

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 446**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05805278 .8**
96 Fecha de presentación: **26.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1826269**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **Método de detección del virus de la gripe aviar H5**

30 Prioridad:
01.11.2004 JP 2004318214
20.05.2005 JP 2005148487

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2012

73 Titular/es:
EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA
4-19-9, TAITO, TAITO-KU
TOKYO 110-8408, JP y
JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR
GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF
INFECTIOUS DISEASES

72 Inventor/es:
MINEKAWA, Harumi;
NOTOMI, Tsugunori;
YONEKAWA, Toshihiro;
TOMITA, Norihiro;
KUZUHARA, Yoko y
ODAGIRI, Takato

74 Agente/Representante:
Miltenyi, Peter

ES 2 382 446 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 de detección del virus de la gripe aviar H5

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores de oligonucleótido para la detección de un virus de la gripe aviar H5, a un método para la detección de un virus de la gripe aviar H5 usando el conjunto de cebadores, a un método para el diagnóstico de gripe, y a un kit para el diagnóstico de gripe.

Antecedentes de la técnica

- 10 La gripe, que es una infección respiratoria viral epidémica, afecta a personas de la amplia franja de edad desde lactantes hasta los ancianos y a menudo es mortal. Los virus de la gripe aviar H5 controvertidos actualmente que infectan pájaros no infectan originariamente a seres humanos. Sin embargo, la infección humana con los virus se confirmó en Hong Kong en 1997 y fue prevalente con el resultado de que murieron 6 de 18 pacientes. Afortunadamente, a partir de entonces no se ha confirmado ninguna infección humana. Sin embargo, se confirmó infección humana en Tailandia y Vietnam en 2004 con el resultado que murieron 8 y 16 personas en Tailandia y Vietnam, respectivamente.

- 15 Los virus de la gripe aviar altamente patógenos incluyen un subtipo H7, además del subtipo H5. Los subtipos H7 se dividen ampliamente en subtipos euroasiáticos y americanos según las secuencias de los mismos. Según los informes, los virus de la gripe aviar H7 produjeron la muerte de 1 persona cuando fueron prevalentes en los Países Bajos en 2003, y también fueron prevalentes en los EE.UU. desde 2003 hasta 2004.

- 20 Actualmente se ha usado un kit para el diagnóstico rápido de un virus de la gripe humano A en la detección de virus de la gripe aviar. Sin embargo, la identificación de un subtipo de virus que provoca infección ha requerido un análisis detallado adicional tal como el análisis antigénico o prueba genética de virus separados.

- 25 El diagnóstico usando el cultivo y la separación de virus que produce resultados precisos requiere varios días y por tanto, no puede realizarse rápidamente. Existen varios métodos que pueden proporcionar un diagnóstico rápido en comparación con la separación de virus. Entre ellos, se ha mencionado que un método de RT-PCR tiene alta sensibilidad de detección en comparación con otros métodos. Sin embargo, según algunos informes, los métodos de RT-PCR dados a conocer actualmente no pueden detectar los virus con alta sensibilidad en comparación con la infectividad viral. Por tanto, la infección con un virus de la gripe aviar no puede negarse incluso si un resultado es negativo en una prueba usando el método de RT-PCR.

- 30 Por tanto, se ha demandado un método de prueba que puede detectar rápidamente un virus de la gripe aviar H5 o H7 con alta sensibilidad.

Documento de patente 1: publicación de patente europea n.º 1310565

Documento de patente 2: traducción de PCT publicada japonesa n.º 2004-509648

Documento de patente 3: WO 02/29118 A

Documento de patente 4: EP-A-1 020 534

- 35 Documento distinto a patente 1: Lau LT., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 313, págs. 336-342 (2004)

Documento distinto a patente 2: Shan S., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 302, págs. 377-383 (2003)

Documento distinto a patente 3: Collins RA., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 300, págs. 507-515 (2003)

Documento distinto a patente 4: Lee MS., *et al.*, J. Virol. Methods, vol. 97, págs. 13-22 (2001)

- 40 Documento distinto a patente 5: Munch M., *et al.*, Arch. Virol., vol. 146, págs. 87-97 (2001)

Documento distinto a patente 6: THAI H T C *et al.*, "Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 42, n.º 5, 1 de mayo de 2004 (01-05-2004), páginas 1956-1961.

- 45 Documento distinto a patente 7: YOSHIKAWA TETSUSHI *ET AL.* "Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY; vol. 42, n.º 3, marzo de 2004 (03-2004), páginas 1348-1352.

Documento distinto a patente 8: PARIDA MANMOHAN *ET AL.*: "Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 42, n.º 1, enero de 2004 (01-2004), páginas 257-263.

Documento distinto a patente 9: NOTOMI *ET AL.* "loop-mediated isothermal amplification of DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 28, n.º 12, 1 de diciembre de 2000 (01-12-2000), páginas i-vii.

El documento de patente 3 y los documentos distintos a patente 1 y 3 se refieren a la detección de virus H5 o H7 de la gripe aviar basándose en la amplificación de una parte del gen de la hemaglutinina como el gen diana.

5 Los documentos distintos a patente 6-9 y el documento de patente 4 se refieren al método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y se dan a conocer los principios del método de LAMP (documento de patente 4 y documento distinto a patente 9) así como el uso de dicho método para la detección del coronavirus SARS (documento distinto a patente 6), del virus del herpes humano 7 (documento distinto a patente 7) y del virus del Nilo occidental (documento distinto a patente 8).

10 Descripción de la Invención

Problemas a resolver por la Invención

15 Los presentes inventores han realizado estudios concienzudos para resolver los problemas y han completado por consiguiente la presente invención descubriendo que puede detectarse un virus de la gripe aviar H5 con alta sensibilidad preparando cebadores de oligonucleótido que se hibridan con una secuencia de nucleótidos específica para el virus de la gripe aviar H5 y amplificando la secuencia de nucleótidos específica para el virus de la gripe aviar H5 mediante un método de LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle).

Medios para resolver los problemas

Específicamente, la presente invención proporciona los siguientes puntos (1) a (6):

20 (1) Un conjunto de cebadores de oligonucleótido, caracterizado por poder amplificar una secuencia de nucleótidos específica para el virus de la gripe aviar H5 y que consiste en un conjunto de cebadores internos que comprende los cebadores de oligonucleótido que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos a) y b), y, un conjunto de cebadores externos que comprende los cebadores de oligonucleótido que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos c) y d):

25 (a) 5'-(una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2)-(una secuencia de nucleótidos arbitraria que tiene de 0 a 50 bases)-(la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3)-3';

(b) 5'-(la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5)-(una secuencia de nucleótidos arbitraria que tiene de 0 a 50 bases)-(una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6)-3'.

(c) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, y

(d) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10.

30 (2) Un conjunto de cebadores de oligonucleótido según (1), en el que el conjunto de cebadores internos comprende los cebadores de oligonucleótido que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y 9.

(3) Un conjunto de cebadores de oligonucleótido según (2), que comprende además un conjunto de cebadores de bucle que comprende cebadores de oligonucleótido que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 y 12.

