un recipiente de reacción, lo cual pasa a denominarse recipiente de matriz. Los recipientes de matriz pueden tener diferentes formatos de presentación, entre los que se incluyen los recipientes de matriz individuales, en particular los tubos AT o sets de recipientes de matriz distribuidos en tiras o placas planas. Normalmente, las placas consisten en sets de tiras de recipientes de matriz. Por tanto, una micromatriz de la presente invención puede estar contenida en un recipiente de matriz individual. De forma alternativa, una tira de recipientes puede contener dos o más micromatrices. En una realización preferente, 8 recipientes componen la tira de recipientes. Asimismo, se pueden distribuir tres o más recipientes de matriz en un set de tiras de recipientes. En otra realización preferente, el set de tiras de recipientes constituye una placa de microtitulación.

25 **[0095]** En realizaciones preferentes, las moléculas de sonda de la micromatriz pueden estar impresas en un soporte sólido, el cual puede constituir el fondo de un recipiente de matriz o un soporte sólido distinto fijado al fondo de un recipiente de matriz. Esto significa que la superficie de la micromatriz puede ser el fondo plano del recipiente de matriz. De forma alternativa, la superficie de la micromatriz puede ser un soporte sólido fijado al fondo de un recipiente de matriz.

30 **[0096]** En una de las realizaciones de la presente invención, el recipiente de reacción presenta el tamaño típico de un recipiente de reacción de laboratorio. Los volúmenes de llenado típicos se sitúan entre los 100 µl y 2.5 ml, pero pueden ser mayores o menores en realizaciones especiales. Concretamente, el recipiente de reacción será preferiblemente un tubo AT, esto es, un recipiente de matriz con un volumen de llenado normal para un tubo Eppendorf estándar de hasta 35 1,5 ml. Otros volúmenes de llenado preferentes son aquellos con un máximo de 0,4 ml, 0,5 ml, 0,7 ml, 1,0 ml o 2,0 ml.

40 **[0097]** Debido al marcado del ADN amplificado, dondequiera que las moléculas de la muestra interactúen con moléculas sonda en la superficie de la micromatriz, un reactivo indicador se une al marcador y produce señales visibles que pueden ser detectadas por un dispositivo de detección. La sonda que interactúa y las moléculas de la muestra son identificadas por la localización de la señal en la superficie de la micromatriz. En el caso particular en que moléculas de ADN de la muestra se marcan con biotina, el reactivo indicador puede ser peroxidasa de rábano unido de forma

- covalente a estreptavidina. Esta última se une específicamente a la biotina, y la peroxidasa desencadena la precipitación de sustratos como tetrametilbencidina (TMB). Se puede utilizar otra reacción que dé como resultado un precipitado en los elementos de matriz y que pueda ser utilizado para detectar la interacción entre moléculas diana y moléculas sonda según la presente invención. Las sondas de la presente invención pueden obtenerse por diferentes métodos, tales como síntesis química (p. ej. por el método fosfodiéster convencional) o técnicas de ingeniería genética, como por ejemplo mediante la clonación molecular de plásmidos recombinantes en los que las secuencias nucleótidas correspondientes se han insertado y pueden ser después obtenidas por digestión con nucleasas.
- [0098]** Se pueden diseñar sondas específicas mediante la utilización del programa de alineamiento de ácido nucleico Oligo 6. Los parámetros de T<sub>m</sub> y el ratio de GC se analizan en todos los casos, evitándose la formación de estructura secundaria. Las sondas preferentes de la presente invención son las que tienen la misma T<sub>m</sub> sometidas a la concentración salina utilizada en el paso de hibridación. En una realización preferente, se seleccionan sondas para unirse a sus secuencias diana correspondientes en las mismas condiciones de hibridación. El experto en la materia es conocedor de otras formas en que pueden diseñarse sondas específicas.
- [0099]** En una realización concreta de la presente invención, se seleccionan las sondas de forma que no hibriden con ADN genómico, ni lo hagan de una forma no específica con fragmentos amplificados correspondientes a otros virus.
- [0100]** En una realización preferente, se presentan una o más sondas de la presente invención sobre un soporte sólido.
- [0101]** En otra realización preferente, dos o más sondas diana específicas para la misma secuencia diana se presentan sobre un soporte sólido para mejorar la detección de los agentes virales de interés.
- [0102]** En una realización preferente, las sondas de la presente invención son de 30 nt de longitud o menos.
- [0103]** Tales sondas o mezclas de sondas pueden ser inmovilizadas en una localización única del soporte sólido, preferiblemente en dos localizaciones distintas del soporte y, con mayor preferencia, en tres localizaciones distintas del soporte sólido.
- [0104]** En una realización preferente, las sondas de la invención se presentan en un soporte sólido localizado dentro de un recipiente de matriz.
- [0105]** En otra de las realizaciones, se sitúan las sondas de la presente invención en un soporte sólido contenido en una tira de recipientes de matriz o tira AS (*array strip* por sus siglas en inglés).
- [0106]** En una realización aún más preferente, la tira AS de la presente invención se compone de 8 recipientes de matriz.
- [0107]** En una realización preferente, el soporte sólido es un portaobjetos de vidrio con recubrimiento.
- [0108]** En otra realización preferente, el soporte sólido constituye el fondo de un recipiente de matriz, pudiendo ser éste un tubo AT individual o un componente de una tira de recipientes o un set de tiras de recipientes, como una placa de microtitulación.
- [0109]** En una realización preferente, las interacciones que tienen lugar entre el ADN amplificado y los pares de cebadores de la presente invención, así como las correspondientes sondas de detección, se producen en un recipiente de matriz individual, en una tira de recipientes o en un set de tiras de recipientes.
- [0110]** En una realización preferente, la visualización de dichas interacciones consta de los siguientes pasos:
- En primer lugar, se captura la imagen de la matriz con un dispositivo óptico;
  - Después, se analiza la imagen;
  - Finalmente, se obtiene un informe que ofrece una interpretación del resultado.
- [0111]** De forma preferente, se analiza la imagen por medio de un software apropiado.
- [0112]** Se puede utilizar cualquier dispositivo adecuado para este proceso.
- [0113]** En una realización concreta, las sondas para la detección específica del control interno amplificables mediante cebadores de amplificación RTS y RTA también están presentes en la micromatriz. En particular, pueden utilizarse las sondas CI 1 5'(CAGCTGGCAGACAGGTTTCCCGACTGG, SEQ ID N° 22), CI 1 3'(TTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG, SEQ ID N° 23) y CI 2 5'(CGTTCCACTGAGCGTCAGACCC, SEQ ID N° 24).

