(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 424 332**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09762774 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2291545**

(54) Título: **Secuencias de la gripe**

(30) Prioridad:

14.06.2008 SG 200804538

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2013

(73) Titular/es:

VEREDUS LABORATORIES PTE LTD (100.0%)
83 Science Park Drive 03-02A The Curie
Singapore Science Park 1
Singapore 118258, SG

(72) Inventor/es:

ONG, KIAN LEONG y
TAN, SOK PIN

(74) Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

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).

SECUENCIAS DE LA GRIPE

Descripción

CAMPO

[0001] La presente invención está relacionada con los campos de la medicina, biología celular, biología molecular y genética. Más específicamente, la invención hace referencia a métodos y secuencias de ácido nucleico adecuados para su uso en la detección de un patógeno o productos del mismo en una muestra.

ANTECEDENTES

[0002] La influenza o gripe es una enfermedad infecciosa frecuentemente subestimada que puede resultar en altos índices de morbilidad y mortalidad especialmente en personas mayores y pacientes de alto riesgo. Los virus de la gripe A y gripe B son los responsables del virus de la gripe original que es contraído por varios cientos de millones de personas al año en todo el mundo. Los virus de la gripe A y gripe B infectan principalmente las cavidades nasofaríngeas y orofaríngeas e inicialmente causan síntomas respiratorios generales en las personas afectadas. No es posible ni siquiera por parte de profesionales médicos con experiencia diagnosticar la gripe de forma fiable exclusivamente sobre la base de los síntomas clínicos del paciente ya que otros virus que infectan la cavidad nasal o faríngea como adenovirus, virus de la parainfluenza o virus sincitial respiratorio (virus RS, en inglés) causan síntomas similares.

[0003] La gripe A es una enfermedad infecciosa de animales causada por las cepas de tipo A del virus de la gripe que normalmente afecta a aves y, de forma menos común, a cerdos. Existen numerosos subtipos del virus de la gripe A. Estos subtipos se basan en el segmento de hemaglutinina (HA), que tiene 16 variedades (H1-H16) y segmento de neuraminidasa (NA), que tiene 9 variedades (N1-N9). La razón para el alto grado de variabilidad genética y, por ello, inmunológica, especialmente de los virus de la gripe A se debe a que puede ocurrir también un cambio genético (redistribución de los genes virales) en casos poco comunes además de la deriva genética habitual (mutación puntual). Esto se debe a que, a diferencia de otros virus, el genoma de los virus de la gripe es segmentado y que la gripe A es un patógeno tanto en seres humanos como en animales. La gripe B infecta solo a seres humanos.

[0004] Debido a la alta importancia médica de las infecciones por gripe, casi todos los países del mundo cuentan ahora con una sistema de nacional de vigilancia de la gripe. Para este programa, los médicos de cabecera recogen hisopados de la nariz y/o garganta y los envían al centro nacional de referencia respectivo. Después, los virus de la gripe A/B se detectan normalmente mediante eluido de los hisopados y posterior cultivo de las muestras de pacientes en células de mamífero como células MDCK (células de riñón canino Madine-Darby). El cultivo en estos laboratorios especiales puede llevar hasta 14 días y, por ello, no tiene una relevancia inmediata para el diagnóstico de los pacientes individuales. En su lugar, el objetivo de los centros de referencia nacionales es determinar el tipo y subtipo de los virus cultivados e informar de los resultados a la Organización Mundial de la Salud (OMS). El trabajo del fabricante de vacunas es entonces adaptar las vacunas de la gripe del año próximo a las últimas cepas virales en circulación basándose en la recomendación anual de la OMS.

[0005] Por tanto, la detección rápida y fiable de la infección por el virus de la gripe A es muy importante. Los métodos de laboratorio actuales de detección de infecciones por gripe A y B implican

comúnmente la detección de antígeno, aislamiento en cultivo celular o detección de ARN específico de la gripe mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Existe un gran problema con el uso de detección de antígeno debido a la sensibilidad de dichas pruebas. Los kits de prueba rápidos generalmente proporcionan resultados en 24 horas y son aproximadamente un 70% sensibles para detectar la gripe y aproximadamente un 90% específicos. La sensibilidad de los kits de prueba rápida significa que un porcentaje tan alto como el 30% de las muestras pueden dar falsos negativos y las pruebas no son multiplexadas. Cada una de estas técnicas de ensayo presenta ventajas y desventajas que las hacen más o menos adecuadas para su uso en laboratorios de sanidad pública o laboratorios en hospitales, pero ninguno de estos ensayos existentes se emplean actualmente en puntos de atención a pacientes: Todos se llevan a cabo en un laboratorio y normalmente los resultados no se producen lo suficientemente rápido para tener un impacto en el tratamiento prescrito. El aislamiento del virus en cultivo celular resulta laborioso y requiere tiempo.

[0006] Actualmente, como ha estipulado la Organización Mundial de la Salud, los métodos de diagnóstico recomendados para la identificación del virus de la gripe aviar A en seres humanos son el ensayo de inmunofluorescencia (IFA, en inglés), cultivo de virus y ensayos PCR. Los métodos de IFA y cultivo de virus son laboriosos y no son viables para grandes cantidades de muestras.

[0007] WO 00/17391 describe un método de RT-PCR multiplex y cebadores para determinar la presencia de microorganismos que infecten las vías respiratorias. WO 2008/042450 describe la detección multiplex de patógenos respiratorios en una muestra. US 2007/0224594 describe métodos para detectar el virus de la gripe. Wu et al. (*Journal of Virological Methods*, 148 (2008) 81-88) describe un método de RT-PCR novedoso para detectar subtipos de gripe A. WO 2008/054830 describe una matriz que tiene sondas de captura para detectar y diagnosticar la presencia de virus de la gripe.

[0008] La amenaza de una pandemia de gripe ha impulsado la necesidad de un nuevo sistema de prueba para el diagnóstico de la gripe que debería ser capaz de realizar una detección rápida y fiable de la gripe humana, con la capacidad de identificar y diferenciar gripe estacional A y B de nueva gripe A, así como de detectar nuevas cepas emergentes de gripe A.

[0009] La detección y determinación de tipo rápida, sensible y específica del virus de la gripe y la identificación de sus diversas cepas es vital para la identificación y control de una potencial pandemia humana. También se percibe una necesidad de un ensayo de la gripe informativo que pueda llevarse a cabo en el campo, es decir, en el punto de atención ("POC", en inglés).

RESUMEN

[0010] Según un primer aspecto de la presente invención, proporcionamos una combinación de ácidos nucleicos que comprenden cebadores de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16 como se muestra en la Tabla D1, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tenga al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas, para la amplificación de ácido nucleico de una secuencia del virus de la gripe, y sondas de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Tabla D2, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tenga al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas, donde las sondas se inmovilizan y son capaces de hibridar con una secuencia de virus de la gripe.

[0011] La combinación puede comprender además una o más de las secuencias de cebadores expuestas en la Tabla D3.

[0012] La combinación puede comprender además una o más de las secuencias de sonda expuestas en la Tabla D4.

[0013] Las sondas pueden inmovilizarse en forma de una matriz, como una micromatriz.

[0014] La combinación puede usarse en un dispositivo que comprende una primera cámara para la amplificación de ácido nucleico de la secuencia de virus de la gripe usando cebadores y una segunda cámara para la hibridación de ácido nucleico de la secuencia de virus de la gripe usando las sondas inmovilizadas. La primera y segunda cámara del dispositivo pueden encontrarse en conexión de fluido.

[0015] Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la detección de una secuencia de virus de la gripe en una muestra biológica y/o la determinación de la cepa de una secuencia de virus de la gripe en una muestra biológica, que comprende:

a) llevar a cabo una amplificación de ácido nucleico que comprende amplificar la secuencia de virus de la gripe para producir amplicones usando cebadores de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16 como se muestra en la Tabla D1, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas.

b) llevar a cabo una hibridación de ácido nucleico que comprende hibridar la secuencia de virus de la gripe amplificada a las sondas inmovilizadas de la SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Tabla D2, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas; y

c) detectar el enlace entre la sonda inmovilizada y la secuencia de virus de la gripe amplificada.

[0016] El paso de amplificación de ácido nucleico a) puede llevarse a cabo en una primera cámara de un dispositivo, y el paso de hibridación de ácido nucleico b) puede llevarse a cabo en una segunda cámara del dispositivo.

[0017] El método puede ser capaz de detección multiplex de dianas.

[0018] El paso de amplificación de ácido nucleico a) puede comprender además amplificar la secuencia de gripe usando una o más de las secuencias de cebadores expuestas en la Tabla D3.

[0019] El paso de hibridación de ácido nucleico b) puede comprender además hibridar la secuencia de gripe usando una o más de las secuencias de sonda expuestas en la Tabla D4.

[0020] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro de las habilidades de una persona con experiencia en la técnica. Dichas técnicas se encuentran explicadas en la literatura. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y

James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology,* Academic Press; *Using Antibodies : A Laboratory Manual: Portable Protocol* NO. I de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); *Antibodies : A Laboratory Manual* de Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1855. *Handbook of Drug Screening*, editado por Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, New York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); y Lab Ref: *A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench,* editado por Jane Roskams y Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0021]

La Figura 1 es un diagrama de fluido que ilustra un Lab-on-Chip descrito aquí. A. VereChip-Lab-on-Chip B. VereID BioSystem.

La Figura 2 es un diagrama que muestra un resumen de detección de gripe A/B con VereFlu™ Influenza A/B Detection.

La Figura 3 es una diagrama que muestra VereFlu Microarray Probe Panel (panel de sondas de micromatriz de VereFlu).

La Figura 4 es un diagrama que muestra la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz (*microarray*) para el gen HA del tipo H5/subtipo H5N1 de la gripe A.

La Figura 5 es un diagrama que muestra la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz para el gen NA del tipo H5/subtipo H5N1 de la gripe A.

La Figura 6 es un diagrama que muestra la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz para el tipo H7 de gripe A.

La Figura 7 es un diagrama que muestra la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz para el tipo H9/ subtipo H9N2 de gripe A.

La Figura 8 es una imagen de la micromatriz representativa para el virus de la gripe H5N 1 detectado por la micromatriz de VereFlu.

La Figura 9A es un diagrama que muestra la colocación de la punta en un orificio de entrada durante la carga de muestra. La Figura 9B es un diagrama que muestra un dibujo de pipeta indiciando las diferentes posiciones de parada.

La Figura 10 es una diagrama que muestra abrazaderas de sellado para PCR e IN (entrada).

La Figura 11 es un diagrama que muestra una vista desde abajo de abrazaderas IN (izquierda) y PCR (derecha).

La Figura 12 es un diagrama que muestra orificios de alineamiento para abrazaderas IN y PCR (o Hyb).

La Figura 13 es un diagrama que muestra un chip cerrado listo para ciclos térmicos de PCR.

La Figura 14 es un diagrama que muestra el llenado de la cámara de la micromatriz. Izquierda: La cámara de la micromatriz se llena a la mitad tras la carga de solo una entrada. Derecha: Cámara de la micromatriz totalmente llena.

La Figura 15 es un diagrama que muestra una abrazadera para el sellado del área de detección durante la fase de hibridación (vista inferior).

La Figura 16A es un diagrama que muestra un primer paso de sellado durante la fase de hibridación, situando la abrazadera de entrada. La Figura 16B es un diagrama que muestra un chip cerrado listo para la hibridación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0022] Como se ha señalado en la sección "Antecedentes", la creciente posible amenaza de una epidemia y/o pandemia impulsa la necesidad de una detección rápida y fiable de la gripe humana, con la posibilidad de detectar, identificar y diferenciar la gripe A y B estacionales de la nueva gripe A, así como detectar nuevas cepas de gripe A emergentes.

[0023] Describimos una secuencia de ácido nucleico como se muestra en la Tabla D1 o Tabla D2, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de la misma. La secuencia puede comprender una secuencia expuesta en la Tabla D3 o Tabla D4. También se describe una combinación de dos o más secuencias. La secuencia de ácido nucleico o la combinación puede usarse para la detección de la gripe o la distinción entre cepas de la gripe.