35 (4) Un método para la detección de un virus de la gripe aviar H5, caracterizado porque comprende realizar una reacción de amplificación de una región de ácido nucleico diana de un virus de la gripe aviar H5 mediante el uso de un conjunto de cebadores de oligonucleótido según uno cualquiera de (1) a (3), en el que la reacción de amplificación es un método de LAMP.

40 (5) Un método para el diagnóstico de gripe, caracterizado porque comprende detectar la amplificación de una región de ácido nucleico diana de un virus de la gripe aviar H5 mediante el uso de un conjunto de cebadores de oligonucleótido según uno cualquiera de (1) a (3), y diagnosticar de ese modo la presencia o ausencia de infección con el virus de la gripe aviar H5.

(6) Un kit para el diagnóstico de gripe, caracterizado porque comprende un conjunto de cebadores de oligonucleótido según uno cualquiera de (1) a (3).

45 Efecto de la invención

Según la presente invención, un virus de la gripe aviar H5 puede detectarse rápidamente con alta sensibilidad preparando cebadores de oligonucleótido que se hibridan selectivamente con una secuencia de nucleótidos específica para el virus de la gripe aviar H5 y amplificando la secuencia de nucleótidos específica para el virus de la gripe aviar H5 mediante un método de LAMP.

50

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 es un gráfico que muestra un resultado de una prueba de especificidad de conjuntos de cebadores para un virus de la gripe aviar H5. Las figuras 1 (a), 1(b), 1 (c) y 1(d) muestran los resultados obtenidos usando conjuntos de cebadores A, B, C y D, respectivamente. NC representa un control negativo, H1 representa New Caledonia, H3 representa Panama y PC representa un control positivo (ADN plasmídico del subtipo H5);

la figura 2 es un gráfico que muestra un resultado de una prueba de sensibilidad de los conjuntos de cebadores para un virus de la gripe aviar H5. Las figuras 2(a), 2(b), 2(c) y 2(d) muestran los resultados obtenidos usando los conjuntos de cebadores A, B, C y D, respectivamente. 10^3 a 10^6 representan las tasas de dilución de los extractos de ARN;

10 la figura 3 es un diagrama que muestra un resultado de la electroforesis de productos amplificados con el conjunto de cebadores para un virus de la gripe aviar H5. El carril 1 representa un marcador de tamaño molecular de 100 pb, el carril 2 representa una muestra de producto de LAMP y el carril 3 representa una muestra de producto de LAMP tratada con Ddel;

15 la figura 4 es un gráfico que muestra un resultado de una prueba de compatibilidad cruzada del conjunto de cebadores para un virus de la gripe aviar H5. B-sd representa B/Shandong/07/97, B-sh representa B/Shanghai/361/2002 y AIV-H1, etcétera representa un virus de la gripe aviar H1, etcétera.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

20 Una muestra usada en la presente invención incluye muestras derivadas de cuerpos vivos de seres humanos u otros animales que se sospecha que están infectados con un virus de la gripe, por ejemplo, esputo, líquidos de lavado broncoalveolar, secreciones nasales, aspirados nasales, líquidos de lavado nasal, exudados nasales, exudados faríngeos, gargarismos, saliva, sangre, sueros, plasmas, líquidos cefalorraquídeos, orina, heces y tejidos. Alternativamente, también pueden usarse como la muestra, células o disoluciones de cultivo de las mismas usadas en experimentos de infección o similares, o muestras que contienen virus separadas de muestras derivadas de cuerpos vivos o células cultivadas. Pueden someterse estas muestras a pretratamiento tal como separación, extracción, condensación y purificación.

30 Tal amplificación de ácido nucleico se logra mediante un método de amplificación isotérmica mediada por bucle denominado un método de LAMP desarrollado por Notomi *et al.*, que es un método de amplificación de ácido nucleico novedoso que no requiere el control de temperatura supuestamente indispensable para los métodos de PCR (documento de publicación internacional n.º WO 00/28082). Este método es un método de amplificación de ácido nucleico que permite una reacción de síntesis de hebra complementaria en condiciones isotérmicas permitiendo que un nucleótido sirva como molde para hibridarse con su propio extremo 3' e iniciar la síntesis de hebra complementaria desde este origen mientras se combinan los cebadores que se hibridan con este bucle formado. Además, el método de LAMP es un método de amplificación de ácido nucleico altamente específico que usa 4 cebadores que reconocen al menos 6 regiones.

35 Los cebadores de oligonucleótido usados en el método de LAMP son al menos 4 cebadores que reconocen las secuencias de nucleótidos de 6 regiones en total, es decir, las regiones F3c, F2c y F1c del lado del extremo 3' y las regiones B3, B2 y B1 del lado del extremo 5', de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de molde, y se denominan respectivamente cebadores internos F y B y cebadores externos F y B. Las secuencias complementarias de F1c, F2c y F3c se denominan F1, F2 y F3, respectivamente. Las secuencias complementarias de B1, B2 y B3 se denominan B1c, B2c y B3c, respectivamente. El cebador interno es un oligonucleótido que tiene, en el extremo 3', una secuencia de nucleótidos que reconoce una "determinada región de la secuencia de nucleótidos" en una secuencia de nucleótidos diana y proporciona un origen de síntesis y que tiene, en el extremo 5', una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto de reacción de síntesis de ácido nucleico obtenido con este cebador en el origen. En este contexto, un cebador que comprende una "secuencia de nucleótidos seleccionada de F2" y una "secuencia de nucleótidos seleccionada de F1c" se denomina un cebador interno F (a continuación en el presente documento, abreviado como FIP), y un cebador que comprende una "secuencia de nucleótidos seleccionada de B2" y una "secuencia de nucleótidos seleccionada de B1c" se denomina un cebador interno B (a continuación en el presente documento, abreviado como BIP). Por otro lado, el cebador externo es un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que reconoce una "determinada región de la secuencia de nucleótidos presente más cerca del lado del extremo 3' que las regiones reconocidas por los cebadores internos" en la secuencia de nucleótidos diana y proporciona un origen de síntesis. En este contexto, un cebador que comprende una "secuencia de nucleótidos seleccionada de F3" se denomina un cebador externo F (a continuación en el presente documento, abreviado como F3), y un cebador que comprende una "secuencia de nucleótidos seleccionada de B3" se denomina un cebador externo B (a continuación en el presente documento, abreviado como B3). En este contexto, F en cada cebador indica que el cebador se une de manera complementaria a la hebra sentido de la secuencia de nucleótidos diana y proporciona un origen de síntesis. Por otro lado, B en cada cebador indica que el cebador se une de manera complementaria a la hebra antisentido de la secuencia de nucleótidos diana y proporciona un origen de síntesis. En este contexto, el oligonucleótido usado como cebador tiene 10 bases o más, preferiblemente 15 bases o más, de longitud, y puede sintetizarse o bien químicamente o bien de manera natural.

Cada cebador puede ser un oligonucleótido individual o una mezcla de varios oligonucleótidos.