**Ejemplos**

**[0114]** Los ejemplos que se ofrecen más abajo simplemente ilustran la invención y no afectan en modo alguno el alcance de las reivindicaciones que acompañan.

5 EJEMPLO 1

**[0115]** 5 µl de la muestra objeto de análisis fueron añadidos a los reactivos de amplificación de la PCR múltiple 1, en un volumen final de reacción de 50 µl, tal y como se muestra a continuación:

Reactivos de la PCR múltiple 1	Volumen (µl)
Muestra	5
Buffer de ADN-polimerasa Taq Gold 10X	5
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	2
dNTPs, 10 mM	1
HSV1S-18, 0,1 µg/µl	0,8
HSV1-AS, 0,1µg/µl	1,6
HSV2S-20, 0,1µg/µl	0,8
VV1S, 0,1µ/µl	0,8
VV1AS, 0,1µg/µl	0,8
Control interno de ADN, 10 <sup>3</sup> copias	5
RTS 20 µM	0,5
RTA 20µM	0,5
ADN-polimerasa Taq Gold	0,8
Agua libre de nucleasas	hasta un volumen final de 50 µl

**[0116]** Las reacciones por PCR se realizaron en un termociclador programado con el siguiente perfil de ciclado:

1 ciclo	45°C 45 min
1 ciclo	95°C 15 min
45 ciclos	95°C 30 seg
	56°C 1 min 30 seg
	72°C 1 min
1 ciclo	72°C 10 min

10

**[0117]** El par de cebadores compuesto por el cebador de nuevo diseño SEQ ID N° 3 HSV1S-18 (CCTTCGAACAGCTCCTGG) y SEQ ID N° 2, HSV1-AS (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT), este último referido como cebador SEQ ID N° 9 en EP0789081, produce un fragmento de 262 bp que corresponde al HSV-1 (verFigura 1);

Además, el par de cebadores formado por el cebador de nuevo diseño de SEQ ID N° 4, HSV2S-20 (TCCATTTTCGTTTTGTGCCG) y SEQ ID N° 2, HSV1-AS (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT), este último referido como cebador SEQ ID N° 9 en EP0789081, produce un fragmento de 170 bp que corresponde al HSV-2.

5 **[0118]** De forma alternativa, en una reacción por separado, se utilizó el par de cebadores usados en EP0789081, formados por SEQ ID N° 1 (CGCATCATCTACGGGGACACGGA), referido como SEQ ID N° 4 en EP0789081, y SEQ ID N° 2 (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT), referido como SEQ ID N° 9 en EP0789081 (Figura 2 y Ejemplo 1 de EP0789081), en las mismas condiciones que las descritas más arriba, en lugar de HSV1S-18, HSV1-AS y HSV2S-20. Se utilizó un volumen de 1,8 µl de una solución de 0,1 µg/µl de cada cebador. El producto de la amplificación de estos cebadores es común a HSV-1 y HSV-2.

10 **[0119]** Los resultados comparados obtenidos a partir de los diferentes cebadores de amplificación se muestran en la Figura 1.