[0024] Los métodos y composiciones descritos aquí permiten que se lleven a cabo ensayos para la gripe sobre el terreno, es decir, en el punto de atención. Los ensayos POC compatibles con análisis de laboratorio más exhaustivos, como secuenciación de, por ejemplo, HA y NA, pueden permitir el ahorro de tiempo y dinero. Esto puede permitir también la evolución de la enfermedad viral y la genómica viral a analizar en tiempo real.

[0025] Los métodos y composiciones descritos aquí pueden proporcionar un método rápido, sensible y preciso para detectar, diferenciar e identificar diversos subtipos y cepas de un virus de la gripe A y/o B. Los métodos y composiciones descritos aquí pueden proporcionar secuencias distintivas de diversos virus de la gripe A y B que pueden ser útiles en la detección de la presencia e identificación de una cepa y/o subtipo particular de gripe. Las secuencias de ácido nucleico aquí descritas pueden usarse para detectar, por ejemplo, gripe A, gripe B y similares.

[0026] Los métodos y composiciones descritos aquí también permiten utilizar la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de infección por gripe. La PCR es ampliamente recomendada y usada debido a su alta sensibilidad y especificidad. Las pruebas de PCR se utilizan como ensayos y confirmación en la detección de H5N1. La RT-PCR se está volviendo cada vez más popular debido a su especificidad, sensibilidad y el tiempo del proceso. Mediante el uso de técnicas de RT-PCR con cebadores definidos es posible proporcionar una detección viral así como la identificación del subtipo.

[0027] Los métodos y composiciones aquí descritos pueden permitir una detección rápida y fiable de la gripe humana, con la posibilidad de identificar y diferenciar la gripe A y B estacionales de la nueva gripe A, así como detectar nuevas cepas de gripe A emergentes.

[0028] Describimos como ejemplo un sistema de pruebas que comprende una pluralidad de pares de cebadores de la PCR usados para la transcripción inversa de bajas cantidades de ARN de virus de la gripe a partir de una muestra y amplificarlos y una pluralidad de sondas para hibridar amplicones para la detección, diferenciación e identificación precisa de las cepas y subtipos de la gripe.

SECUENCIAS DE LA GRIPE

[0029] Describimos un número de secuencias de ácido nucleico. Las secuencias pueden usarse para cualquier método para el que sean adecuadas secuencias de ácido nucleico. Para simplificar, las secuencias de ácido nucleico objeto de esta revelación pueden denominarse "secuencias de la gripe".

[0030] La "secuencia de la gripe" puede comprender una secuencia correspondiente a una parte de una secuencia de ácido nucleico de la gripe, por ejemplo, un gen de la gripe. El gen de la gripe puede comprender un gen que proviene de o es de un virus de la gripe. Las "secuencias de la gripe" pueden comprender además otros residuos de ácido nucleico que no presenten tal correspondencia.

[0031] La secuencia de la gripe puede comprender una secuencia expuesta en la Tabla D1 (de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16) o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas. La secuencia de la gripe puede comprender también una secuencia expuesta en la Tabla D2 (de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 53) o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas.

[0032] La secuencia de la gripe puede comprender una secuencia expuesta en la Tabla D3. La secuencia de la gripe puede comprender una secuencia expuesta en la Tabla D4. La secuencia de la gripe puede comprender una variante, homólogo, derivado o fragmento de cualquiera de tales secuencias.

[0033] También se describen las combinaciones de cualquiera de estas secuencias. Describimos combinaciones por pares de las secuencias en la Tabla D1, por ejemplo, una combinación de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, una combinación de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, una combinación de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, una combinación de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, una combinación de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, una combinación de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, una combinación de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, una combinación de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16. También se describen combinaciones de tales combinaciones.

[0034] También describimos una combinación que comprende de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 14 y opcionalmente SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, como se muestra en la Tabla D1. Además, describimos una combinación que comprende todas las secuencias mostradas en la Tabla D1, es decir, de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16.

[0035] Describimos además combinaciones de las secuencias en la Tabla D2, por ejemplo, una combinación de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 53, como se muestra en la Tabla D2. Además, describimos una combinación que comprende todas las secuencias mostradas en la Tabla D2, es decir, de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 53.

[0036] La invención hace referencia a una combinación que comprende cebadores de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16 como se muestra en la Tabla D1, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tenga al menos un 90% de identidad de

secuencia con las mismas, para la amplificación de ácido nucleico de una secuencia del virus de la gripe, y sondas de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Tabla D2 o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas, donde la sonda está inmovilizada y es capaz de hibridar con una secuencia de virus de la gripe.

[0037] El virus de la gripe puede comprender virus de la gripe A. El virus de la gripe puede comprender un virus de la gripe humana o un virus de la gripe animal. El virus de la gripe puede comprender virus de la gripe aviar (influenza aviar).

[0038] El gen de la gripe puede incluir el gen HA (hemaglutinina) o el gen NA (neuraminidasa).

[0039] Las secuencias de la gripe descritas aquí puede ser monocatenarias o bicatenarias.

[0040] Las secuencias de la gripe descritas aquí pueden ser capaces en especial de enlazar con un gen de la gripe relevante. El gen de la gripe puede comprender ADN, ARN, ARNm, ADNc, etc., o una parte de los mismos. El gen de la gripe puede incluir el gen HA (hemaglutinina) o el gen NA (neuraminidasa), o ambos. Pueden detectarse otros genes como parte del proceso.

[0041] Las secuencias pueden usarse para detectar la presencia de ácidos nucleicos de la gripe en una muestra. Pueden usarse para detectar la presencia de virus de la gripe o productos de los mismos en una muestra. Pueden usarse para detectar la presencia de virus de la gripe de determinadas cepas en una muestra. Pueden usarse para distinguir entre estas cepas.

Tamaño de ácidos nucleicos

[0042] El tamaño de las secuencias de ácido nucleico de la gripe, incluyendo cebadores y sondas, puede variar, como se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica, en general, variando de 5 a 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 10 y 100, como 15 y 50 y de 10 a 35, dependiendo de la técnica amplificación y uso. Según la invención, las secuencias de ácido nucleico de la gripe son al menos de 20 nucleótidos de longitud.

[0043] Generalmente, la secuencia, por ejemplo la sonda o cebador, puede incluir una secuencia específica del patógeno diana suficiente para conferir la amplificación o hibridación específica al ADN de la gripe respectivo. Las secuencias de ácido nucleico reveladas aquí pueden comprender además otros componentes, como secuencias adaptadoras. Cuando esté presente, la secuencia adaptadora puede oscilar, por ejemplo, de 15-25 nucleótidos de longitud, por ejemplo 20. La parte específica de diana de la secuencia puede ser de 15-50 nucleótidos de longitud. Además, la secuencia puede incluir uno o más sitios de cebado de la amplificación adicionales.

Diseño de la sonda

[0044] Para el diseño de la sonda, las secuencias de diferentes cepas de cada subtipo pueden extraerse de bases de datos establecidas como NCBI y evaluar los sitios de sonda potenciales con los siguientes parámetros;

i. Secuencias únicas que pueden diferenciar entre diferentes cepas de gripe

ii. Condiciones de hibridación de micromatriz predeterminadas

iii. Temperatura de fusión de la sonda

iv. Potencial de formación de horquillas

v. Longitud de sonda

vi. Energía libre de enlace

[0045] Una buena sonda debería presentar una hibridación máxima con su diana, hibridación cruzada mínima con los que no son diana y una buena fluorescencia con, por ejemplo, mediana de la señal/mediana del fondo > 3 * max (mediana de la señal/mediana del fondo) de Controles Negativos.

[0046] La longitud de sonda de 25-mer (unidades) puede usarse para lograr un equilibrio entre especificidad y tolerancia de errores de apareamiento entre diferentes cepas del mismo subtipo. Las sondas potenciales pueden localizarse en la micromatriz y probarse de nuevo. Las sondas que no funcionan o presentan hibridación cruzada pueden extraerse y rediseñarse. Cuando sea factible, se seleccionan las sondas que abarcan el principio, mitad y final de los fragmentos de PCR diana. Esto se hace para asegurar que incluso si se produce mutación en una región del fragmento objetivo, todavía podemos detectar el virus a partir de las dos regiones restantes.

[0047] En casos en los que las sondas generadas mediante el *software* no funcionan, las sondas pueden diseñarse manualmente. Las sondas diseñadas manualmente pueden someterse a y evaluarse con los mismos parámetros por el *software*. Sin embargo, pueden ser necesarias ciertas transigencias en los parámetros en casos especiales. A continuación, las sondas pueden reconocerse y analizarse de nuevo. El proceso puede repetirse hasta que se encuentre el número de sondas exigido y se cumplan sus especificaciones requeridas.

[0048] Las secuencias de las diferentes cepas de cada subtipo pueden alinearse y pueden identificarse sitios de sonda potenciales para cada subtipo. Pueden usarse regiones flanqueantes de sitios de aproximadamente 150-300 bp y que contengan el mayor número de sitios de sonda potenciales para diseñar los cebadores. Una vez se diseñan grupos de cebadores de cada subtipo, pueden probarse con todos los otros controles de subtipo para activación cruzada o "*cross-priming*" en una condición multiplexante. Cualquier cebador que presente tendencia a la activación cruzada debe rediseñarse y puede repetirse hasta que se solucione el problema de activación cruzada. Puede llevarse a cabo el mismo conjunto paralelo de experimentos en un termociclador y visualizar los resultados en equipo adecuado como un Agilent Bioanalizer para verificar los resultados del LOC (Lab-on-Chip).

Inmovilización

[0049] Las secuencias de gripe pueden inmovilizarse, por ejemplo, al enlazar a un sustrato. En un modo de realización de los métodos y composiciones aquí descritos, puede hacerse uso de matrices en la detección de los productos amplificados descritos anteriormente.

[0050] Con "sustrato" o "soporte sólido" u otros equivalentes gramaticales nos referimos a cualquier material en el que se pueda inmovilizar una sonda de captura. Como se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica, el número de sustratos posibles es muy alto. Los sustratos posibles incluyen, sin carácter limitativo, vidrio y vidrio funcionalizado o modificado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, TeflonJ, etc.), polisacáridos, nylon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales basados en sílice incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos y una variedad de otros polímeros. En general, los sustratos permiten la detección óptica y no emiten fluorescencia por sí mismos de forma apreciable.

[0051] Generalmente, el sustrato es plano, aunque como apreciarán aquellos con experiencia en la técnica, pueden usarse también otras configuraciones de sustratos.

[0052] El sustrato puede comprender una base de silicio. Las secuencias de gripe pueden proporcionarse en una conformación espaciada, por ejemplo, una conformación espacial regular, por ejemplo, en forma de una matriz. La matriz puede comprender una micromatriz. Los métodos de producción de matrices de ácido nucleico son conocidos en la técnica.

[0053] La matriz puede comprender las secuencias de gripe expuestas en la Tabla D2. La matriz puede comprender una o más secuencias de control.

Muestra

[0054] Los métodos y composiciones descritos aquí pueden usarse para detectar virus o secuencias de la gripe en una muestra. La muestra puede comprender una muestra biológica. La muestra puede tomarse de un sujeto, que puede ser un ser humano o un animal.

[0055] La muestra puede comprender cualquier número de cosas, incluyendo, sin carácter limitativo, fluidos corporales (incluyendo, sin carácter limitativo, sangre, secreciones nasofaríngeas, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, sudor y semen, de casi cualquier organismo, por ejemplo, muestras de mamíferos, muestras ambientales (incluyendo, sin carácter limitativo, muestras de aire, agrícolas, agua y tierra); muestras de agentes de guerra biológica; muestras de investigación; muestras purificadas, como proteínas, ARN, ADN genómico purificado, etc.; muestras en bruto (bacterias, virus, ADN genómico, etc.). Como apreciarán aquellos expertos en la técnica, no puede haberse realizado casi ninguna o ninguna manipulación experimental en la muestra.