En el método de LAMP, pueden usarse adicionalmente cebadores adicionales, es decir, cebadores de bucle, además de los cebadores internos y externos. Los cebadores de bucle se refieren a 2 cebadores (uno para cada una de las hebras que componen una doble hebra) que comprenden, en el extremo 3', una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia en un bucle formado por la hibridación de secuencias complementarias presentes en la misma hebra de un producto de amplificación obtenido mediante el método de LAMP. El uso de los cebadores de bucle aumenta los orígenes de síntesis de ácido nucleico en número y logra una reducción en el tiempo de reacción y potenciación en la sensibilidad de detección (documento de publicación internacional n.º WO 02/24902).

Puede producirse el oligonucleótido mediante un método conocido en la técnica y, por ejemplo, puede sintetizarse químicamente. Alternativamente, se escinde un ácido nucleico natural con una enzima de restricción o similar, y los fragmentos resultantes pueden modificarse o unirse para componer una secuencia de nucleótidos deseada. Específicamente, el oligonucleótido puede sintetizarse mediante el uso de un sintetizador de oligonucleótidos o similar. Alternativamente, puede usarse un método de producción conocido por sí mismo en la técnica como método para la síntesis de un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con la sustitución, deleción, inserción o adición de una o varias bases. Por ejemplo, puede sintetizarse un oligonucleótido de este tipo usando mutagénesis específica de sitio, recombinación genética homóloga, extensión de cebadores y métodos de PCR solos o en una combinación apropiada.

Las "condiciones de hibridación rigurosas" usadas en el presente documento puede seleccionarse de aquellas conocidas generalmente. Los ejemplos de las condiciones rigurosas incluyen condiciones que implican hibridación durante la noche a 42°C en una disolución que contiene formamida al 50%, 5xSSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), disolución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10%, y ADN 20 µg/ml, seguido por lavado primario a temperatura ambiente en 2xSSC/SDS al 0,1% y posterior lavado secundario a aproximadamente 65°C en 0,1xSSC/SDS al 0,1%.

Los virus de la gripe son virus de ARN. En el método de LAMP que usa ARN como molde, puede dejarse que avance una reacción de amplificación de ácido nucleico de la misma manera que con ADN molde añadiendo transcriptasa inversa a una disolución de reacción para ADN molde (método de RT-LAMP).

Los presentes inventores han realizado estudios concienzudos sobre secuencias de nucleótidos de cebadores del método de LAMP que pueden amplificar rápidamente una secuencia de nucleótidos específica para un virus de la gripe aviar H5 y en combinaciones de los mismos y han seleccionado por consiguiente 4 conjuntos de cebadores A, B, C y D descritos a continuación a partir de la secuencia de nucleótidos de hemaglutinina del virus de la gripe aviar H5 (la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1). Estas secuencias de cebadores son totalmente diferentes de las secuencias de cebadores ya notificadas (por ejemplo, documento de patente 2) para NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico) para la detección de virus de la gripe aviar H5.

(Conjunto de cebadores A)

FIP19c: 5'-ACCATATTCCAACACTCACTTTTCATAATTTTCATTGCTCCAGAAT ATGC-3' (SEQ ID NO: 8)

BIP5 : 5'-CAAACCTCCAATGGGGGCATGGTGAGAGGGTGTAT-3' (SEQ ID NO: 9)

F3m6: 5'-GGAGTTCTTCTGGACAA-3' (SEQ ID NO: 4)

B3m : 5'-GTCGCAAGGACTAATCT-3' (SEQ ID NO: 10)

LF24: 5'-GAGTCCCCTTTCTTGACAAT-3' (SEQ ID NO: 11)

LB1: 5'-GATAAACTCTAGTATGCCA-3'(SEQ ID NO: 12)

(Conjunto de cebadores B)

FIP: 5'-GGGCATGTGTAACAGTAACGTTAAACAACCTCGACAGAGCA-3' (SEQ ID NO: 19)

BIP: 5'-TGGAAAAGACACACAATGGGAACATCCAGCTACACTACAAT C-3'(SEQ ID NO: 20)

F3: 5'-CAGATTTGCATTGGTTACCA-3' (SEQ ID NO: 15)

B3: 5'-CGTCACACATTGGGTTTC-3' (SEQ ID NO: 21)

LF: 5'-TTCCATTATTGTGTCAACC-3' (SEQ ID NO: 22)

LB8: 5'-CGATCTAGATGGAGTGAAGC-3' (SEQ ID NO: 23)

(Conjunto de cebadores C)

FIP: 5'-CACATTGGGTTTCCGAGGAGATCTAGATGGAGTGAAGCC-3' (SEQ ID NO: 30)

BIP: 5'-TTCATCAATGTGCCGGAATGGGTTGAAATCCCCTGGGTA-3' (SEQ ID NO: 31)

F3: 5'-GGAAAAGACACACAATGGG-3' (SEQ ID NO: 26)

B3: 5'-GCTCAATAGGTGTTTCAGTT-3' (SEQ ID NO: 32)

LF6: 5'-CCAGCTACTACAATCTCT-3' (SEQ ID NO: 33)

5 LB6: 5'-TCCAGCCAATGACCTCTG-3' (SEQ ID NO : 34)

(Conjunto de cebadores D)

FIP: 5'-TCGCAAGGACTAATCTGTTTGACATACACCCTCTCACCAT-3' (SEQ ID NO: 41)

BIP: 5'-TACCCCTCAAAGAGAGAGAAGATCCTCCCTCTATAAAACCTG -3'(SEQ ID NO: 42)

F3: 5'-TCTAGTATGCCATTCCACAA-3' (SEQ ID NO: 37)

10 B3: 5'-ACCATCTACCATTCCCTG-3' (SEQ ID NO: 43)

LF8: 5'-TCACATATTTGGGGCATTCC-3' (SEQ ID NO: 44)

LB8: 5'-AGAGAGGACTATTTGGAGCT-3' (SEQ ID NO: 45)

15 Una enzima usada en la síntesis de ácido nucleico no está limitada particularmente siempre que sea una enzima de síntesis de ácido nucleico dependiente de molde que tiene actividades de desplazamiento de hebra. Una enzima de este tipo incluye Bst ADN polimerasa (fragmento grande), Bca (exo-) ADN polimerasa, y el fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli* e incluye preferiblemente Bst ADN polimerasa (fragmento grande).

20 La transcriptasa inversa usada en el método de RT-LAMP no está limitada particularmente siempre que sea una enzima que tiene actividades de síntesis de ADNc con ARN como molde. Una enzima de este tipo incluye VMA, VMA clonado, transcriptasas inversas de VLMM, Superscript II, ReverTra Ace y ThermoScript e incluye preferiblemente VMA o transcriptasa inversa de VMA clonado. Alternativamente, el uso de una enzima que tiene actividades tanto de transcriptasa inversa como de ADN polimerasa, tales como Bca ADN polimerasa, puede lograr una reacción de RT-LAMP usando una enzima individual.