15 **[0120]** En ambas reacciones, el par de cebadores utilizados para la amplificación del VZV fue: SEQ ID N° 9, VV1S (AAGGTTATATATGGAGATACGGA) y SEQ ID N° 10, VV1AS (ATTACCCCAATGTACTTTTTCTT). Estos cebadores corresponden, respectivamente a los de SEQ ID N° 5 y 10 de la Figura 2 de EP0789081. El tamaño esperado del correspondiente fragmento de amplificación es 193 bp.

20 **[0121]** Como puede observarse en la Figura 1, la reacción según la presente invención da como resultado unos valores de sensibilidad mejorados para la detección del HSV-1, HSV-2 y VZV, en comparación con la reacción que se lleva a cabo utilizando los cebadores actuales. En el caso de la VZV puede deberse a la particular combinación ventajosa de los cebadores de la reacción según la presente invención. La comparación de los niveles de sensibilidad obtenidos es la siguiente:

Virus	Sensibilidad (HSV1S-18, SEQ HSV2S-20, HSV1-AS)	Sensibilidad (HSV1-AS, ID N° 4 (CGCATCATCTACGGGGACACGGA))
HSV-I	10	10 <sup>2</sup>
HSV-II	10	>10
VZV	10	>10

## EJEMPLO 2

25 **[0122]** 5 µl de la muestra objeto de análisis fueron añadidos a los reactivos de amplificación de la RT-PCR múltiple 2, en un volumen final de 50 µl, tal y como se muestra a continuación:

Reactivos de la RT-PCR múltiple 2	Volumen (µl)
Muestra	5
Buffer de RT-PCR QIAGEN One Step 5X	10
Q-solution 5x	10
HV6S, 0,1 µg/µl	0,8
HHV6A-AS + HHV6B-AS, 0,1 µg/µl (50% cada uno)	0,8
dNTPs, 10 mM	2
CMVS, 0,1µg/µl	1,6
CMVAS-21, 0,1µg/µl	0,8
EBVAS-23, 0,1µg/µl	0,8

HV7-FW, 0,1 µg/µl	0,8
HV7-RW, 0,1µg/µl	0,8
HV8S, 0,1µg/µl	0,7
HV8AS, 0,1 µg/µl	0,7
HER1, 20 µM	0,4
HER4, 40 µM	0,2
Control interno de ADN, 10 <sup>3</sup> copias	5
RTS 20 µM	0,5
RTA 20µM	0,5
Mezcla de enzimas de la RT-PCR con kit QUIAGEN OneStep RT-PCR	2
Agua libre de nucleasas	hasta un volumen final de 50 µl

**[0123]** Las condiciones de amplificación fueron las mismas que para la PCR múltiple 1.

**[0124]** De forma alternativa, se utilizó en una reacción aparte el par de cebadores descritos enEP0789081 para HHV-6, CMV, EBV y enterovirus (ver Figura 2 y Ejemplo 1 de EP0789081). La comparación de las sensibilidades correspondientes a HHV-6 se muestra en la Figura 2 más abajo. La Figura 3 ofrece más fragmentos de amplificación obtenidos en las condiciones experimentales anteriormente expuestas.

LISTA DE SECUENCIAS

**[0125]**

<110> Genomica S.A.U

10 <120> Método de detección de Herpesvirus en una muestra de ensayo

<130> WPP291211

<150> 0806041.0

<151>03-04-2008

<160> 24

15 <170>Versión PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223>Cebador de amplificación del HSV

<400> 1

23 cgcacatcatctacggggacacgga

<210> 2

25 <211> 23

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223>Cebador de amplificación del HSV  
5 <400> 2  
23 atgacgccgatgtacttttctt  
<210> 3  
<211> 18  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223>Cebador de amplificación del HSV-1  
<400> 3  
18 ccttgaaca gctcctgg  
15 <210> 4  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223>Cebador de amplificación del HSV-2  
<400> 4  
20 tccatttcg tttgtgccg  
<210> 5  
<211> 23  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223>Cebador de amplificación del HHV-6  
<400> 5  
30 23 gaggtaatttatggtgatacgga  
<210> 6  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223>Cebador de amplificación del HHV-6



ES 2 377 300 T3

<400> 6  
23     tgtctaccaatgtatctttttt  
<210> 7  
<211> 20  
5     <212> ADN  
      <213> Artificial  
      <220>  
      <223>Cebador de amplificación del HHV-6  
<400> 7  
10    20     ggcgacttga acagacgat  
      <210> 8  
      <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Artificial  
15    <220>  
      <223>Cebador de amplificación del HHV-6  
<400> 8  
      20     ggcgatttga acaagcgatc  
      <210> 9  
20    <211> 23  
      <212>ADN  
      <213> Artificial  
      <220>  
      <223>Cebador de amplificación del VZV  
25    <400> 9  
      23     aaggttat atggagatac gga  
      <210> 10  
      <211> 23  
      <212> ADN  
30    <213> Artificial  
      <220>  
      <223>Cebador de amplificación del VZV  
<400> 10  
      23     attacccaatgtacttttctt  
35    <210> 11  
      <211> 23