[0056] Las secuencias de ácido nucleico aquí descritas pueden usarse, por ejemplo, en una prueba de diagnóstico molecular para gripe. Dicha prueba puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, protocolos de extracción de ARN estándares, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), etc.

Amplificación de ácido nucleico

[0057] Como se define en mayor detalle a continuación, puede hacerse que las sondas hibriden con secuencias diana como amplicones para determinar la presencia o ausencia de la secuencia diana en una muestra. También puede hacerse que los cebadores amplifiquen secuencias diana para determinar la presencia o ausencia de la secuencia diana en una muestra.

[0058] Por tanto, las secuencias de la gripe pueden usarse como cebadores de ácido nucleico. Los cebadores pueden comprender las secuencias de la gripe expuestas en la Tabla D1. Pueden comprender además una o más secuencias de la gripe expuestas en la Tabla D3.

[0059] Puede amplificarse una secuencia diana de una muestra para producir una segunda diana, p.ej., el amplicón, que puede detectarse mediante métodos descritos en este documento. La secuencia diana puede presentar cualquier longitud, entendiéndose que las secuencias más largas son más específicas. La secuencia diana complementaria también puede tomar una variedad de formas. Por ejemplo, puede estar contenida en una secuencia mayor de ácido nucleico, p.ej., todo o parte de un gen o ARNm, un fragmento de restricción de un ADN genómico o plasmídico, entre otros.

[0060] La reacción de amplificación puede comprender el enlace entre la secuencia de gripe y una diana. Un ácido nucleico cebador puede entrar en contacto con la secuencia diana para formar un

complejo de hibridación. Después, el cebador puede usarse para amplificar la secuencia diana, como se describe en mayor detalle a continuación. Con "ácido nucleico cebador" se hace referencia a un ácido nucleico sonda que hibridará con alguna parte, es decir, un dominio, de la secuencia diana.

[0061] Los cebadores pueden usarse para la amplificación de ácidos nucleicos por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Como otro ejemplo, puede usarse RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa). También pueden usarse otros métodos de amplificación, por ejemplo, LCR (reacción en cadena de la ligasa), dePCR (reacción en cadena de la polimerasa digital), PCR larga (Long PCR), PCR de punto final cuantitativa, PCR en tiempo real cuantitativa, amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE), TMA, NASBA, etc. Estos métodos son conocidos en la técnica, y los métodos para emplear las secuencias de gripe a usar en tales métodos serán evidentes para el lector experto.

[0062] Las secuencias de la gripe de la invención se proporcionan como combinaciones. Por ejemplo, describimos una combinación de dos o más secuencias cualesquiera expuestas en la Tabla D1. La combinación puede comprender dos secuencias, correspondientes a un cebador directo y un cebador inverso, como se expone en la Tabla D1. La combinación de dos secuencias puede incluir un cebador directo para un gen concreto y un cebador inverso para ese gen. También se proporcionan combinaciones de dichas combinaciones por pares.

Hibridación de ácido nucleico y detección

[0063] Los amplicones amplificados puede detectarse usando sondas que comprenden secuencias de ácido nucleico aquí descritas. Por tanto, las secuencias de la gripe pueden usarse como sondas. Las sondas pueden comprender las secuencias de gripe expuestas en la Tabla D2. Pueden comprender además una o más secuencias de la gripe expuestas en la Tabla D4.

[0064] Para este fin, las secuencias de ácido nucleico aquí descritas, incluyendo las sondas, pueden diseñarse para ser complementarias a una secuencia diana. Esto puede comprender bien la secuencia diana de la muestra o a otras secuencias sonda, como se describe a continuación, de forma que la hibridación de la secuencia diana y las sondas pueda producirse. Como se describe a continuación, no es necesario que esta complementariedad sea perfecta; puede haber cualquier número de apareamientos erróneos de pares de bases que interferirá en la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios como se describe aquí. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan elevado que no se produce hibridación ni siquiera en las condiciones de hibridación menos rigurosas, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. Por ello, con "sustancialmente complementaria" hacemos referencia aquí a que las sondas son lo suficientemente complementarias para que las secuencias diana hibriden en condiciones de reacción normales.

[0065] Las secuencias de ácido nucleico de gripe descritas en este documento pueden usarse en solución para la hibridación de ácido nucleico convencional. La hibridación puede llevarse a cabo en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de hibridación no rigurosas. Un ejemplo de una condición de hibridación rigurosa son 65ºC y 0,1 X SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na3 Citrato pH 7,0). Otro ejemplo de una condición de hibridación son 48mM tampón fosfato, 1742,4 mM NaCl, 0,24% Tween 20, 4,8X solución de Denhardt, 2,4 nM sonda o sondas (p.ej., 3 sondas) - el tampón fosfato comprende 12,96 mM KCl y 657,6 mM NaCl.

[0066] Pueden usarse una variedad de condiciones de hibridación en los métodos y composiciones

aquí descritos, incluyendo condiciones de rigurosidad alta, moderada y baja. Las condiciones de rigurosidad son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. La hibridación puede realizarse a una temperatura predeterminada durante 30 min usando solución amortiguadora de fosfato, NaCl, KCl, Tween 20 y solución de Denhardt.

[0067] Los métodos de uso de tales sondas de secuencias de ácido nucleico para la detección de secuencias de ácido nucleico diana son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Maniatis *et al*.

[0068] Las sondas pueden marcarse para fines de amplificación o detección o ambos. El marcado puede comprender cualquier entidad productora de señal.

[0069] Un marcador puede comprender, por ejemplo, un producto químico, fracción o molécula que permite la detección del marcador junto con cualquier molécula, superficie o material al que el marcador se aplique, se una, se acople, con la que hibride o se enlace. Los ejemplos de marcadores incluyen tintes, marcadores radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores magnéticos y marcadores enzimáticos.

[0070] El marcador puede comprender en concreto un marcador radioactivo, como ^{32}P. El marcador puede comprender un marcador no radioactivo como digoxigenina. La señal puede ser detectada por cualquier medio adecuado conocido en la técnica.

[0071] La hibridación puede llevarse a cabo con secuencias de la gripe en solución o inmovilizadas, por ejemplo, donde se emplea una matriz de secuencias sonda.

Chips de dos cámaras

[0072] En algunos modos de realización de los métodos y composiciones descritos aquí, puede usarse un sistema de dos cámaras o dos componentes. Por ejemplo, los métodos descritos aquí se llevan a cabo en un "chip", denominado por conveniencia un VereChip.

[0073] En un sistema de dos cámaras, una primera cámara o compartimento puede comprender un espacio para la amplificación de ácido nucleico. Por tanto, la primera cámara puede comprender un microrreactor, como una cámara de microrreactor de amplificación de ácido nucleico, p.ej., un microrreactor de PCR. La primera cámara puede usarse para la transcripción inversa (véase más abajo).

[0074] Una segunda cámara puede comprender un espacio para la hibridación de ácido nucleico. Por tanto, la segunda cámara puede comprender una cámara de hibridación. La segunda cámara puede comprender sondas inmovilizadas, por ejemplo, en forma de una matriz.

[0075] Las dos cámaras pueden conectarse, por ejemplo, estar conectadas de manera fluida de forma que el fluido pueda fluir de una cámara a la otra. El flujo puede ser controlado. El flujo puede ser en una dirección; por ejemplo, puede permitirse el flujo de la primera cámara a la segunda pero evitarse el flujo de la segunda cámara a la primera. El chip puede comprender una válvula o tapón para este fin.

[0076] Cuando se emplea un método que usa un chip de dos cámaras, la amplificación de ácido nucleico puede llevarse a cabo en la primera cámara para producir amplicones. Después, los amplicones se mueven de la primera cámara a la segunda cámara del chip donde experimentan hibridación de las sondas a los amplicones diana.

[0077] Los ejemplos de tales chips se describen en los siguientes documentos de patente, y el lector experto será capaz fácilmente de fabricar tal chip a partir de los siguientes: FR 1043770, GB 1043770, IT 1043770, FR 1049157, GB 1049157, DE 1123739, IT 1123739, GB 1123739, FR 1123739, IT 1161985, GB 1161985, FR 1161985, FR 1182602, DE 1182602, IT 1182602, FR 1193214, IT 1193214, GB 1193214, US 6376291, US 6504226, US 6670257, US 20010024820, US 20010049200, US 20020017660, US 20030057199, US 20020045244, US 20030119289, US 20040206749, US 20040226908, US 20040235149, US 20040106290, US 20040164068, US 20020097900, US 20050136598, US 20050181392, US 20050282221, US 20050155860, US 20040141856, DE 1161985, DE 1193214, DE 1043770, DE 1049157, EP 1130631, EP 1326279, EP 1400600, EP 1403383, EP 1452993, EP 1535665, EP 1535878, EP 1541991, EP 1547688, EP 1618955, EP 1764418, EP 1885646, EP 1914226, EP 2051935, CN 101200447, WO 2006120221, JP 2006237643, WO 2007091280, WO 2007091281, WO 2007141811, US 20040132059, US 20040191804, US 20040227207, US 20050142597, US 20050176037, US 20050233440, US 20060115828, US 20070125650, US 20070252224, US 20080118405 y US 20080138210.

Transcripción inversa y RT-PCR de un paso

[0078] Un ensayo viral de la gripe (o un ensayo de cualquier virus ARN) puede incluir la transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés) como primer paso de una reacción de detección. Durante la transcripción inversa, las secuencias de ARN se convierten en ADN complementario (ADNc), proporcionando una plantilla de ADNc para la amplificación por PCR.

[0079] Una técnica de RT-PCR es el uso de un "sistema de RT-PCR en un paso". En un sistema de este tipo, pueden añadirse reactivos para RT y PCR a una muestra en una sola mezcla y cargarse en un chip, por ejemplo, que comprende secuencias de sonda. Las reacciones de RT y PCR catalizadas por enzimas pueden llevarse a cabo de manera sucesiva en el microrreactor de PCR del chip, aprovechando las diferentes termoestabilidades de las enzimas que intervienen (normalmente, una transcriptasa inversa termolábil y una polimerasa de ADN termoestable) y fijando un perfil térmico apropiado. Una incubación inicial a temperatura no desnaturalizante permite que la RT se produzca primero. A continuación, la temperatura puede elevarse para iniciar la PCR.

[0080] La temperatura y duración de las etapas de RT y PCR pueden determinarse fácilmente por aquellos con experiencia en la técnica. En un modo de realización, una etapa de RT puede llevarse a cabo durante un periodo desde menos de 2 minutos hasta más de 60 minutos a una temperatura a partir de aproximadamente 50-60 grados. C. y una fase de ADN-polimerasa puede llevarse a cabo a aproximadamente 95 grados. C. durante varios ciclos como se señala en otra parte.

Controles

[0081] Los métodos aquí descritos pueden implicar además el uso de controles. Por tanto, por ejemplo, puede coamplificarse un control no humano y no viral con el ácido nucleico diana.

[0082] Dicho control puede usarse para controlar la integridad de reactivos, equipo y la presencia de inhibidores, etc. Este control puede observarse en todas las pruebas incluso en ausencia de gripe. El control puede generarse mediante amplificación de una diana de control interno y puede hibridarse a una sonda complementaria.

[0083] Pueden usarse también sondas de control de hibridación. Pueden reconocerse en la micromatriz que dichos controles de hibridación actúan como un control en el proceso de hibridación.

Dichas secuencias o sondas de control pueden comprender, por ejemplo, proteína fitocromobilina sintasa HY2 de *Arabidopsis thaliana.*

Identificación de cepa y subtipo

[0084] Usando la información obtenida de una reacción de amplificación, pueden distinguirse diversas cepas y subtipos de un virus de la gripe e identificarse la cepa y subtipo.

[0085] Específicamente, puede usarse un ensayo para proporcionar una determinación positiva o negativa (sí/no) de la probabilidad de presencia o ausencia de virus de la gripe tipo A y B, así como la identificación del subtipo de H1, H1N1, H3, H3N2, H5, H5N1, H7, H9, H9N2 y gripe B, etc en una muestra.