25 La enzima o transcriptasa inversa usada en la síntesis de ácido nucleico puede purificarse a partir de virus, bacterias o similares o puede prepararse mediante una técnica de recombinación genética. Estas enzimas pueden modificarse mediante fragmentación, sustitución de aminoácidos, etcétera.

30 Puede aplicarse una técnica conocida en la técnica a la detección de productos de amplificación de ácido nucleico tras la reacción de LAMP. Por ejemplo, pueden detectarse los productos de amplificación de ácido nucleico mediante el uso de un oligonucleótido marcado que reconoce específicamente secuencias de nucleótidos amplificadas o un método de intercalador fluorescente (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2001-242169), o puede detectarse fácilmente aplicando directamente la disolución de reacción tras completarse la reacción a electroforesis en gel de agarosa. En la electroforesis en gel de agarosa, los productos de amplificación de LAMP se detectan en forma de un marcador de tamaño molecular de muchas bandas que difieren en la longitud de base. Además, en el método de LAMP, se consumen sustratos en grandes cantidades por la síntesis de ácido nucleico, e iones de ácido pirofosfórico como subproductos se convierten en pirofosfato de magnesio a través de su reacción con iones de magnesio coexistentes y hacen que la disolución de reacción sea turbia hasta el grado que puede observarse visualmente. Por tanto, la reacción de amplificación de ácido nucleico puede detectarse confirmando esta turbidez mediante el uso de un aparato de medición que puede observar ópticamente aumentos dependientes del tiempo en la turbidez tras completarse la reacción o durante la reacción, por ejemplo, confirmando cambios en la absorbancia a 400 nm mediante el uso de un espectrofotómetro habitual (documento de publicación internacional n.º WO 01/83817).

45 Puede envasarse de antemano en un kit una variedad de reactivos necesarios para la detección de la amplificación de ácido nucleico mediante el uso de los cebadores de la presente invención. Específicamente, un kit proporcionado comprende una variedad de oligonucleótidos necesarios como cebadores de la presente invención o los cebadores de bucle, 4 dNTP que sirven como sustratos para la síntesis de ácido nucleico, ADN polimerasa para realizar la síntesis de ácido nucleico, una enzima que tiene actividades de transcripción inversa, sales o disoluciones tampón que proporcionan condiciones adecuadas para una reacción enzimática, agentes protectores para estabilizar las enzimas o los moldes y comprende opcionalmente reactivos necesarios para la detección de productos de reacción.

Ejemplos

50 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos en modo alguno.

Ejemplo 1: Confirmación de reactividad de conjuntos de cebadores para el virus de la gripe aviar H5

Se confirmó la reactividad del cebador mediante un método descrito a continuación. La composición de una disolución de reacción para la amplificación de ácido nucleico mediante un método de LAMP es tal como se describe a continuación. Se solicitó la síntesis de cebadores a QIAGEN, y se usaron los cebadores tras la purificación OPC (cartucho de columna de fase inversa).

5

Tris-HCl 20 mM pH 8,8

KCl 10 mM

MgSO₄ 8 mM

dNTP 1,4 mM

10

(NH₄)₂SO₄ 10 mM

Betáína 0,8 M (SIGMA)

Tween 20 al 0,1 %

FIP 1,6 μM

BIP 1,6 μM

15

F3 0,2 μM

B3 0,2 μM

LF 0,8 μM

LB 0,8 μM

Transcriptasa inversa de VMA 2 U (Finnzyme)

20

Bst ADN polimerasa 16 U (NEB)

Se complementó la disolución de reacción con 10⁴ copias de ADN de plásmido de H5 (HK/213/03; proporcionado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas) para realizar una reacción de RT-LAMP a 62,5°C durante 60 minutos. Se detectó la reacción en tiempo real mediante el uso de un aparato de medición de turbidez en tiempo real LA-320C (Eiken Chemical Co., Ltd.). Como resultado, se confirmó la amplificación en 4 conjuntos de cebadores (conjuntos de cebadores A, B, C y D).

25

Se sometieron adicionalmente estos 4 conjuntos a una prueba de especificidad usando, como moldes, ARN extraídos de virus cultivados New Caledonia (H1N1) y Panama (H3N2). La figura 1 es un gráfico que muestra un resultado de la prueba de especificidad. Tal como se muestra en la figura 1, no se confirmó la amplificación de los subtipos H1 y H3 cuando se usó cualquiera de los conjuntos de cebadores. Estos resultados revelaron que todos los conjuntos de cebadores son altamente específicos para el subtipo H5.

30

A continuación, se realizó una prueba de sensibilidad mediante el uso de ARN extraído de un virus cultivado Vietnam/JP1203/04 (H5N1). Debido a que no se conocía la cantidad de un molde para el ARN extraído, se diluyó de 10³ a 10⁶ veces el ARN extraído con agua esterilizada libre de ARNasa y se usó como muestra de molde. La figura 2 es un gráfico que muestra un resultado de la prueba de sensibilidad. Se confirmó incluso la amplificación en la muestra diluida 10⁵ veces cuando se usó el conjunto de cebadores A, revelando que el conjunto de cebadores A es el más altamente sensible.

35

Ejemplo 2: Confirmación de productos amplificados con el conjunto de cebadores para el virus de la gripe aviar H5

Se confirmaron los productos de LAMP amplificados con el conjunto de cebadores A mediante el uso de electroforesis y una enzima de restricción Ddel. La figura 3 es un diagrama que muestra un resultado de la electroforesis. Tal como se observa a partir del carril 2 de la figura 3, se confirmó un patrón de marcador de tamaño molecular específico para el producto de LAMP. Además, se confirmó la digestión en la muestra tratada con Ddel (carril 3). Estos resultados revelaron que la secuencia diana se amplifica específicamente.

40

Ejemplo 3: Evaluación del conjunto de cebadores para el virus de la gripe aviar H5 (prueba de compatibilidad cruzada)

Se usaron dieciocho muestras en total que incluían virus de la gripe humanos A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2), B/Shangdong/07/97 y B/Shanghai/361/2002, y virus de la gripe aviar H1 a H15 (excepto para H5). Se extrajo ARN de cada uno de los virus cultivados mediante el uso del kit de ARN viral QIAamp (QIAGEN), y se usaron extractos de 5 μl en una reacción de RT-LAMP (se usó el conjunto de cebadores A como cebadores).

45

Tal como se observa a partir de las figuras 4(a) y 4(b), no se observó amplificación en el método de RT-LAMP usando ninguna de las muestras. Estos resultados revelaron que el método de RT-LAMP es altamente específico.

Ejemplo 4: Evaluación del conjunto de cebadores para el virus de la gripe aviar H5 (prueba de sensibilidad)

5 Se usó una cepa H5 de la gripe aviar (CH/Yamaguchi 7/04) cuya infección se confirmó en la Prefectura de Yamaguchi, Japón en 2004 y una cepa H5 de la gripe aviar (VN/JP1203/04) cuya infección se confirmó en Vietnam en 2004 como muestras de molde. Se hicieron diluciones seriadas (de 10^4 a 10^8) con agua esterilizada libre de ARNasa del ARN extraído de cada uno de los virus cultivados, y se usaron diluyentes de 10 μ l y diluyentes de 5 μ l en un método de RT-PCR y un método de RT-LAMP (se usó el conjunto de cebadores A como cebadores), respectivamente.