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223>Cebador de amplificación del CMV  
5 <400> 11  
23 cgggtcatctacggggacacgga  
<210> 12  
<211> 21  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223>Cebador de amplificación del CMV  
<400> 12  
21 aagccgtcac gtagtgccc a  
15 <210> 13  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223>Cebador de amplificación del EBV  
<400> 13  
18 caggagatg ggggccac  
<210> 14  
<211> 20  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223>Cebador de amplificación HV7-FW  
<400> 14  
30 20 aggtccaaca tgcacagtga  
<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223>Cebador de amplificación del HV7-RW

<400> 15  
 20 ggcaaagaaa atgtgggcta  
 <210> 16  
 <211> 19  
 5 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223>Cebador de amplificación del HV8S  
 <400> 16  
 10 19 ggtcatatac ggcgacact  
 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223>Cebador de amplificación HV8AS  
 <400> 17  
 21 agtacccccacgtatctctt t  
 <210> 18  
 20 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223>Cebador de amplificación HER 1  
 25 <400> 18  
 23 ctccggcccc tgaatryggc taa  
 <210> 19  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223>Cebador de amplificación HER4  
 <220>  
 <221>Característica miscelánea  
 35 <222> (19)..(19)  
 <223>n = i = inosina

<400> 19  
 23 ctgtgttgaw acytgagcnc cca  
 <210> 20  
 <211> 22  
 5 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223>Cebador de amplificación RTS  
 <400> 20  
 10 22 gcttgggcgt gtctcaaat ct  
 <210> 21  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223>Cebador de amplificación RTA  
 <400> 21  
 22 gtcgccacggtgatgagagct  
 <210> 22  
 20 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213>Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda CI 1 5'  
 25 <400> 22  
 28 cagctggcagcaggttcccgactgg  
 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 30 <213>Artificial  
 <220>  
 <223>Sonda CI 1 3'  
 <400> 23  
 23 ttgaagtgtggcctaactacgg  
 35 <210> 24  
 <211> 22

# ES 2 377 300 T3

<212> ADN

<213>Artificial

<220>

<223>Sonda Cl 2 5'

5

<400> 24

cgttccactgagcgtcagac cc 22

## REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de HSV'-1, HSV-2 y VZV que comprende la amplificación en un único tubo de una muestra que comprende material genético viral con el par de cebadores:
- 5 HSV1S-18 (CCTTCGAACAGCTCCTGG) (SEQ ID N°3) y HSV1-AS (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT) (SEQ ID N° 2);
- HSV2S-20 (TCCATTTTCGTTTTGTGCCG) (SEQ ID N° 4) y HSV1-AS (ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT) (SEQ ID N° 2); y
- 10 VV1S (AAGGTTATATATGGAGATACGGA) (SEQ ID N° 9) y VV1AS (ATTACCCCAATGTACTTTTTCTT) (SEQ ID N° 10), para obtener productos de amplificación que comprenden porciones de material genético de HSV-1, HSV-2 y VZV, si se hallan presentes.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende, además, la desnaturalización de los productos de amplificación y la hibridación de los productos con sondas diana específicas.
- 15 3. El método de las reivindicaciones 1 y 2, que comprenden:
- a) La puesta en contacto la muestra con el set de cebadores de amplificación;
- b) El sometimiento de la muestra de ensayo mezclada con el set de cebadores de amplificación a una reacción de amplificación del ácido nucleico, con el objeto de que dicha reacción de amplificación amplifique las secuencias diana presentes en la muestra;
- 20 c) La obtención de oligonucleótidos monocatenarios a partir de cualquiera de los productos de amplificación;
- d) La opción de que los oligonucleótidos monocatenarios del punto c) hibriden con una pluralidad de sondas diana específicas, y
- e) La detección de oligonucleótidos hibridados.
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cebador HSV1S-18 (SEQ ID N° 3) no está marcado y el cebador HSV1-AS (SEQ ID N° 2) sí está marcado, de forma que el producto de amplificación relevante comprenda una cadena de amplificación marcada y una cadena de amplificación sin marcar.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, que además comprende la desnaturalización de los productos de amplificación y la hibridación de los productos de amplificación con una o más sondas que pueden ser sondas diana o no diana, **caracterizado porque** la cadena marcada obtenida a partir del cebador marcado HSV1-AS (SEQ ID N° 2) puede hibridar con una sonda diana específica, y la cadena no marcada obtenida del cebador no marcado HSV1S-18. (SEQ ID N° 3) puede hibridar con la sonda nodiana (si se halla presente).
- 35 6. Un kit para la detección e identificación de HSV-1, HSV-2 y VZV en una muestra de ensayo, que comprende:
- i. Una mezcla de amplificación de ácido nucleico que comprende los pares de cebadores de amplificación HSV1S-18 (SEQ ID N° 3) y HSV1-AS (SEQ ID N° 2), HSV2S-20 (SEQ ID N° 4) y HSV1-AS (SEQ ID N° 2), y VV1S (SEQ ID N° 9) y VV1AS (SEQ ID N° 10)
- 40 ii. Un recipiente de matriz o un set de recipientes de matriz, cada uno con una micromatriz en la que se incluyen sondas diana,
- iii. Reactivos para ser utilizados en la visualización de la hibridación de ácidos nucleicos con las sondas de la micromatriz.
- 45 7. Un kit según la reivindicación 6, que comprende asimismo los reactivos para la extracción del ácido nucleico y/o su purificación.
8. El kit según las reivindicaciones 6 y 7, donde el par de cebadores constituido por HSV1S-18 y HSV1-AS comprende el cebador no marcado HSV1S-18 (SEQ ID N° 3) y el cebador marcado HSV1-AS (SEQ ID N° 2).
- 50 9. El kit de las reivindicaciones 6, 7 y 8, que además incluye, como control interno, los cebadores de amplificación RTS (GCTTGGCGTGTCTCAAAATCT) (SEQ ID N° 20) y RTA (GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT) (SEQ ID N° 21), así como un ácido nucleico susceptible de amplificación por dichos cebadores.
- 55 10. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el recipiente de matriz es un tubo AT.
11. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el set de recipientes de matriz consiste en una tira AS.