[0086] También puede usarse un ensayo para observar una o más mutaciones en una cepa de virus de la gripe. Las mutaciones en un virus de la gripe por ejemplo, el HA y NA, pueden alterar la infectividad y letalidad del virus en diferentes huéspedes y diferentes tejidos y puede detectarse también usando los métodos y composiciones aquí descritos.

Detección de genes y variantes

[0087] Las secuencias de la gripe descritas aquí pueden ser capaces en especial de enlazar con un gen de la gripe relevante de una cepa de la gripe.

[0088] Por tanto, las secuencias de la gripe pueden ser capaces, en particular, de enlazar con variantes HA (hemaglutinina) o NA (neuraminidasa) de diferentes cepas de la gripe. Pueden usarse para dirigirse al gen HA o el gen NA o ambos. Las secuencias de la gripe pueden ser tales que sean capaces de unirse con determinadas variantes de genes y no con otras. Las secuencias de la gripe pueden ser capaces de enlazar con solo una variante genética.

[0089] De este modo, revelamos secuencias de la gripe que comprenden secuencias de ácido nucleico capaces de unirse a diferentes variantes del gen HA. Revelamos secuencias de gripe que comprenden secuencias de ácido nucleico capaces de unirse a una variante genética H1. Revelamos secuencias de gripe que comprenden secuencias de ácido nucleico capaces de unirse a una variante genética H3. Revelamos secuencias de gripe que comprenden secuencias de ácido nucleico capaces de unirse a una variante genética H5. Revelamos secuencias de gripe que comprenden secuencias de ácido nucleico capaces de unirse a una variante genética H7. Revelamos secuencias de gripe que comprenden secuencias de ácido nucleico capaces de unirse a una variante genética H9.

[0090] Revelamos además secuencias de gripe que comprenden secuencias de ácido nucleico capaces de unirse a diferentes variantes genéticas de N. Revelamos secuencias de gripe que comprenden secuencias de ácido nucleico capaces de unirse a una variante genética N1.

[0091] Las secuencias de la gripe pueden usarse para distinguir entre distintas cepas del virus de la gripe. Por ejemplo, pueden usarse para distinguir entre H1N1, H3N2, H5N1 y H9N2. Las secuencias pueden usarse para detectar los genes HA de subtipos H1N1, H3N2, H5N1, H7, H9N2 y Gripe B (Influenza B). Las secuencias pueden usarse para detectar genes NA de subtipos H1N1 y H5N1, por ejemplo. Pueden usarse en una micromatriz para identificar las cepas específicas mencionadas anteriormente de gripe A y B humana.

Detección multiplex

[0092] Las secuencias de ácido nucleico descritas aquí pueden usarse en un método de detección multiplex de dianas.

[0093] Los cebadores o conjuntos de cebadores pueden diseñarse de tal forma que cada conjuntode cebadores cebe un fragmento lo más corto posible. Esto puede realizarse para aumentar la eficacia de la hibridación y para lograr una duración de ciclo de PCR más corta mientras que se flanquean tantos sitios de sonda potenciales como sea posible.

[0094] La longitud de los cebadores puede ser de aproximadamente 30-mer para permitir una mayor temperatura de transcripción inversa y anillamiento para mejorar la especificidad. Las secuencias de las diferentes cepas de cada subtipo pueden alinearse y pueden identificarse sitios de sonda potenciales para cada subtipo. Entonces, pueden usarse las regiones flanqueantes de sitios que contienen el mayor número de sitios de sonda potenciales para diseñar los cebadores.

[0095] Los métodos descritos en este documentos pueden ser, por tanto, multiplexados. De acuerdo con la invención, se usa más de un par de cebadores en combinación con una o más sondas para amplificar y detectar secuencias de ácido nucleico diana específicas de la gripe.

[0096] En algunos modos de realización, las secuencias específicas diana de la gripe A y B pueden incluir el uso de los cebadores y sondas expuestos en la Tabla D1 y D2. Contemplamos el uso de todos los cebadores de PCR en la Tabla D1 y todas las secuencias de sonda en la Tabla D2.

[0097] Las secuencias de gripe pueden usarse para cualquier método para el que generalmente sean adecuadas secuencias de ácido nucleico. En concreto, pueden usarse como cebadores o sondas para la detección de gripe, por ejemplo, como se describe arriba.

Reactivos de ensayo

[0098] Los reactivos de ensayo, por ejemplo, que comprenden los cebadores y sondas descritos arriba, pueden proporcionarse como un kit o un consumible. Los reactivos pueden suministrarse como una preparación liofilizada. Cada reactivo puede suministrarse por separado o como una mezcla de uno o más reactivos. Los reactivos también pueden proporcionarse en un sustrato, como una perla. Un reactivo liofilizado puede ser estable durante más de un año.

SECUENCIAS DE LA GRIPE (TABLA D1)

[0099]

	Nombre del cebador	**Secuencia del cebador**
SEQ ID NO: 1	H1N1F_deg	5’-GAC ACA GTA CTW GAA AAG AAT GT-3’
SEQ ID NO: 2	H1N1R_deg	5’-TTT CYA CAA TGT AGG ACC ATG A-3’
SEQ ID NO: 3	NA_H1N1_F	5’-GAA GTT CCC TCT CCA TAC AA-3’
SEQ ID NO: 4	NA_H1N1_R	5’-GTT ATT ATG CCG TTG TAC TTT-3’
SEQ ID NO: 5	H3N2_873U22	5’-CAA AAT ACG AAG TGG GAA AAG C-3’
SEQ ID NO: 6	H3N2_1207L23	5’-ATT TGA TTG ATT GCT GCT TGA GT-3’
SEQ ID NO: 7	H5N1HA_517U21	5’-AAA CGG GCA AAG TGG AAG GAT-3’
SEQ ID NO: 8	H5N1 HA 769L25	5’-CTA ATC TGT TTG ATT TCA CAT ATT T-3’
SEQ ID NO: 9	H5N1NA_542U24	5’-ATA ATA ACA GAC ACT ATC AAG AGT-3’
SEQ ID NO: 10	H5N1NA_820L24	5’-CTC CAA ATT TTG ATT GAA AGA TAC-3’
SEQ ID NO: 11	H7_1185U23	5’-GCT TAT AGA GAA AAC TAA CCA AC-3’
SEQ ID NO: 12	H7_1475L23	5’-ATC ATA AGT GTT GTT TCT AAT AC-3’
SEQ ID NO: 13	H9N2_581U23	5’-TGA CAA CAG AAG ACA TAA ATA GG-3’
SEQ ID NO: 14	H9N2_894L23	5’-TTG AGA CTC TTT ACT CCA ACA TA-3’

	Nombre del cebador	Secuencia del cebador
SEQ ID NO: 15	FluB_743U21	5'-AAA CAG AAG ACG GAG GAC TAC-3'
SEQ ID NO: 16	FluB_1041L22	5'-CAG GAG GTC TAT ATT TGG TTC C-3'

[0100] H1N1F_deg y H1N1R_deg son secuencias adecuadas para su uso como cebadores para la detección de cepas H1N1, incluyendo la gripe porcina (H1N1) y gripe H1N1 estacional. NA_H1N1_F y NA_H1N1_R son secuencias adecuadas para su uso como cebadores para la detección de NA de H1N1.

[0101] H3N2_873U22 y H3N2_1207L23 son secuencias adecuadas para su uso como cebadores para la detección de H3N2.

[0102] H5N1HA_517U21 y H5N1 HA 769L25 son secuencias adecuadas para su uso como cebadores para la detección de HA de H5N1.

[0103] H5N1NA_542U24 y H5N1NA_820L24 son secuencias adecuadas para su uso como cebadores para la detección de NA de H5N1.

[0104] H7_1185U23 y H7_1475L23 son secuencias adecuadas para su uso como cebadores para la detección de H7.

[0105] H9N2_581U23 y H9N2_894L23 son secuencias adecuadas para su uso como cebadores para la detección de H9N2.

[0106] FluB_743U21 y FluB_1041L22 son secuencias adecuadas para su uso como cebadores para la detección de Gripe B.

SECUENCIAS DE LA GRIPE (TABLA D2)

[0107]

	Diana	Sondas	Secuencia 5'-3'
SEQ ID NO: 17	gen HA de H1 y H1N1	HA_H1N1_10H	AAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCA
SEQ ID NO: 18	gen HA de H1 y H1N1	HA_H1N1_11H	TTGGGTAACTGCAGCGTTGCCGGGTG
SEQ ID NO: 19	gen HA de H1 y H1N1	HA_H1N1_12H	TGGAAAACTATGTCTATTAAAAGGAA
SEQ ID NO: 20	gen HA de H1 y H1N1	HA_H1N1_13H	GTCAACCTGCTTGAGGACAGTCACAA
SEQ ID NO: 21	gen HA de H1 y H1N1	HA_H1_1	AGAATCAACTACTACTGGACTCTGC
SEQ ID NO: 22	gen HA de H1 y H1N1	HA_H1N1_5	ATCAGGAATCATCACCTCAAATGCA
SEQ ID NO: 23	gen HA de H1 y H1N1	HA_H1N1_6	CTTTCCAGAATGTACACCCAGTTACA
SEQ ID NO: 24	gen HA porcino de H1N1	HA_H1N1_10	AAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCA
SEQ ID NO: 25	gen HA porcino de H1N1	HA_H1N1_11	TTGGGTAAATGTAACATTGCTGGCTG
SEQ ID NO: 26	gen HA porcino de H1N1	HA_H1N1_12	CGGGAAACTATGCAAACTAAGAGGGG
SEQ ID NO: 27	gen HA porcino de H1N1	HA_H1N1_13	GTTAACCTTCTAGAAGACAAGCATAA

	Diana	Sondas	Secuencia 5'-3'
SEQ ID NO: 28	gen NA porcino de H1N1	NA_H1N1_1	GATTTGAGTCAGTCGCTTGGT
SEQ ID NO: 29	gen NA porcino de H1N1	NA_H1N1_2	TGCTTGTCATGATGGCATCAAT
SEQ ID NO: 30	gen NA porcino de H1N1	NA_H1N1_3	CAATGGGGCAGTGGCTGTGT
SEQ ID NO: 31	gen HA de H3 y H3N2	HA_H3_5	GATGGTTGGTACGGTTTCAGGCA
SEQ ID NO: 32	gen HA de H3 y H3N2	HA_H3_7	TGTAAACAGGATCACATATGGGGC
SEQ ID NO: 33	gen HA de H3 y H3N2	HA_H3N2_2	AATGTACCAGAGAAACAAACTAGAG
SEQ ID NO: 34	gen HA de H3 y H3N2	HA_H3N2_5	AATGAGATCAGATGCACCCATTGGC
SEQ ID NO: 35	gen HA de H5 y H5N1	HA_H5_2	TCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGG
SEQ ID NO: 36	gen HA de H5 y H5N1	HA_H5_9	ACACCAAGTGTCARACTCCAATGGG
SEQ ID NO: 37	gen HA de H5 y H5N1	HA_H5N1_6	GAGAGTAATGGAAATTTCATTGCTC
SEQ ID NO: 38	gen HA de H5 y H5N1	HA_H5N1_9	GAGAGTAATGGAAATTTCATTGCTCCAG
SEQ ID NO: 39	gen NA de N1 y H5N1	NA_N1_H274Y	CTAATTATTACTATGAGGAATGCTC
SEQ ID NO: 40	gen NA de N1 y H5N1	NA_N1_I222T_2	AACAACACACTGAGAACTCAAGAGT
SEQ ID NO: 41	gen NA de N1 y H5N1	NA_H5N1_8	GCTCCTAATTATCACTATGAGGAAT
SEQ ID NO: 42	gen NA de N1 y H5N1	NA_H5N1_1	ATATAAGATCTTCAAAATGGAAAAA
SEQ ID NO: 43	gen HA de H7	HA_H7_2	AATGCTGAAGAAGATGGCACTGGTT
SEQ ID NO: 44	gen HA de H7	HA_H7_8	GGCAATGTSATWAATTGGACCAGAG
SEQ ID NO: 45	gen HA de H7	HA_H7_9	TGAGTTGATAGACAATGARTTCACTGAG
SEQ ID NO: 46	gen HA de H9 y H9N2	HA_H9_2	GAGTAAGATCCAATGGGAATCTAAT
SEQ ID NO: 47	gen HA de H9 y	HA_H9_3	TAATTGCTCCATGGTATGGACACAT
SEQ ID NO: 48	gen HA de H9 y	HA_H9_6	AATGTCAGCAAATATGCATTTGGGA
SEQ ID NO: 49	gen HA de H9 y H9N2	HA_H9N2_5	GGAAGAATTGATTATTATTGGTCGG
SEQ ID NO: 50	gen HA de H9 y	HA_H9N2_6	GGTGGCTTAAATACTACATGGCCAT
SEQ ID NO: 51	gen HA de gripe B	HA_FluB_4	CCCAAATCAAACAGAAGACGGAGGA
SEQ ID NO: 52	gen HA de gripe B	HA_FluB_6	AACAAAAGCAAGCCTTACTACACAG
SEQ ID NO: 53	gen HA de gripe B	HA_FluB_7	GATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTA

DETECCIÓN MEDIANTE USO DE SECUENCIAS DE GRIPE

[0108] En la Tabla D1, H1N1F_deg y H1N1R_deg son secuencias adecuadas para su uso en la amplificación de gripe porcina H1N1 y gripe estacional H1N1. Estas secuencias pueden usarse en combinación con, como se muestra en la Tabla D2, HA_H1N1_10H para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1N1_11H para la detección del gen HA de H 1, como H1N1; con HA_H1N1_12H para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1N1_13H para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1_1 para la detección del gen HA de H1, como H1N1; como H1N1; con HA_ H1N1_5 para la detección del gen HA de H 1, como H1N1; con HA_H1N1_6 para la detección del gen HA de H 1, como H1N1; con HA_H1N1_10 para la detección del gen HA porcino de H1N1; con HA_H1N1_11 para la detección del gen HA porcino de H1N1; con HA_H1N1_12 para la detección del gen HA porcino de H1N1; con HA_H1N1_13 para la detección del

gen HA porcino de H1N1; con NA_H1N1_1 para la detección del gen NA porcino de H1N1; con NA_H1N1_2 para la detección del gen NA porcino de H1N1; y/o con NA_H1N1_3 para la detección del gen NA porcino de H1N1.

[0109] En la Tabla D1, NA_H1N1_F y NA_H1N1_R son secuencias adecuadas para su uso en la amplificación de NA de H1N1. Estas secuencias pueden usarse en combinación con, como se muestra en la Tabla D2, HA_H1N1_10H para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1N1_11H para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1N1_12H para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1N1_13H para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1_1 para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1N1_5 para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1N1_6 para la detección del gen HA de H1, como H1N1; con HA_H1N1_10 para la detección del gen HA porcino de H1N1; con HA_H1N1_11 para la detección del gen HA porcino de H1N1; con HA_H1N1_12 para la detección del gen HA porcino de H1N1; con HA_H1N1_13 para la detección del gen HA porcino de H1N1; con NA_H1N1_1 para la detección del gen NA porcino de H1N1; con NA_H1N1_2 para la detección del gen NA porcino de H1N1; y/o con NA_H1N1_3 para la detección el gen NA porcino de H1N1.

[0110] En la Tabla D1, H3N2_873U22 y H3N2_1207L23 son secuencias adecuadas para su uso en la amplificación de H3N2. Estas secuencias pueden usarse en combinación con, como se muestra en la Tabla D2, HA_H3_5 para la detección del gen HA de H3, como H3N2; con HA_H3_7 para la detección del gen HA de H3, como H3N2; con HA_H3N2_2 para la detección del gen HA de H3, como H3N2; y/o con HA_H3N2_5 para la detección del gen HA de H3, como H3N2.

[0111] En la Tabla D1, H5N1HA_517U21 y H5N1 HA 769L25son secuencias adecuadas para su uso en la amplificación de HA de H5N1. Estas secuencias pueden usarse en combinación con, como se muestra en la Tabla D2, HA_H5_2 para la detección del gen HA de H5, como H5N1; con HA_H5_9 para la detección del gen HA de H5, como H5N1; con HA_H5N1_6 para la detección del gen HA de H5, como H5N1; y/o con HA_H5N1_9 para la detección del gen HA de H5, como H5N1; con NA_N1_H274Y para la detección del gen NA de N1, como H5N1; con NA_N1_I222T_2 para la detección del gen NA de N1, como H5N1; con NA_H5N1_8 para la detección del gen NA de N1, como H5N1; y/o con NA_H5N1_1 para la detección del gen NA de N 1, como H5N1.

[0112] En la Tabla D1, H5N1NA_542U24 y H5N1NA_820L24son secuencias adecuadas para su uso en la amplificación NA de H5N1. Estas secuencias pueden usarse en combinación con, como se muestra en la Tabla D2, HA_H5_2 para la detección del gen HA de H5, como H5N1; con HA_H5_9 para la detección del gen HA de H5, como H5N1; con HA_H5N1_6 para la detección del gen HA de H5, como H5N1; con HA_H5N1_9 para la detección del gen HA de H5, como H5N1; con NA_N1_H274Y para la detección del gen NA de N1, como H5N1; con NA_N1_I222T_2 para la detección del gen NA de N1, como H5N1; con NA_H5N1_8 para la detección del gen NA de N1, como H5N1; y/o con NA_H5N1_1 para la detección del gen NA de N1, como H5N1.

[0113] En la Tabla D1, H7_1185U23 y H7_1475L23 son secuencias adecuadas para su uso en la amplificación de H7. Estas secuencias pueden usarse en combinación con, como muestra la Tabla D2, HA_H7_2 para la detección del gen HA de H7; con HA_ H7_8 para la detección del gen HA de H7; y/o con HA_H7_9 para la detección del gen HA de H7.

[0114] En la Tabla D1, H9N2_581U23 y H9N2_894L23 son secuencias adecuadas para su uso en la

amplificación de H9N2. Estas secuencias pueden usarse en combinación con, como se muestra en la Tabla D2, HA_H9_2 para la detección del gen HA de H9, como H9N2; con HA_H9_3 para la detección del gen HA de H9, como H9N2; con HA_H9_6 para la detección del gen HA de H9, como H9N2; con HA_H9N2_5 para la detección del gen HA de H9, como H9N2; y/o con HA_H9N2_6 para la detección del gen HA de H9, como H9N2.

[0115] En la Tabla D1, FluB_743U21 y FluB_1041L22 son secuencias adecuadas para su uso en la amplificación de la gripe B. Estas secuencias pueden usarse en combinación con, como se muestra en la Tabla D2, HA_FluB_4 para la detección del gen HA de FluB (gripe B); con HA_FluB_6 para la detección del gen HA de FluB; y/o con HA_FluB_7 para la detección del gen HA de FluB.

OTRAS SECUENCIAS DE LA GRIPE (TABLA D3) [0116]

Gen	Nombre del cebador	Secuencia
gen HA de H1N1	H1N12 HA F	5'- TTC GAA ATA TTC CCC AAA GRR AGC TCA TGG - 3'
gen HA de H1N1	H1N1 HA R	5'- TGC ACT CCT GAC ATA CTT TGG ACA CTC TCC- 3'
gen HA de H3N2	H3N2 HA F	5'- GAA GAA TCA CAG TCT CTA CCA AAA GAA GCC- 3'
gen HA de H3N2	H3N2 HA R	5'- CTC GTT GGT TTT CCC GAT CAA CCT ATT CAG- 3'
gen HA de H5N1	H5N1 HA F	5'-GGT CTT ACA TAG TGG AGA AGR YCA ATC CAG- 3'
gen HA de H5N1	H5N1 HA R	5'- AGG GCT ATT TCT GAG CCC AGT CGC AAG GAC- 3'
gen NA de H5N1	H5N1 NA F	5'- GCT CCC TCC CCA TAT AAC TCA AGG TTT GAG - 3'
gen NA de H5N1	H5N1 NA R	5'- CTC CAC TGC ATA TAT ATC CTA TTT GAT ACT CC- 3'
gen HA de H7N1	H7 HA F	5'- AAC AGG AAT GAA GAA TGT TCC YGA RAT YCC- 3'
gen HA de H7N1	H7 HA R	5'- TAG AAG TAT AAA ACA TGA TGC CCC GAA GCT- 3'
gen HA de H9N2	H9N2 HA F	5'- CAT GTT CAG ATT CAT TCT ACA GGA GTA TGA G - 3'
gen HA de H9N2	H9N2 HA R	5'- CCC TCT ACT TGA TCT AGC AGG CAC ATT CCT- 3'
gen HA de gripe B	Inf B HA F	5'- AAA TTG GAA CCT CAG GGT CTT GCC CTA ACG - 3'
gen HA de gripe B	Inf B HA R	5'- GGG TGT TTT CAC CCA TAT TGG GCA ATT TCC- 3'

[0117] Tabla D3. Secuencias de gripe útiles, por ejemplo, como cebadores para la amplificación de genes de la gripe.

OTRAS SECUENCIAS DE LA GRIPE (TABLA D4) [0118]

Nombre de identidad de la sonda	Estructura/secuencia de sonda	Gen diana
HA_H1_4	AGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTAT	**H1**
HA_H3_2	**GCA**GAATAAGCATCTATTGGACAATAGT	**H3**
HA_H3_3	**TGG**GAAAAGCTCAATAATGAGATCAGAT	**H3**
HA_H3_4	CAAATGGAAGCATTCCCAATGACAA	**H3**
HA_H3_6	GTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCA	**H3**
HA_H5_1	AGGTCCTCCTTTTTTAGAAATGTGG	**H5**
HA_H5_7	CCATTTTGAGAAAATTCAGATMATCCC	**H5**
HA_H5_8	AAGCCTCATCAGGRGTGAGCTCAGC	**H5**
HA_H5_10	ACGGGCAAAGTGGAAGRATGGAGTT	**H5**
HA_H7_1	ATAATGCTGAACTCTTGGTAGCAAT	**H7**
HA_H7_4	AATAGAATACAGATTGACCCAGTCA	**H7**
HA_H7_7	CCAGTCGGCAATTGATCAGATAACC	**H7**
HA_H9_4	ATATTCTHTTCATGTGGGGCATACA	**H9**
HA_H9_5	TTCAAGACGCCCAATACACAAATAAT	**H9**
HA_H9_7	TGATAGGGCCAAGGCCACTTGTCAA	**H9**
HA_H1N1_2	CATCTATCATACAGAAAATGCTTAT	**H1N1 HA**
HA_H1N1_4	ACA A(R)G AGA AAG AAG TCC TTG TGC T	**H1N1 HA**
HA_H1N1_6	CTTTCCAGAATGTACACCCAGTTACA	**H1N1 HA**
HA_H1N1_7	CAATAATATTTGAGGCAAATGGAAA	**H1N1 HA**
HA_H3N2_3	GAGACATACTTTTGATTAACAGCAC	**H3N2 HA**
HA_HSN1_3	GGCTTATCAAAAAGAACAGTACATA	**H5N1 HA**
HA_H5N1_4	GCAGACTAGGCTCTATCAAAACCCA	**H5N1 HA**
HA_H5N1_5	ACTATGAAGAACTGAAACACCTATT	**H5N1 HA**
HA_H5N1_7	CCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCT	**H5N1 HA**
HA_H5N1_8	GACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGC	**H5N1 HA**
HA_H5N1_10	TCA AGG AGA GAG AAG AAG AAG AAA G	**H5N1 HA**

Nombre de identidad de la sonda	Estructura/secuencia de sonda	Gen diana
HA_H9N2_1	AAGATATAAATAGAACCTTCAAACC	**H9N2 HA**
HA_H9N2_3	ATTTAAAAGGTGGTAATTGTGTAGT	**H9N2 HA**
HA-H9N2_7	TGTACACAAGGACTGACACAACAACA	**H9N2 HA**
NA_N1_3	ACTATCAAGAGTTGGAGAAACAACA	**gen N1**
NA_H5N1_5	TGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGC	**gen NA de H5N1**
NA_H5N1_7	TGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGC	**gen NA de H5N1**
HA_FluB_3	CCCAAATCAACAGAAGACGGAGGAC	**gen HA de gripe B**
HA_FluB_5	AAC GGA GTG ACC ACA CAT TAC GTT T	**gen HA de gripe B**
HA_FluB_8	AAG TGG CAG GAG CAA GGT AAT AAA A	**gen HA de gripe B**

[0119] Tabla D4. Secuencias de gripe útiles, por ejemplo, como sondas para la detección de diferentes cepas de gripe.