10 Se realizó el método de RT-PCR modificando las condiciones publicadas por el sitio web del Centro de Vigilancia de Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Específicamente, se usó un kit disponible comercialmente (kit de PCR de ARN One Step de TaKaRa (VMA)) para realizar una reacción de transcripción inversa a 50°C durante 30 minutos, tratamiento a 94°C durante 2 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 45°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto, y una reacción de elongación a 72°C durante 10 minutos, seguido por almacenamiento a 4°C.

15 Los cebadores y la composición de una disolución de reacción usados en el método de RT-PCR son tal como se describen a continuación.

Cebadores (longitud del producto de PCR: 708 pb)

H5 515f: 5'-CATACCCAACAATAAAGAGG-3' (SEQ ID NO: 46)

20 H5 1220r: 5'-GTGTTTCATTTTGTAAATGAT-3' (SEQ ID NO: 47)

Disolución de reacción

10 μ l de extracto de ARN

5 μ l de tampón de PCR de ARN 10xOne Step

5 μ l de dNTP 10 mM

25 10 μ l de MgCl₂ 25 mM

1 μ l de inhibidor de ARNasa

1 μ l de RTasa de VMA

1 μ l de Taq optimizada para VMA

2 μ l de H5 515f(10 μ M)

30 2 μ l de H5 1220r (10 μ M)

Se ajustó la disolución de reacción a 50 μ l mediante la adición apropiada de agua esterilizada libre de ARNasa.

35 Los resultados de amplificación mediante los métodos de RT-PCR y de RT-LAMP se resumen en la tabla 1. En la tabla 1, las casillas del método de RT-LAMP muestran la tasa de una muestra que se confirmó que se amplificaba. La amplificación mediante RT-PCR se confirmó observando visualmente el resultado de la electroforesis (en la tabla 1, + significa que la amplificación pudo detectarse, y - significa que la amplificación no pudo detectarse).

[Tabla 1]

Muestra	Método de medición	Tasa de dilución				
		10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
CH/Yamaguchi 7/04	RT-LAMP	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
	RT-PCR	+	+	-	-	-
VN/JP1203/04	RT-LAMP	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
	RT-PCR	+	+	+	-	-

Cuando se compararon los métodos de RT-LAMP y RT-PCR, el método de RT-LAMP tuvo una sensibilidad de 10 a 100 veces mayor para cualquiera de las cepas.

40 Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, puede detectarse rápidamente un virus de la gripe aviar H5 con alta sensibilidad.

Lista de secuencias

<110> Eiken Chemical Co., Ltd.

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

<120> Detección de virus de la gripe aviar H5

5 <130> FP05-0385-00

<160> 59

<170> Patent In versión 3.1

<210> 1

<211> 1674

10 <212> ADN

<213> Virus de la gripe aviar

<400> 1

```

agt ct t gt t a aaagt gat ca gat t t gcat t ggt t accat g caaacaact c gacagagcag      60
gt t gacacaa t aat ggaaaa gaacgt t act gt t acacat g cccaagacat at t ggaaaag      120
acacacaat g ggaagct ct g cgat ct agat ggagt gaagc ct ct aat t t t gagagat t gt      180
agt gt agct g gat ggct cct cggaaacca at gt gt gacg aat t cat caa t gt gccggaa      240
t ggt ct t aca t agt ggagaa ggccagt cca gccaat gacc t ct gt t accc aggggat t t c      300
aacgact at g aagaact gaa acacct at t g agcagaat aa accat t t t ga gaaaat t cag      360
at cat ccca aaagt t ct t g gt ccaat cat gaagcct cat caggggt gag ct cagcat gt      420
ccat at ct t g ggaagt cct c ct t t t t caga aat gt ggt at ggct t at caa aaagaacagt      480
acat acccaa caat aaagag gagct at aat aat accaacc aagaagat ct t t t ggt act g      540
t gggggat t c accat cct aa t gat gcgga gagcagacaa agct ct at ca aaaccaacc      600
acct at at t t ccgt t ggaac at caacact a aaccagagat t ggt accaaa aat agct act      660
agat ccaag t aaacgggca aagt ggaaga at ggagt t ct t ct ggacaat t t t aaagccg      720
aat gat gct a t caat t t cga gagt aat gga aat t t cat t g ct ccagaat a t gcat acaaa      780
at t gt caaga aaggggact c agcaat t at g aaaagt gaat t ggaat at gg t aact gcaac      840
accaagt gt c aaact ccaat gggggcgat a aact ct agt a t gccat t cca caacat acac      900
cct ct cacca t cggggaat g ccccaaat at gt gaaat caa acagat t agt cct t gcgact      960
ggact cagaa at acccct ca aagagagaga agaagaaaa agagaggact at t t ggagct      1020
at agcaggt t t t at agaggg aggat ggcag ggaat ggt ag at ggt t ggt a t ggt accac      1080
cat agcaat g agcaggggag t ggat acgct gcagacaaag aat ccact ca aaaggcaat a      1140
gat ggagt t a ccaat aaggt caact cgat c at t gacaaaa t gaacact ca gt t t gaggcc      1200
gt t ggaaggg aat t t aat aa ct t agaaagg agaat agaaa at t t aaacaa gaagat ggaa      1260
gacggat t cc t agat gt ct g gact t at aat gct gaact t c t ggt t ct cat ggaaaaat gag      1320
agaact ct ag act t t cacga ct caaat gt c aagaacct t t acgacaaggt ccgact acag      1380
ct t agggat a at gcaaagga gct gggat aac ggct gt t t cg agt t ct at ca caaat gt gat      1440
aat gaat gt a t ggaaagt gt aaaaaacgga acgt at gact acccgagat a t t cagaagaa      1500

```

ES 2 382 446 T3

	gcaagact aa acagagagga aat aagt gga gt aaaat t gg aat caat ggg aact t accaa	1560
	at act gt caa t t t at t caac agt ggcgagt t ccct agcac t ggcaat cat ggt agct ggt	1620
	ct at ct t t at ggat gt gct c caat ggat cg t t acaat gca gaat t t gcat t t aa	1674
5	<210> 2 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 2	
10	aat t at gaaa agt gagt t gg aat at ggt	28
	<210> 3 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 3	
20	t cat t gct cc agaat at gc	19
	<210> 4 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 4	
30	ggagt t ct t c t ggacaa	17
	<210> 5 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 5	
40	caaact ccaa t gggggc	17
	<210> 6 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 6	
	at acaccct c t caccat	17
	<210> 7 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
50		