- 5
- 10
12. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde las moléculas sonda de la micromatriz son impresas en un soporte sólido, siendo éste el fondo de un recipiente dematriz.
  13. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, donde las moléculas sonda de la micromatriz son impresas en un soporte sólido, el cual se halla fijado en el fondo de un recipiente de matriz.
  14. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, donde la micromatriz comprende sondas que se unen a sus correspondientes secuencias diana en las mismas condiciones de hibridación.
  15. El uso del método según las reivindicaciones 1 a 5, o el kit según las reivindicaciones 6 a 14, para la detección e identificación, en caso de estar presentes en la muestra de ensayo, de uno o más agentes virales seleccionados del grupo formado por HSV-1, HSV-2 y VZV.

Figura 1:

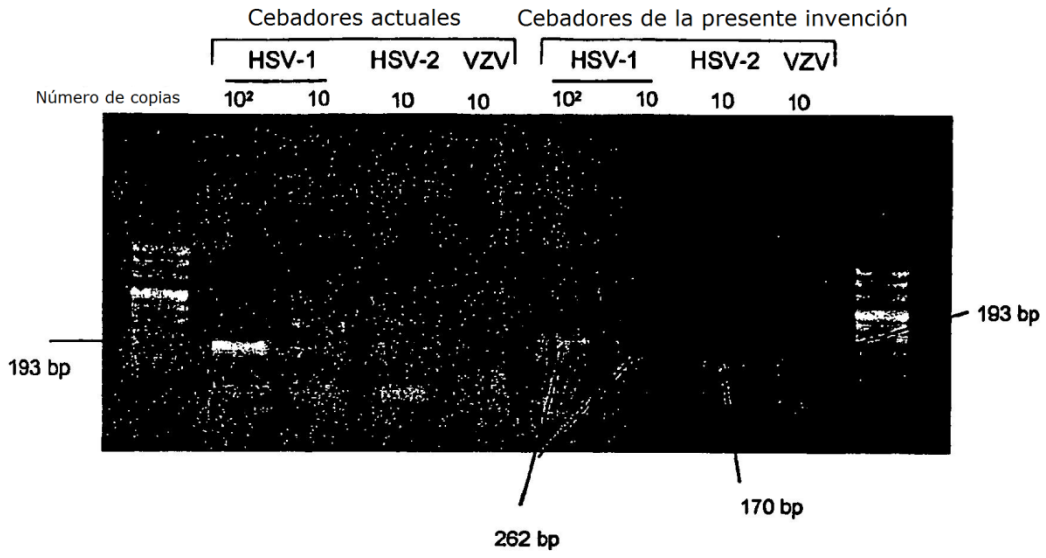




Figura 2:

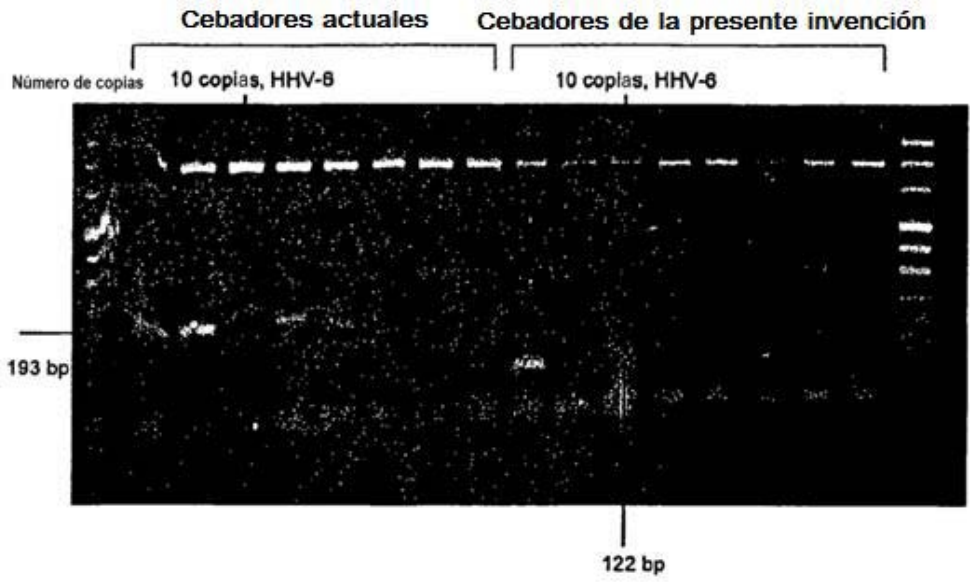
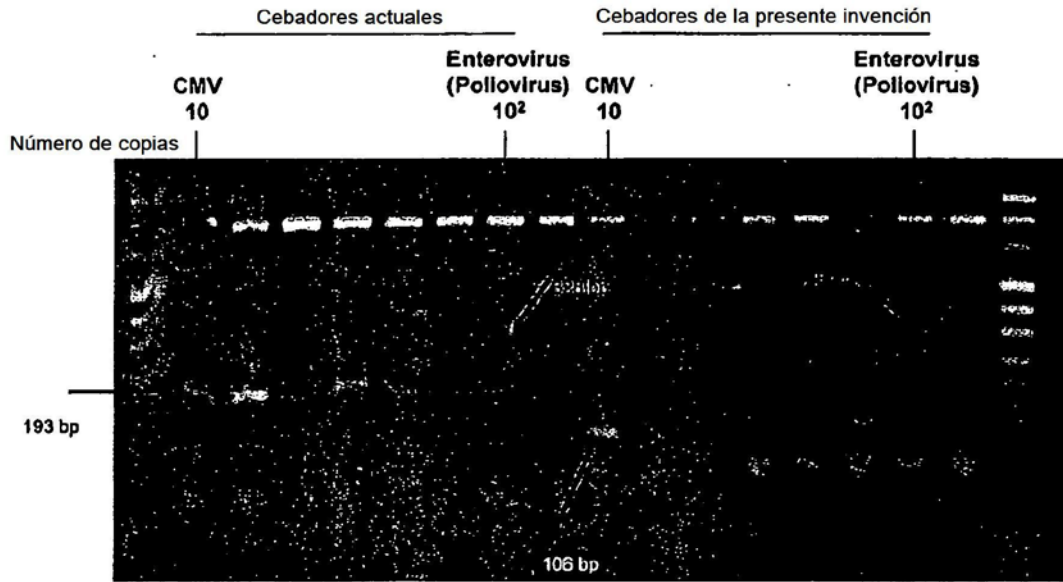


Figura 3:

A.



B.

Índices de detección de 10 copias de HHV-8 con cebadores de amplificación de la presente invención