POLINUCLEÓTIDOS

[0120] Las secuencias de gripe pueden comprender polinucleótidos. Cuando el contexto lo admita, el término "secuencia de la gripe" debería entenderse que comprende cualquier secuencia específica revelada en este documento, por ejemplo, una secuencia expuesta en la Tabla D1, Tabla D2, Tabla D3 o Tabla D4, así como cualquier variante, fragmentos, derivados u homólogos de dichas secuencias de ácido nucleico específicas.

[0121] Según su uso en este documento, los términos "polinucleótido", "nucleótido" y ácido nucleico se entenderán como sinónimos entre ellos. "Polinucleótido" normalmente hace referencia a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ADN o ARN no modificado o ADN o ARN modificado. Los "polinucleótidos" incluyen, sin carácter limitativo, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más típicamente, bicatenario o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, "polinucleótido" se refiere a regiones de triple cadena que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con esqueletos modificados por razones de estabilidad u otros motivos. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales como inosina. Se han realizado una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por tanto, "polinucleótido" incluye formas modificadas de forma química, por enzimas o de forma metabólica de polinucleótidos como se encuentran normalmente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. Los "polinucleótidos" incluyen también polinucleótidos relativamente cortos, a menudo denominados oligonucleótidos.

Degeneración

[0122] Se entenderá por aquellos con experiencia en la materia que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del cógido genético. Además, se entenderá que aquellos con experiencia pueden realizar

sustituciones de nucleótidos, utilizando técnicas rutinarias, que no afecten a la secuencia de polipéptido codificada por los polinucleótidos descritos aquí para reflejar el uso del codón de cualquier organismo huésped concreto en el que se vayan a expresar los polipéptidos.

Naturaleza de los ácidos nucleicos

[0123] Las secuencias de gripe y variantes, fragmentos, derivados y homólogos pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser de una cadena o de doble cadena. También pueden ser polinucleótidos que incluyan nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen una variedad de tipos diferentes de modificación para oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de este documento, se entenderá que los polinucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo para mejorar la actividad *in vivo* o vida útil de polinucleótidos de interés.

Variantes, homólogos y derivados

[0124] Los términos "variante", "homólogo" o "derivado" en relación con una secuencia de nucleótido incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazo de, eliminación de o adición de uno o más ácidos nucleicos de o a la secuencia. Las variantes, homólogos o derivados pueden codificar un polipéptido que tenga actividad biológica.

Identidad de secuencia

[0125] Como se ha indicado arriba, con respecto a la homología de secuencia, puede haber al menos un 50 o 70%, como al menos un 85% o al menos un 90% de homología con las secuencias mostradas en la lista de secuencias aquí expuesta. Puede haber al menos un 95%, como al menos un 98%, de homología. Según la invención, las variantes, homólogos, derivados o fragmentos de los cebadores y sondas de SEQ ID NO: 1 hasta 53 tienen al menos un 90% de identidad de secuencia con las secuencias dadas en las Tablas D 1 y D2. Pueden realizarse comparaciones de homología de nucleótidos como se describe arriba. Un programa de comparación de secuencias que puede usarse puede comprender el programa GCG Wisconsin Bestfit descrito arriba. La matriz de puntuación predeterminada tiene un valor de coincidencia de 10 para cada nucleótido idéntico y -9 para cada divergencia. La penalización de creación de hueco predeterminada es -50 y la penalización de extensión de hueco predeterminada es -3 para cada nucleótido.

Hibridación

[0126] Describimos además secuencias de nucleótido que son capaces de hibridar de manera selectiva con las secuencias aquí presentadas, o cualquier variante, fragmento o derivado de las mismas, o con el complemento de cualquiera de las anteriores. Las secuencias de nucleótido pueden ser de al menos 15 nucleótidos de longitud, como al menos 20, 30, 40 o 50 nucleótidos de longitud. Según la invención, las variantes, homólogos, derivados o fragmentos de los cebadores y sondas de SEQ ID NO: 1 a 53 tienen al menos 20 nucleótidos de longitud.

[0127] El término "hibridación" según su uso aquí puede incluir "el proceso por el que una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria a través de apareamiento de bases" así como el proceso de amplificación como se lleva a cabo en tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa.

[0128] Los polinucleótidos capaces de hibridar de forma selectiva con las secuencias de nucleótidos

presentadas aquí, o con su complemento, serán generalmente un 70%, como al menos un 80 o 90%, por ejemplo, al menos un 95% o 98% homólogos a las secuencias de nucleótido correspondientes presentadas aquí en una región de al menos 20, como al menos 25 o 30, por ejemplo, al menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos.

[0129] El término "hibridable" puede incluir "hibridable de forma selectiva", es decir, que el polinucleótido usado como sonda es usado en condiciones en las que se encuentra que un polinucleótido diana hibrida con la sonda a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede producirse debido a la presencia de otros polinucleótidos, por ejemplo, en la biblioteca de ADN genómico o ADNc que se esté explorando. En este caso, el fondo implica un nivel de señal generado por la interacción entre la sonda y un miembro del ADN no específico de la biblioteca que es menos de 10 veces, como menos de 100 veces, tan intenso como la interacción específica observada con el ADN diana. La intensidad de interacción puede medirse, por ejemplo, mediante marcado radiactivo de la sonda, p.ej. con ^{32}P.

[0130] Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (Tm) del complejo enlazante de ácido nucleico, como se explica en Berger y Kimmel (1987, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Vol 152, Academic Press, San Diego CA), y confiere una "rigurosidad" definida como se explica a continuación.

[0131] La rigurosidad máxima se produce normalmente a aproximadamente Tm-5ºC (5ºC por debajo de la Tm de la sonda); la alta rigurosidad de aproximadamente 5ºC a 10ºC por debajo de Tm; la rigurosidad intermedia de aproximadamente 10ºC a 20ºC por debajo de Tm; y la baja rigurosidad de aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de Tm. Como se entenderá por aquellos con experiencia en la técnica, puede usarse una hibridación de rigurosidad máxima para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos idénticas, mientras que puede usarse una hibridación de rigurosidad intermedia (o baja) para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.

[0132] Describimos secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con ácidos nucleicos de la gripe, fragmentos, variantes, homólogos o derivados revelados aquí en condiciones de rigurosidad (p.ej., 65ºC y 0,1 X SSC {1XSSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na_3 Citrato pH 7,0).

[0133] Cuando el polinucleótido es de doble cadena, las dos cadenas del dúplex, bien individualmente o en combinación, se encuentran comprendidas por los métodos y composiciones aquí descritos. Cuando el polinucleótido es monocatenario, debe entenderse que la secuencia complementaria de ese polinucleótido también se incluye.

Derivación de variantes

[0134] Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la gripe reveladas aquí, pero que también se incluyen pueden obtenerse mediante una variedad de formas. Otras variantes de las secuencias pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la exploración de bibliotecas de ADN realizadas a partir de una variedad de sujetos, por ejemplo, sujetos de diferentes poblaciones. Por ejemplo, pueden identificarse homólogos de la gripe de otros sujetos u otras especies. Pueden producirse otros polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de secuencias de gripe recombinantes identificando posiciones correspondientes en los homólogos y sintetizando o produciendo la molécula como se ha descrito en otras partes de este documento.

[0135] Además, pueden obtenerse otros homólogos virales/bacterianos o celulares de secuencias de

la gripe, especialmente homólogos celulares encontrados en células de mamíferos (p.ej., células de rata, ratón, bovinas y de primate), y dichos homólogos y fragmentos de los mismos serán capaces, en general, de hibridar de forma selectiva con un ácido nucleico de la secuencia de gripe. Dichos homólogos pueden usarse para diseñar ácidos nucleicos de la secuencia de gripe, fragmentos, variantes y homólogos. Puede llevarse a cabo mutagénesis por medios conocidos en la técnica para producir una mayor variedad.

[0136] Las secuencias de homólogos de secuencia de gripe pueden obtenerse explorando bibliotecas de ADNc producido a partir de o bibliotecas de ADN genómico de otras especies animales o no animales, como especies virales, microbianas o fúngicas, y explorando dichas bibliotecas con sondas que comprenden todo o parte de cualquiera de los ácidos nucleicos de la secuencia de la gripe, fragmentos, variantes, homólogos u otros fragmentos de ácidos nucleicos de secuencia de la gripe en condiciones de media a alta rigurosidad.

[0137] Se aplican consideraciones similares para obtener homólogos de especies y variantes alélicas de las secuencias de polipéptido o nucleótido reveladas aquí.

[0138] Las variantes y homólogos de especies/cepa pueden obtenerse también usando PCR con cebadores degenerados que usará cebadores diseñados para dirigirse a secuencias dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservados en las secuencias de ácidos nucleicos de la secuencia de la gripe. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, mediante alineamiento de las secuencias de aminoácido de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencias pueden llevarse a cabo usando *software* informático conocido en la técnica. Por ejemplo, su usa ampliamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

[0139] Los cebadores usados en la PCR con cebadores degenerados contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones de rigurosidad más bajas que aquellas usadas para la clonación de secuencias con cebadores de una secuencia frente a secuencias conocidas. Se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica que la homología de nucleótidos general entre secuencias de organismos relacionados de forma lejana es probable que sea muy baja y, por tanto, en estas situaciones la PCR con cebadores degenerados puede ser el método de elección en lugar de la exploración de bibliotecas con fragmentos marcados de secuencias de secuencias de gripe.

[0140] Además, las secuencias homólogas pueden identificarse buscando bases de datos de proteínas y/o nucleótidos usando algoritmos de búsqueda como la serie de programas BLAST.

[0141] Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida de secuencias caracterizadas, por ejemplo, ácidos nucleicos de la secuencia de la gripe, o variantes, homólogos, derivados o fragmentos de los mismos. Esto puede ser útil cuando se necesitan cambios de codones silenciosos para las secuencias, por ejemplo, para optimizar las preferencias de codón para una célula huésped particular en la que se están expresando las secuencias de polinucleótido. Pueden ser recomendables otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

[0142] Los polinucleótidos descritos aquí pueden usarse para producir un cebador, p.ej., un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, p.ej., marcada con un marcador revelador por medios convencionales usando marcadores radioactivos o no radioactivos o

pueden clonarse los polinucleótidos en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 8, 9, 10 o 15, como al menos 20, por ejemplo, al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud y también se encuentran abarcados por el término "polinucleótidos" según su uso aquí.

[0143] Los polinucleótidos como sondas y polinucleótidos de ADN pueden producirse de forma recombinante, sintética o por cualquier medio disponible para aquellos con experiencia en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas estándares.

[0144] En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, incluyendo una producción paso a paso de la secuencia de ácido nucleico deseada produciendo los nucleótidos uno a uno. Las técnicas para lograr esto utilizando técnicas automatizadas se encuentran fácilmente disponibles en sector.

[0145] Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente usando medios recombinantes, por ejemplo, técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará hacer que un par de cebadores (p.ej., de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) flanqueen una región de la secuencia localizadora de lípidos que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con ARNm o ADNc obtenido de una célula animal o humana, llevando a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que provoquen la amplificación de la región deseada, aislando el fragmento amplificado (p.ej., mediante purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para que contengan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de forma que el ADN amplificado puede clonarse en un vector de clonación adecuado.

[0146] Los polinucleótidos o cebadores pueden portar un marcador revelador. Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos como ^{32}P o ^{35}S, marcadores de enzimas u otros marcadores de proteína como biotina. Dichos marcadores pueden añadirse a polinucleótidos o cebadores y pueden detectarse usando técnicas conocidas *per se*. Los polinucleótidos o cebadores o fragmentos de los mismos marcados o no marcados pueden ser usados por cualquier persona con experiencia en la técnica en pruebas basadas en ácido nucleico para detectar o secuenciar polinucleótidos en el cuerpo humano o animal.