	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	7	
5		agat t agt cc t t gcgac	17
	<210>	8	
	<211>	47	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
10	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	8	
		accat at t cc aact cact t t t cat aat t t c att gct ccag aat at gc	47
15	<210>	9	
	<211>	34	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
20	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	9	
		caaaact ccaa t gggggcat g gt gagagggt gt at	34
25	<210>	10	
	<211>	17	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
30	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	10	
		gt cgcaagga ct aat ct	17
35	<210>	11	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
40	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	11	
		gagt cccct t t ct t gacaat	20
45	<210>	12	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	12	
		gat aaact ct agt at gccca	19
	<210>	13	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	

	<220> <223> cebador	
	<400> 13	
5	aacgt tact g ttacacatgc cc	22
	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 14	
	aaacaact cg acagagca	18
15	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 15	
	cagat ttgca ttggtt acca	20
25	<210> 16 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 16	
	tggaaaagac acacaat ggg aa	22
35	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 17	
	gat t gt agt g t agct ggat g	20
45	<210> 18 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 18	
	gaaaccaat gt gt gacg	18

<210> 19
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 gggcat gt gt aacagt aacg t t aaacaact cgacagagca 40
 10 <210> 20
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 20
 t ggaaaagac acacaat ggg aacat ccagc t acact acaa t c 42
 20 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 cgt cacacat t ggg t t c 18
 30 <210> 22
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 22
 t t ccat t at t gt gt caacc 19
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 23
 45 cgat ct agat ggagt gaagc 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador

	<400> 24	
	ct cct cggaa acccaat gt g	20
5	<210> 25 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 25	
	at ct agat gg agt gaagcc	19
15	<210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 26	
20	ggaaaagaca cacaat ggg	19
25	<210> 27 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 27	
30	t t caat caat g t gccggaat g g	21
	<210> 28 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 28	
	t acccagggg at t t caac	18
40	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 29	
	aact gaaaca cct at t gagc	20
50	<210> 30 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	

	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 30		
5	cacat t ggg t t ccgaggag at ct agat gg agt gaagcc		39
	<210> 31		
	<211> 39		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 31		
	t t cat caat g t gccggaat g ggt t gaaat c ccct gggt a		39
15	<210> 32		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 32		
	gct caat agg t gt t t cagt t		20
25	<210> 33		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 33		
	ccagct acac t acaat ct ct		20
35	<210> 34		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 34		
	t ccagccaat gacct ct g		18
45	<210> 35		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
50	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 35		
	t caaacagat t agt cct t gc ga		22
	<210> 36		

	<211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador <400> 36 cat acaccct ct caccat	18
10	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador <400> 37 t ct agt at gc cat t ccaca	20
20	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador <400> 38 t acccct caa agagagaga ga	22
30	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador <400> 39 caggt t t t at agaggagga	20
40	<210> 40 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador <400> 40 caggaat gg t agat ggt	18
50	<210> 41 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador <400> 41	

	t cgcaaggac t aat ct gt t t gacat acacc ct ct caccat	40
	<210> 42	
	<211> 42	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 42	
10	t acccct caa agagagagaa gat cct ccct ct at aaaacc t g	42
	<210> 43	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 43	
	accat ct acc at t ccct g	18
20	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 44	
	t cacat at t t ggggcat t cc	20
30	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 45	
	agagaggact at t t ggagct	20
40	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador RT-PCR (H5 515f)	
45	<400> 46	
	cat acccaac aat aaagagg	20
50	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador RT-PCR (H5 1220r)	

<400> 47

gtgttcat t t t gttaat gat

20

<210> 48

<211> 1737

5

<212> ADN

<213> Virus de la gripe aviar

<400> 48

agcaaaagca ggggat acaa aat gaacact caaat cct gg t at t cgct ct ggt ggcgagc 60
at t ccgacaa at gcagacaa gat ct gcct t gggcat cat g ccgt gt caaa cgggact aaa 120
gt aaacacat t aact gagag aggagt ggaa gt cgt t aat g caact gaaac ggt ggaacga 180
acaaacgt t c ccaggat ct g ct caaaaggg aaaaggacag t t gacct cgg t caat gt gga 240
ct t ct gggaa caat cact gg gccaccccaa t gt gaccaat t cct agaat t t t cggccgac 300
t t aat t at t g agaggcgaga aggaagt gat gt ct gt t at c ct gggaaat t cgt gaat gaa 360
gaagct ct ga ggcaaat t ct cagagagt ca ggcggaat t g acaaggagac aat gggat t c 420
acct acagcg gaat aagaac t aat ggaaca accagt gcat gt aggagat c aggat ct t ca 480
t t ct at gcag agat gaaat g gct cct gt ca aacacagaca at gct gct t t cccgcaaat g 540
act aagt cat acaagaacac aaggaaagac ccagct ct ga t aat at gggg gat ccacat 600
t ccggat caa ct acagaaca gaccaagct a t at gggagt g gaaacaaact gat aacagt t 660
gggagt t ct a at t accaaca gt cct t t gt a ccgagt ccag gagcgagacc acaagt gaat 720
ggccaat ct g gaagaat t ga ct t t cat t gg ct gat act aa accct aat ga cacggt cact 780
t t cagt t t ca at ggggcct t cat agct cca gaccgt gcaa gct t t ct gag aggggaagt cc 840
at gggaaat t c agagt gaagt acaggt t gat gccaat t gt g aaggagat t g ct at cat agt 900
ggagggacaa t aat aagt aa t t t gccct t t cagaacat aa at agcagggc agt aggaaaa 960
t gt ccgagat at gt t aagca agagagt ct g ct gt t ggcaa caggaat gaa gaat gt t ccc 1020
gaaat ccaa agaggaggag gagaggcct a t t t ggt gct a t agcgggt t t cat t gaaaat 1080
ggat gggaag gt t t gat t ga t gggg ggt at ggct t caggc at caaaat gc acaaggggag 1140
ggaact gct g cagat t acaa aagcacccaa t cagcaat t g at caaat aac agggaaat t a 1200
aat cggct t a t agaaaaaac t aaccaacag t t t gagt t aa t agacaacga at t cact gag 1260
gt t gaaaggc aat t ggcaa t gt gat aac t ggaccagag at t ccat gac agaagt gt gg 1320
t cct at aacg ct gaact ct t agt agcaat g gagaat cagc acacaat t ga t ct ggccgac 1380
t cagaaat ga acaact gt a cgaacgagt g aagagacaac t gagagagaa t gccgaagaa 1440
gat ggcact g gt t gct t cga aat at t t cac aagt gt gat g acgact gcat ggccagt at t 1500
agaaacaaca cct at gat ca cagcaagt ac agggaagaag caat acaaaa t agaat acag 1560
at t gaccag t caaact aag cagcggct ac aaagat gt ga t act t t ggt t t agct t cggg 1620
gcat cat gt t t cat act t ct ggccat t gca at gggcct t g t ct t cat at g t gt gaagaat 1680
10 ggaacat gc ggt gcact at t t gt at at aa gt t t ggaaaa acaccct t gt t t ct act 1737