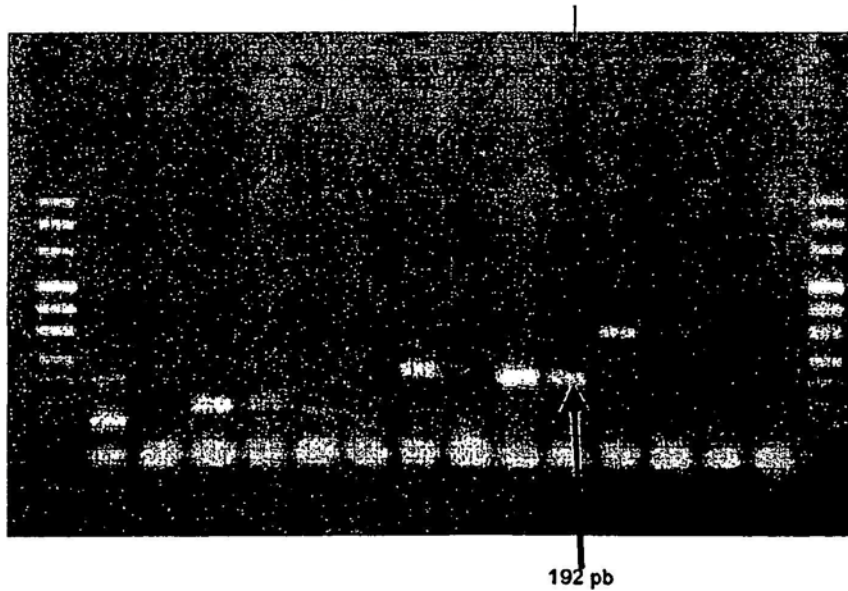


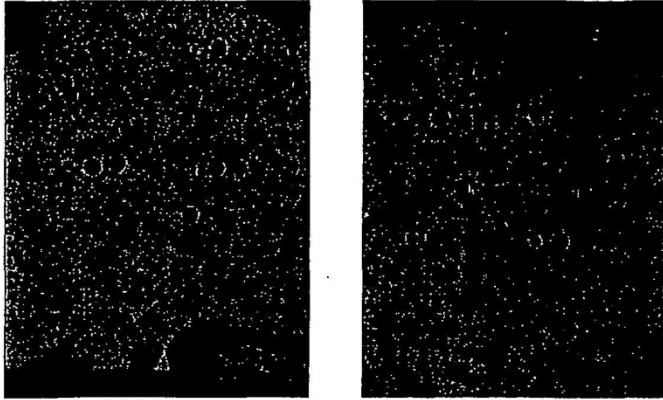
Figura 4: Lista de cebadores de amplificación

NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA (5'-3')	SEQ ID N°
HSV1-AS	ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT	2
HSV1S-18	CCTTCGAACAGCTCCTGG	3
HSV2S-20	TCCATTTTCGTTTTGTGCCG	4
HV6S	GAGGTAATTTATGGTGATACGGA	5
HHV6A-AS	GGCGACTTGAACAGACGATC	7
HHV6B-AS	GGCGATTTGAACAAGCGATC	8
VV1S	AAGGTTATATATGGAGATACGGA	9
VV1AS	ATTACCCCAATGTACTTTTTCTT	10
CMVS	CGGGTCATCTACGGGGACACGGA	11
CMVAS-21	AAGCCGTCACGTAGTGCGCCA	12
EBVAS-23	CAGGGAGATGGGGGCCAC	13
HV7-FW	AGGTCCAACATGCACAGTGA	14
HV7-RW	GGCAAAGAAAATGTGGGCTA	15
HV8S	GGTCATATACGGCGCACT	16
HV8AS	AGTACCCCCACGTATCTCTTT	17
HER1	CTCCGGCCCCTGAATRYGGCTAA	18
HER4	CTGTGTTGAWACYTGAGCICCCA	19

Los nucleótidos de las secuencias se indican con las siguientes letras: G para guanina, A para adenina, T para timina, C para citosina, I para inosina; R para G o A, Y para T o C, M para A o C, K para G o T, S para G o C, W para A o T, H para A o C o T, B para G o T o C, V para G o C o A, D para G o A o T y, por último, N para G o A o T o C.

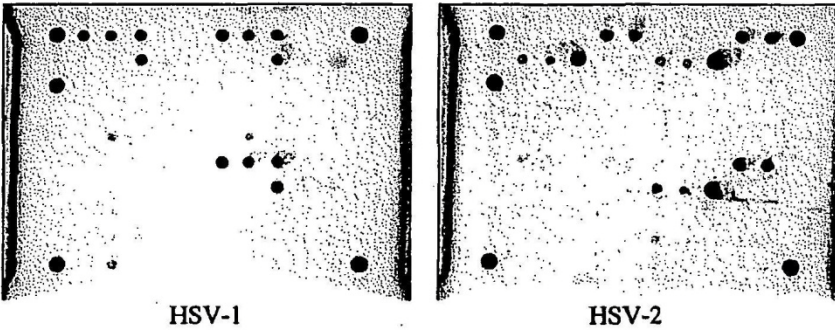
Figura 5:

A.



Sonda	Muestra positiva del HSV-1			Muestra positiva del HSV-2		
	HV1P2	HSV1P30	HSV1-S-AR	HV2P3	HSV2P30	VV1P2
Resultado: HSV-1	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Resultado: HSV-2	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

B.

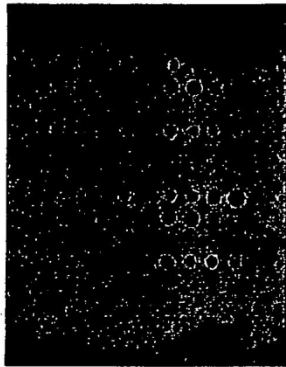


Sonda	Muestra positiva del HSV-1		Muestra positiva del HSV-2			
	H1 HV1P2	H2 HSV1SAR	H4 HV2SP3	H5 HV2AP3	H6 HSV2SP31	H7 HSV2AP31
Resultado: HSV-1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Resultado: HSV-2	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

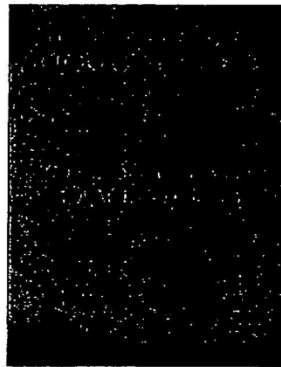
Figura 6:

A.