[0147] Dichas pruebas de detección comprenden generalmente poner en contacto una muestra biológica que contiene ADN o ARN con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador en condiciones de hibridación y detectar cualquier dúplex formado entre la sonda y ácido nucleico en la muestra. Dicha detección puede lograrse usando técnicas como PCR o inmovilizando la sonda sobre un soporte sólido, eliminando el ácido nucleico en la muestra que no está hibridado a la sonda, y después detectando el ácido nucleico que ha hibridado con la sonda. Alternativamente, el ácido nucleico de muestra puede inmovilizarse sobre un soporte sólido y puede detectarse la cantidad de sonda unida a dicho soporte. Los métodos de ensayo adecuados de este y otros formatos pueden encontrarse, por ejemplo, en WO89/03891 y WO90/13667.

[0148] Las pruebas para secuenciar nucleótidos, por ejemplo, los ácidos nucleicos de la secuencia de gripe, incluyen poner en contacto una muestra biológica que contiene ADN o ARN diana con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador en condiciones de hibridación y determinar la secuencias por el método de la terminación de la cadena didesoxi de Sanger (véase Sambrook *et al.*), por ejemplo.

[0149] Dicho método comprende generalmente alargar, en presencia de los reactivos adecuados, el cebador mediante síntesis de una cadena complementaria al ADN o ARN diana y terminar de forma selectiva el alargamiento en uno o más de un residuo A, C, G o T/U; permitir que ocurra el alargamiento de la cadena y la reacción de terminación; separar según el tamaño los productos alargados para determinar la secuencia de los nucleótidos en la que se ha producido la terminación selectiva. Los reactivos adecuados incluyen una enzima ADN polimerasa, los desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, un tampón y ATP. Se usan didesoxinucleótidos para la terminación selectiva.

[0150] La secuencia de polipéptido variante de secuencia de la gripe puede usarse como terapia en cualquier forma, como por ejemplo, en una forma aislada. El término "aislada" significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que se asocia la secuencia de forma natural en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza. En un aspecto, la secuencia se encuentra en forma purificada. El término "purificada" quiere decir que la secuencia se encuentra en un estado relativamente puro, p.ej., al menos aproximadamente un 90% puro, o al menos aproximadamente un 95% puro o al menos aproximadamente un 98% puro.

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE

[0151] Las secuencias de gripe descritas aquí pueden usarse para la detección del virus de la gripe en una muestra. A continuación, se expone un ejemplo.

[0152] La muestra puede procesarse para extraer ácidos nucleicos, como ARN mensajero. El ARNm puede sufrir transcripción inversa a ADNc. El ADNc puede amplificarse usando las secuencias de la gripe como cebadores. Pueden usarse combinaciones por pares de cebadores, como comprendiendo cebadores directos e inversos para una variante de gen particular. Cualquiera o todas las secuencias expuestas en la Tabla D1 pueden usarse para la amplificación en masa de secuencias de genes de la gripe cualesquiera presentes en la muestra. Los ácidos nucleicos amplificados pueden detectarse mediante hibridación en solución usando una o más de las secuencias de gripe como sondas. La presencia de unión entre una secuencia de sonda de la gripe y su diana (es decir, un gen de gripe amplificado o parte del mismo) según su detección en la hibridación puede usarse como indicador de la presencia de una gripe en la muestra.

[0153] La detección de cepa específica de cepas de la gripe puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante detección de unión entre secuencias sonda de gripe específicas y sus dianas. Esto puede lograrse, por ejemplo, llevando a cabo hibridaciones separadas y detectando el enlace de determinadas secuencias de sonda y no otras. Alternativamente, o además, las sondas de secuencia de la gripe pueden inmovilizarse en una matriz espaciada para facilitar la detección y distinción de unión específica a determinadas secuencias de sonda. Dichos métodos de detección de ácidos nucleicos en una matriz e hibridación de la matriz y detección de enlace son conocidos en la técnica.

[0154] Los métodos descritos aquí pueden usarse para la detección de infección por gripe en un sujeto. Para este fin, puede tomarse una muestra de un sujeto y someterse a pruebas para detectar la presencia del virus de la gripe. La presencia del virus en la muestra indica una infección viral por gripe. La presencia de una cepa particular en la muestra indica infección por esa cepa.

[0155] Se apreciará que no es estrictamente necesario que el virus de la gripe intacto esté presente en la muestra. Todo lo necesario para la detección es la presencia de ácido nucleico de la gripe

detectable (p.ej., amplificable) en la muestra.

[0156] Los métodos descritos aquí incluyen métodos terapéuticos y profilácticos. Dichos métodos incluyen la detección de infección por gripe, opcionalmente junto con detección de la cepa. Se prevé elegir una terapia adecuada basándose en la presencia de la infección o conocimiento de la infección por una cepa concreta, o ambos. Las terapias adecuadas incluyen antivirales, vacunas contra la gripe, etc., como se conoce en la técnica.

EJEMPLOS

[0157] Los Ejemplos describen un método de uso de las secuencias de genes de la gripe descritas en este documento para la detección de la gripe, en especial, la detección de cepas de gripe.

[0158] Algunos de los Ejemplos utilizan un chip combinado de RT-PCR e hibridación en micromatriz, denominado VereFlu Lab On Chip. Sin embargo, otros usos de secuencias de genes de la gripe descritos en este documento para la detección de la gripe, en concreto, detección de cepas de gripe serán evidentes para el lector experto.

[0159] Dichos métodos pueden incluir, por ejemplo, usar secuencias como cebadores para amplificación de ácido nucleico usando, por ejemplo, PCR y otros métodos de amplificación, incluyendo RT-PCR, LCR, etc. Los métodos pueden incluir también el uso de las secuencias como sondas, que pueden marcarse de forma opcional, en cualquier método de hibridación de ácido nucleico, como se describe en Maniatis *et al.* o mediante hibridación en micromatriz, etc.

Ejemplo 1. Pruebas específicas para cepas de la gripe y distintas a la gripe (materiales y métodos)

[0160] La Figura 1 es un diagrama de fluido que ilustra un modo de realización de un Lab-on-Chip descrito en este documento. A. VereChip- Lab-on-Chip B. VereID BioSystem.

[0161] Se muestra una visión general del protocolo completo en la Figura 2.

Recolección de muestras

[0162] Los materiales de recolección de muestras se adhieren a las pautas de la OMS para la recolección de virus de la gripe, como se describen en www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/index.html. La recolección se llevó a cabo usando medio UTM (Universal Transport Medium, COPAN) o medio E-MEM (Eagle Minimal Essential Medium) con caldo de infusión de ternera, fracción V de albúmina bovina, solución de gentamicina sulfato y anfotericina B.

[0163] Los materiales de recolección se envasan con hisopo flocado de nylon o hisopo de plástico/poliéster (materiales de recolección de muestra comunes disponibles normalmente) junto con el tubo de recolección.

Muestras de gripe

[0164] Se obtuvieron 29 muestras de ARN de subtipos H1N1, H3N2 y gripe B para los experimentos a partir de muestras clínicas. Se obtuvo una muestra stock de ARN de cada subtipo H7N1 y H9N2 de muestras archivadas.

[0165] El desglose del número de cada subtipo y su origen es el siguiente:

i) H1N1: 5 muestras, humanas

ii) H3N2: 13 muestras, humanas

iii) H7N1: 1 muestra, aviar

iv) H9N2: 1 muestra, aviar

v) Inf B: 11 muestras, humanas

Muestras distintas a la gripe

[0166] Para las pruebas de especificidad, se usan cinco virus diferentes a la gripe (virus sincitial respiratorio, parainfluenza, adenovirus, metaneumovirus y rinovirus obtenido de ATCC), con su TCID50 determinada.

Aislamiento de ARN viral

[0167] El aislamiento del virus se lleva a cabo en muestras de paciente o aviares.

[0168] El ARN se extrae directamente de la muestra usando el kit de extracción de ARN viral QIAamp de Qiagen (nº catálogo 52906) según las instrucciones dadas en el folleto del producto.

Otros virus

[0169] El ARN se extrae directamente del virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza humana, metaneumovirus, adenovirus y rinovirus usando el QIAGEN Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GMbH, Alemania) según las instrucciones dadas en el folleto del producto. Se entiende por aquellos con experiencia en la técnica que el ARN aislado de cualquier virus distinto a la gripe sería suficiente para proporcionar un control negativo adecuado.

Transcripción inversa (RT) y amplificación por PCR

[0170] Cada muestra de ARN (extraída usando el Qiagen QIAmp Viral RNA minikit, Cat nº 52904) es amplificada en el reactor de PCR integrado en el chip usando el Qiagen Quantitect virus +ROX kit (cat nº 211031). Se usa una mezcla multiplex de cebadores para el gen HA de los subtipos H1N1, H3N2, H5N1, H7N1, H9N2, Inf B y el gen NA de H5N1.

[0171] El protocolo usado es el siguiente:

Componentes	***Volumen***
mezcla maestra viral Quantitect Qiagen	*5,0*
Mezcla de cebadores A VereFlu	*1,0*
Mezcla enzima RT	*0,5*
ARN	*10,0*
Control IVT PCR	*5,0*
Agua grado PCR	*3,5*
Volumen total	***25,0***

Carga

[0172] Cada canal de entrada del chip se carga con 11,5 µl de la mezcla de RT-PCR. A continuación, se sitúa el chip en el sistema de control térmico (TCS, en inglés) del sistema "*Lab-on-Chip*" (laboratorio en chip), descrito en mayor detalle a continuación. Se lleva a cabo una RT-PCR en el microrreactor de PCR del chip.

Condiciones de RT-PCR

[0173] Las condiciones de ciclo son 50ºC durante 30 minutos para la transcripción inversa; 95ºC durante 5 minutos para la activación de enzimas; 45 ciclos de 95ºC durante 15 s, 50ºC durante 30 s y

72ºC durante 45 s.

Hibridación del producto de RT-PCR

[0174] Tras la RT-PCR, el producto de RT-PCR se desplaza fuera del microrreactor de PCR pipeteando 14,5 µl de tampón de hibridación en cada canal de entrada. La hibridación puede realizarse en el TCS a 55ºC durante 30 min usando solución amortiguadora de fosfato, NaCl, KCl, Tween 20 y solución de Denhardt.

[0175] Tras la hibridación, la micromatriz se lava centrifugándola en tampón de lavado a 3000 rpm durante 2 minutos. El tampón de lavado se drenó posteriormente y el chip se colocó de nuevo en el tubo de centrifugación para centrifugarlo a 3000 rpm durante 2 minutos.

Análisis y formación de imágenes de la micromatriz

[0176] La micromatriz hibridada es escaneada y se captura la imagen utilizando el lector de micromatriz VereID Microarray Reader. La imagen capturada es analizada automáticamente por el *software* VereID. Para que una sonda se considere iluminada, la mediana de la señal/ mediana del fondo debe ser igual o superior a 3 * max (med señal/ med fondo) de los controles de sonda negativos.

[0177] Las sondas son predetectadas en la cámara de micromatriz del chip. Las sondas se detectan en la micromatriz del chip a una concentración de 10 µM.

[0178] Para una cepa y tipo de gripe particular, sus sondas respectivas se iluminarán en un patrón particular en la micromatriz. El panel de sondas con sondas predeterminadas y predetectadas se muestra en la Figura 3. Todas las sondas se detectan por duplicado.

Ejemplo 2. Pruebas específicas para cepas de gripe y distintas a la gripe (resultados)

[0179] Los resultados de la correcta tipificación de H5N1, H7, H9N2 e Inf B se muestran en la Figura 4, Figura 5, Figura 6 y Figura 7. Estos se describen en mayor detalle en los Ejemplos del 3 al 6 a continuación.