<210> 49

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 49
 aaggt t t gat t gat gggg gg t 21
 <210> 50
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 50
 15 ct at t t ggt g ct at agcgg 19
 <210> 51
 <211> 16
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 51
 t t cccgaaat cccaaa 16
 25 <210> 52
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 52
 t t caggcat c aaaat gcaca ag 22
 35 <210> 53
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 53
 cagcaat t ga t caaat aaca gg 22
 <210> 54
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 54
 cggct t at ag aaaaaact aa cc 22

<210> 55
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 55
 accacccat c aat caaacct t ct at t t ggt gct at agcgg 40
 10
 <210> 56
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> cebador
 <400> 56
 t t caggcat c aaaat gcaca agcct g t t at t t gat caat t gct g 44
 20
 <210> 57
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador
 <400> 57
 ggt t agt t t t t t ct at aagc cg 22
 30
 <210> 58
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 35
 <400> 58
 cccat ccat t t t caat gaaa c 21
 40
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 45
 <400> 59
 act gct gcag at t acaaaag 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conjunto de cebadores de oligonucleótido, caracterizado por ser capaz de amplificar una secuencia de nucleótidos específica para el virus de la gripe aviar H5 y que consiste en un conjunto de cebadores internos que comprende los cebadores de oligonucleótido que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos a) y b), y, un conjunto de cebadores externos que comprende los cebadores de oligonucleótido que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos c) y d):
- (a) 5'-(una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2)-(una secuencia de nucleótidos arbitraria que tiene de 0 a 50 bases)-(la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3)-3';
 - 10 (b) 5'-(la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5)-(una secuencia de nucleótidos arbitraria que tiene de 0 a 50 bases)-(una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6)-3'.
 - (c) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, y
 - (d) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10.
- 15 2. Conjunto de cebadores de oligonucleótido según la reivindicación 1, en el que el conjunto de cebadores internos comprende los cebadores de oligonucleótido que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y 9.
3. Conjunto de cebadores de oligonucleótido según la reivindicación 2, que comprende además un conjunto de cebadores de bucle que comprende cebadores de oligonucleótido que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 y 12.
- 20 4. Método para la detección de un virus de la gripe aviar H5, caracterizado porque comprende realizar una reacción de amplificación de una región de ácido nucleico diana de un virus de la gripe aviar H5 mediante el uso de un conjunto de cebadores de oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la reacción de amplificación es un método de LAMP.
- 25 5. Método para el diagnóstico de gripe, caracterizado porque comprende detectar la amplificación de una región de ácido nucleico diana de un virus de la gripe aviar H5 mediante el uso de un conjunto de cebadores de oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y diagnosticar de ese modo la presencia o ausencia de infección con el virus de la gripe aviar H5.
6. Kit para el diagnóstico de gripe, caracterizado porque comprende un conjunto de cebadores de oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