Sonda	Muestra positiva del <b>CMV</b>				Muestra positiva del <b>EBV</b>		
	CM1P2	CMVP30b	CMVP30	CMVP1	EV1P2	EBVP30	EBVP1
<b>CMV</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>EBV</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo



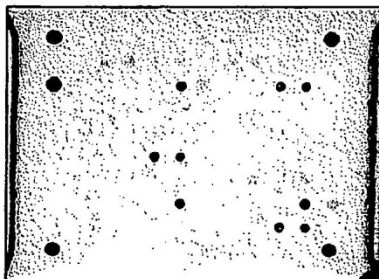
CMV



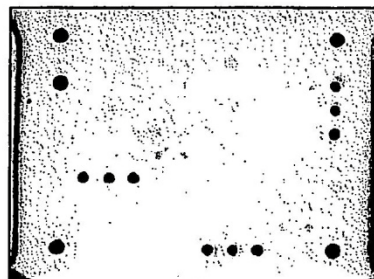
EBV

B.

Sonda	Muestra positiva del <b>CMV</b>			Muestra positiva del <b>EBV</b>		
	H14 CMVP1	H15 CM1P2	H16 CMVAP32	H17 EBVSP1	H18 EBVSP55	H19 EBVSP88
<b>CMV</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>EBV</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo



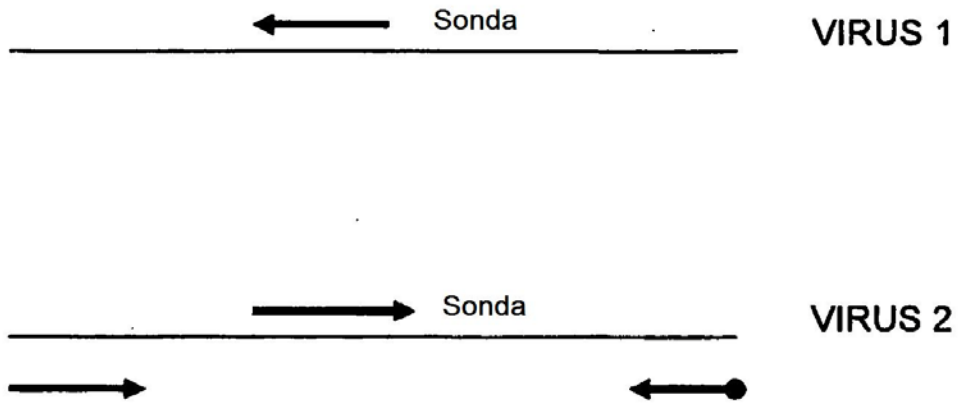
CMV



EBV

Figura 7

● Marcador de biotina.



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*La lista de referencias citadas por el solicitante se incluye únicamente para la comodidad del lector, no formando parte del documento de la patente europea. A pesar del sumo cuidado durante la recopilación de las referencias, no se pueden excluir la presencia de errores u omisiones, declinando la OEP toda responsabilidad a este respecto.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- EP 0789081 A [0006] [0011] [0012] [0039] [0041][0042] [0046] [0047] [0049] [0056] [0059] [0117][0118] [0120] [0124]
- WO 9325707 A [0009]
- WO 2004016219 A [0009] [0010]
- US 20070207453 A [0009]
- WO 2007056463 A [0013]
- US 20070141559 A [0014]
- WO 03033735 A [0016]
- WO 2007032748 A [0017]
- WO 9925867 A [0018]
- US 20050287549 A [0019]
- EP 0795612 A [0020]
- WO 01094638 A [0021]
- EP 1595960 A [0022]
- KR 060015668 [0023]
- US 2004110195 A [0026]
- EP 1694813 A [0072]

**Referencias bibliográficas no pertenecientes a patentes citadas en la descripción**

- **MARKOULATOS P et al.** Journal of Clinical LaboratoryAnalysis, 2000, vol. 14 (5), 214-219 [0013]
- **MARKOULATOS et al.** Journal of Clinical LaboratoryAnalysis, 2000, vol. 14 (5), 214-219 [0035]
- **SHIN CH et al.** Yonsei Medical Journal, 2003, vol.44 (6), 1001-7 [0013]
- **SHIN et al.** YonseiMedical Journal, 2003, vol. 44 (6), 1001-7 [0035]