Fig.1

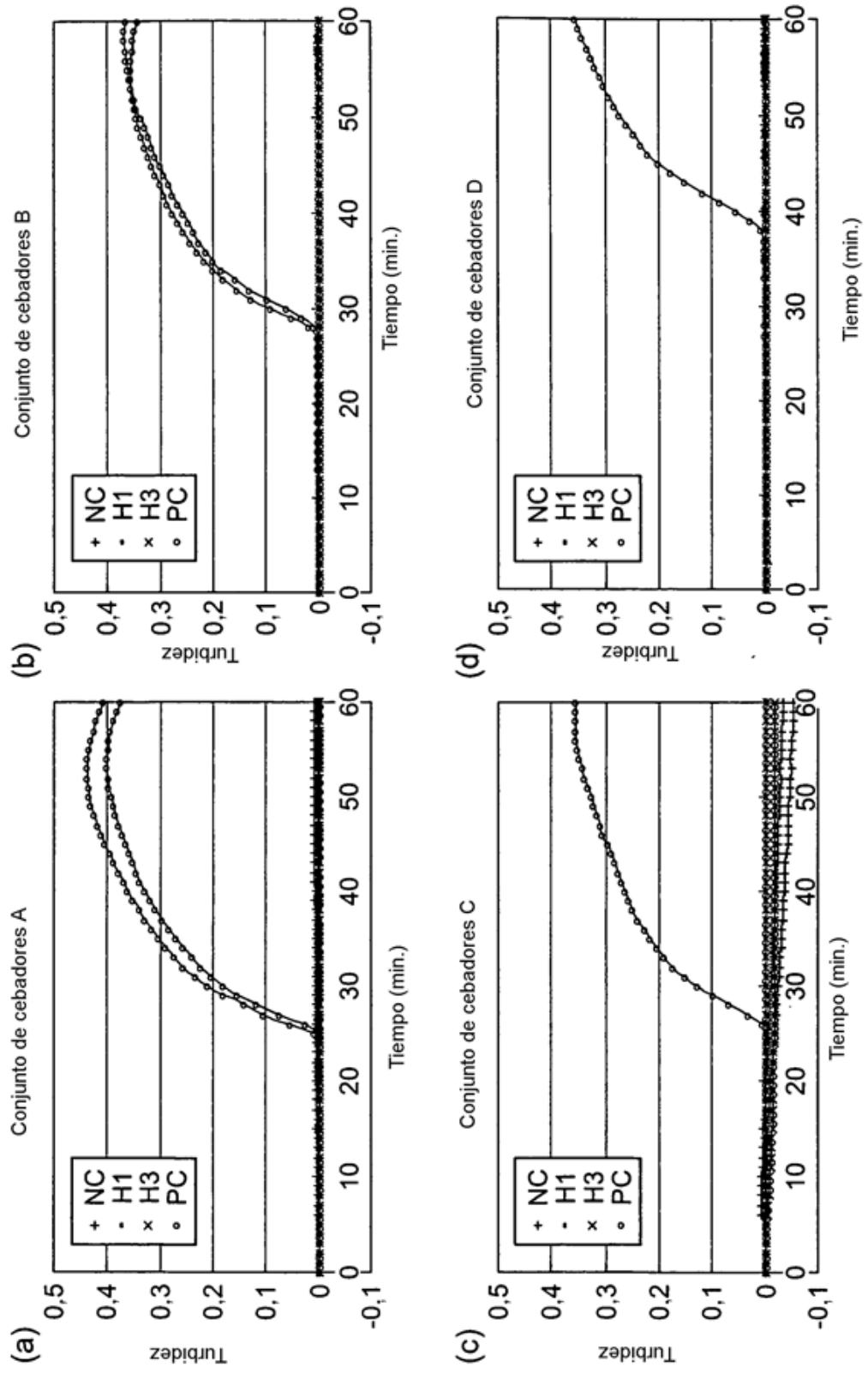


Fig.2

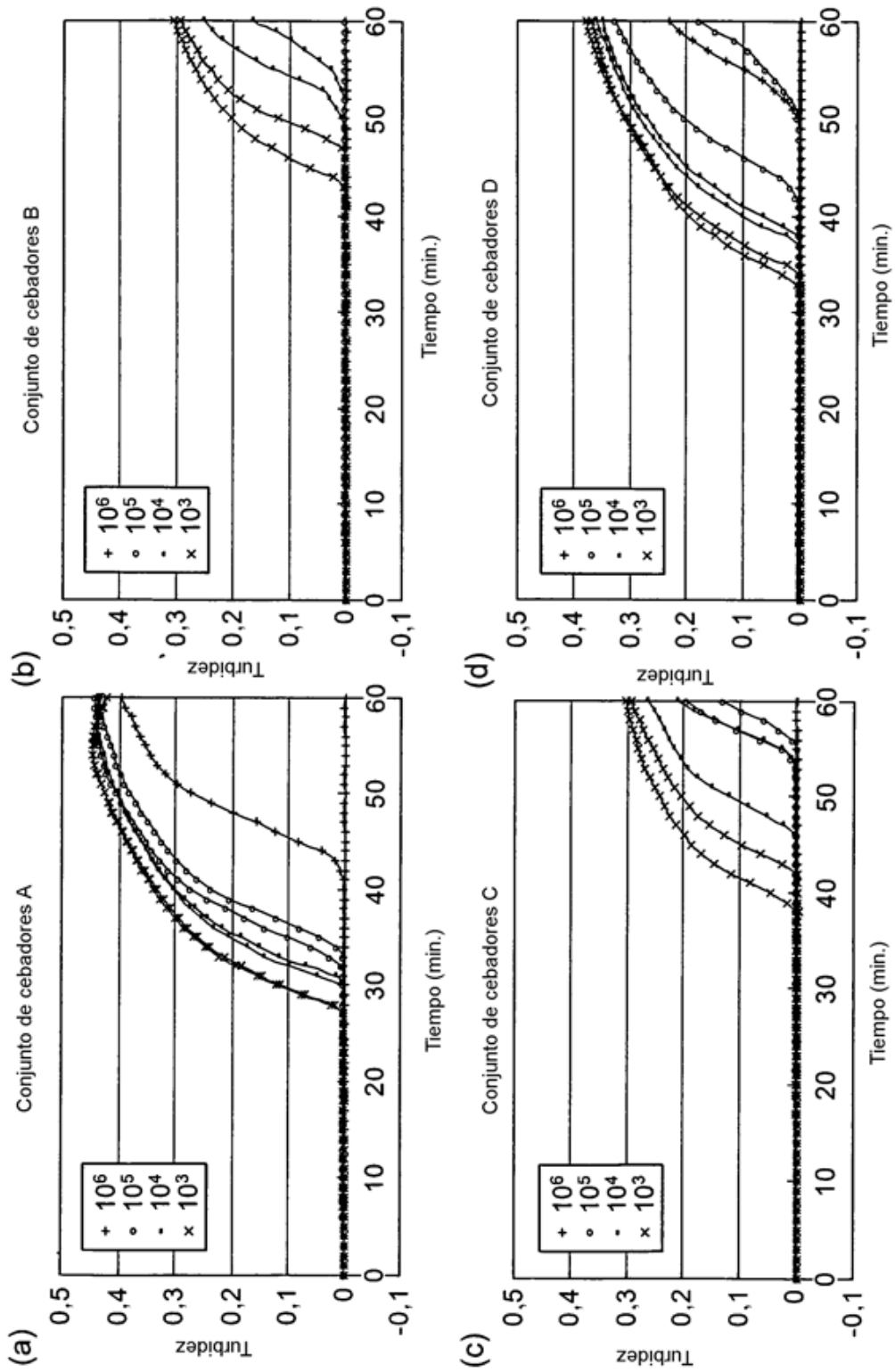


Fig.3

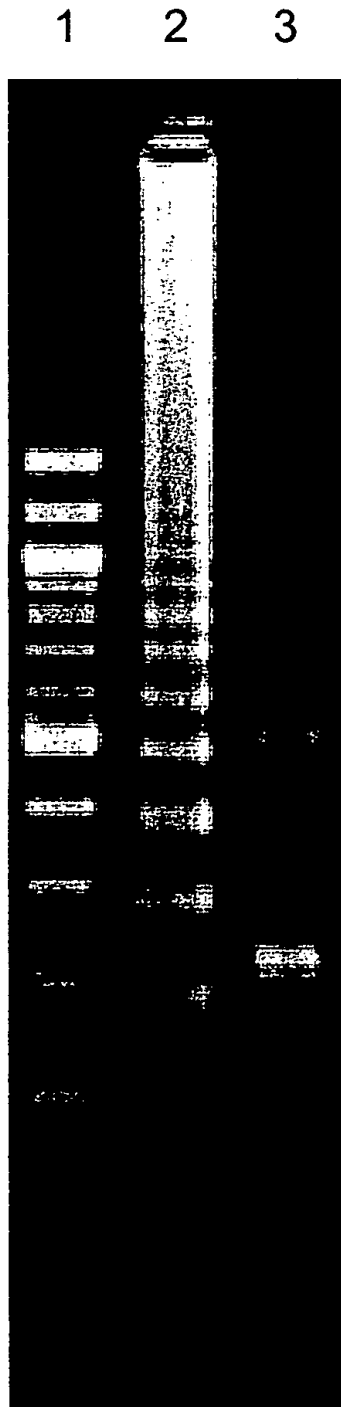
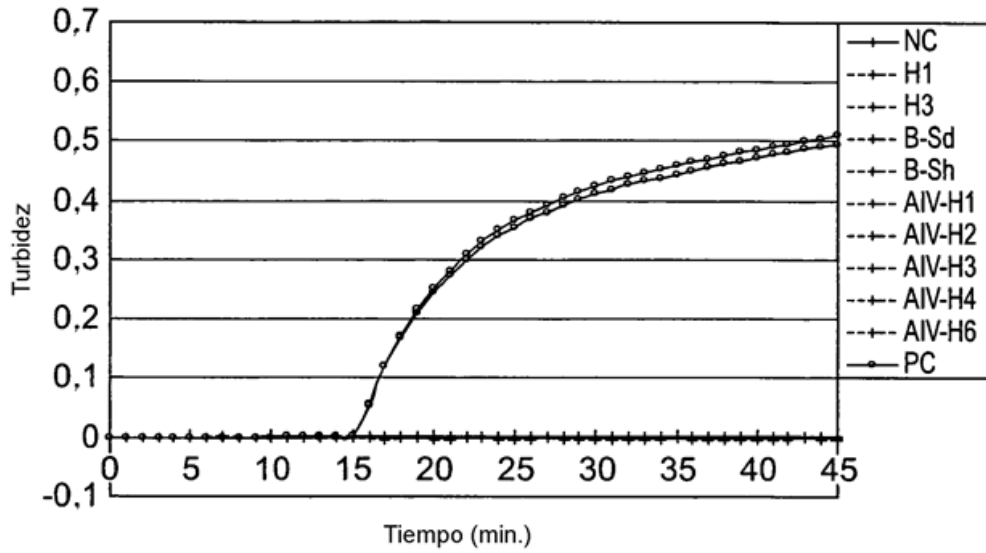


Fig.4

(a)



(b)