[0180] Para interpretar los resultados, se define un resultado positivo con la correcta tipificación/subtipificación de gripe como el menor número de sondas (por duplicado) que constituye al menos un 50% del número total de sondas para un panel diana concreto que está iluminado. Todas las muestras probadas produjeron identificación clara de la tipificación correcta.

Ejemplo 3. Pruebas específicas para cepas de gripe y distintas a la gripe (resultados HA de H5N1)

[0181] Se usa un tránscrito de ARN *in vitro* de HA de H5N1 de su gen clonado de un solo origen para determinar la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz.

[0182] Todas las sondas de hibridación se encienden correctamente y ninguna sonda no específica en el panel se enciende en todos los chips.

[0183] Puede encontrarse un resumen de los resultados de las sondas en la Figura 4. La Figura 4 muestra la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz para el gen HA del tipo H5/ subtipo H5N1 de la gripe A.

[0184] Basándonos en las pruebas realizadas sobre la muestra de ARN, concluimos que este panel de sonda secundario es específico para el tipo H5/subtipo H5N1 de gripe A. En vista del número limitado de muestras de H5N1, se llevan a cabo otros experimentos para verificar de forma estadística la especificidad cuando se obtienen más muestras.

Ejemplo 4. Pruebas específicas para cepas de gripe y distintas a la gripe (resultados NA de H5N1)

[0185] Se usa un tránscrito de ARN *in vitro* de NA de H5N1 de su gen clonado de un solo origen para determinar la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz.

[0186] Todas las sondas de hibridación se encienden correctamente y ninguna sonda no específica en el panel se enciende en todos los chips.

[0187] Puede encontrarse un resumen de los resultados de la sonda en la Figura 5. La Figura 5 muestra la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz para el gen NA del tipo H5/subtipo H5N1 de la gripe A.

[0188] Basándonos en las pruebas realizadas sobre la muestra de ARN, concluimos que este panel de sonda secundario es específico para el tipo H5/subtipo H5N1 de gripe A. En vista del número limitado de muestras para H5N1, se llevan a cabo otros experimentos para verificar de forma estadística la especificidad cuando se obtienen más muestras.

Ejemplo 5. Pruebas específicas para cepas de gripe y distintas a la gripe (resultados HA de H7)

[0189] Se usan cuatro muestras de ARN de H7N1 para determinar la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz.

[0190] Todas las sondas de hibridación se encienden correctamente y ninguna sonda no específica en el panel se enciende en ambos los chips. El porcentaje de sondas encendidas correctamente es el 100% (2/2), que indica un resultado correcto para la muestra.

[0191] Puede encontrarse un resumen de los resultados de la sonda en la Figura 6. La Figura 6 muestra la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz para el tipo H7 de gripe A.

[0192] Basándose en las pruebas realizadas sobre 4 muestras de ARN diferentes, concluimos que este panel de sonda secundario es específico para el tipo H7 de gripe A.

Ejemplo 6. Pruebas específicas para cepas de gripe y no de gripe (resultados HA de H9N2)

[0193] Se usan dos muestras de ARN de H9N2 para determinar la especificidad de las sondas en el panel de micromatriz.

[0194] En ambos chips, se encienden correctamente tres tipos/subtipos de sondas específicas. Todas las sondas de hibridación se encienden correctamente y ninguna sonda no específica en el panel se enciende en ambos chips. El porcentaje de sondas encendidas correctamente es el 100% (3/3), que indica un resultado correcto para la muestra. Puede encontrarse un resumen de los resultados de las sondas en la Figura 7. Basándose en las pruebas realizadas sobre 2 muestras de ARN diferentes, concluimos que este panel de sonda secundario es específico para el tipo H9/subtipo H9N2 de la gripe A.

Ejemplo 7. Prueba de reactividad cruzada con virus distintos a la gripe

[0195] Se llevan a cabo pruebas de reactividad cruzada entre los subtipos de gripe y con un panel de patógenos respiratorios distintos a la gripe.

[0196] Las muestras de gripe se probaron a concentraciones de 10×10^6 copias/reacción. Los 5 virus respiratorios que no son de la gripe se obtienen del Hospital Universitario Nacional, Singapur o se adquieren de ATCC.

[0197] Los resultados se muestran en la Tabla E4 a continuación.

(-) Resultados negativos para reactividad			
(+) Resultados positivos para reactividad			
ORGANISMO	CEPA	Gripe A	Gripe B
virus de la gripe A	H1N1	(+)	(-)
	H3N2	(+)	(-)
	H5N1	(+)	(-)
	H7N1	(+)	(-)
	H9N2	(+)	(-)
virus de la gripe B		(-)	(+)
Adenovirus		(-)	(-)
virus de la parainfluenza humana		(-)	(-)
Virus sincitial respiratorio		(-)	(-)
Metaneumovirus		(-)	(-)
Rinovirus		(-)	(-)

[0198] Tabla E4. No hay reactividad cruzada de las sondas en el panel de micromatriz con virus diferentes a la gripe.

[0199] La Tabla E4 muestra que los conjuntos de cebadores y sondas VereFlu no reaccionan de forma cruzada con ningún virus diferente a la gripe y también la especificidad entre diferentes tipos/subtipos de gripe es del 100%.

Ejemplo 8 Pruebas de sensibilidad para gripe (límite de detección)

[0200] Se determinó el límite de detección (LoD) y corte del ensayo para gripe A tipo H1N1, H3N2, H5N1 y gripe B. No se usaron materiales de referencia en esta fase del desarrollo del producto.

[0201] Se usó ARN transcrito in vitro (IVT-RNA) del gen HA para H3N2 y IVT-ARN del gen HA y gen NA para H5N1. Se usó cultivo viral cuantificado (TCID50/ml) para influenza B en este estudio. Se cuantificaron las muestras de IVT-ARN mediante el bioanalizador Agilent (Kit RNA 6000 Nano), después se analizaron diluciones 1/100 de 10e7 a 10 copias/reacción de las muestras de IVT-ARN por RT-PCR en tiempo real simple usando cebadores específicos VereFlu para comprobar su funcionalidad. Se cuantificó ARN de gripe B extraído de cultivo viral mediante RT-PCR en tiempo real usando las muestras de IVT-ARN previamente cuantificadas para crear una curva estándar.

[0202] Se realizó una serie de dilución 1/10 de ARN de H3N2, gripe B y H5N1 y se probaron las diluciones para determinar la dilución que arrojaba aproximadamente un 50% de resultados positivos y un 50% de negativos. A continuación, se somete a pruebas esta dilución hasta 20 réplicas para determinar la concentración de corte. Después, se aumenta la concentración de corte dos veces y se prueba hasta en 20 réplicas. El porcentaje de resultados positivos y negativos en estas réplicas se calculó para verificar la concentración de LoD que debe arrojar aproximadamente un 95% de resultados positivos.

[0203] Los resultados se resumen en la Tabla E5 a continuación.

Tabla E5. Límite de detección de H1N1, H3N2, H5N1 y gripe B.

Tipo de muestra probada	LoD/CORTE	Resultados obtenidos
ARN de H1N1	LoD	10e2 $TCID_{50}$/ml
IVT-ARN HA H3N2	LoD	$2x10^2$ copias/reacción
	Corte	10^2 copias/reacción
IVT-ARN HA+NA H5N1	LoD	$2x10^2$ copias/reacción
	Corte	10^2 copias/reacción
ARN de virus de la gripe B	LoD	10^2 $TCID_{50}$/ml
	Corte	50 $TCID_{50}$/ml

Ejemplo 9. Ensayo clínico con muestras de paciente para la determinación de la sensibilidad

[0204] El ARN se extrae directamente de hisopados de garganta obtenidos de pacientes. El ARN se divide en 2 grupos, uno para la PCR en tiempo real y secuenciación y el otro para su uso en VereFlu.

[0205] Se extrajeron un total de 29 muestras y se identificaron por PCR en tiempo real y secuenciación.

[0206] El número de muestras y tipo de muestra se enumera en la Tabla E6.

Tabla E6. Resultados de ensayo con muestras H1, H3 y gripe B.

Tipo de muestras	Resultados "patrón de otro" ("*gold standard*") de cultivo de virus	Resultados de VereFlu	Concordancia
	H1 N475	H1N1	sí
	H1 N507	H1N1	sí
	H3 N463	H3N2	sí
	H3 N534	H3N2	sí
	H3 N530	H3N2	sí
	H3 N541	H3N2	sí
	FluB N113	Flub (gripe B)	sí
	FluB N133	Flub (gripe B)	sí
	FluB N223	Flub (gripe B)	sí
	H1 N157	H1N1	sí
	H1 N163	H1N1	sí
	H3 N185	H3N2	sí
	H3 N105	H3N2	sí
	H3 N116	H3N2	sí
	H3 N125	H3N2	sí
	H3 N127	H3N2	sí
	H3 N 196	H3N2	sí
	FluB N133	Flub (gripe B)	sí
	FluB N167	Flub (gripe B)	sí
	H1 N196	negativo	no
	H3 N 193	H3N2	sí
	H3 N201	H3N2	sí

29 muestras de pacientes	negativo N123	H3N2	no
	FluB N173	Flub (gripe B)	sí
	FluB N431	Flub (gripe B)	sí
	FluB N435	Flub (gripe B)	sí
	FluB N384	Flub (gripe B)	sí
	FluB N292	negativo	no
	FluB N416	negativo	no

[0207] En la Figura 8 se muestra un representante de las imágenes de micromatriz que muestra H5N1.

Ejemplo 10. Resultados de ensayo clínico de sensibilidad

[0208] En la Tabla E1 a continuación se puede encontrar un resumen de los resultados para el tipo H1/subtipo H1N1 de la gripe A.

		Cultivo de virus			
	VereFlu	**Positivo**	**Negativo**	**Total**	**Rendimiento**
Gripe humana A H1N1	**Positivo**	4	0	4	80% Sensibilidad (37.55%-96%) 95% CI
	Negativo	1	0	1	
	Total	5	0	5	

Tabla E1: tipo H1/subtipo H1N1 de gripe A

[0209] En la Tabla E2 a continuación se puede encontrar un resumen de los resultados para el tipo H3/subtipo H3N2 de la gripe A.

		Cultivo de virus			
	VereFlu	**Positivo**	**Negativo**	**Total**	**Rendimiento**
Gripe humana A H3N2	**Positivo**	12	1	13	100%Sensibilidad (75.75%-100%) 95% CI
	Negativo	0	0	0	
	Total	12	1	13	

Tabla E2: tipo H3/subtipo H3N2 de gripe A

[0210] En la Tabla E3 a continuación se puede encontrar un resumen de los resultados para gripe B.

Tabla E3: gripe B

		Cultivo del virus			
	VereFlu	**positivo**	**negativo**	**total**	**Rendimiento**
	positivo	9	0	9	Sensibilidad 81,8% (52,36%-94,8%) 95% CI
	negativo	2	0	2	
gripe B	**total**	11	0	11	

Ejemplos del 11 al 18. Ejemplos detallados

[0211] Los siguientes Ejemplos del 11 al 18 describen un método de uso específico de las secuencias de genes de la gripe descritas en este documento para la detección de la gripe, en especial, la detección de cepas de gripe.

[0212] Los Ejemplos hacen uso de un chip de RT-PCR e hibridación de micromatriz combinado, denominado VereFlu Lab On Chip. Sin embargo, otros usos de secuencias de genes de la gripe descritos en este documento para la detección de la gripe, en concreto, detección de cepas de gripe serán evidentes para el lector experto.

[0213] Dichos métodos pueden incluir, por ejemplo, el uso de secuencias como cebadores para la amplificación de ácido nucleico usando, por ejemplo, PCR y otros métodos de amplificación, incluyendo RT-PCR, LCR,etc. Los métodos pueden incluir el uso de las secuencias como sondas, que pueden marcarse de forma opcional, en cualquier método de hibridación de ácido nucleico, como se describe en Maniatis *et al.* o mediante hibridación en micromatriz, etc.

Ejemplo 11. Preparación preliminar, precauciones y contenidos del kit

[0214] Antes de usar este kit, por favor, realice lo siguiente:

- Comprobar el contenido del kit
- Centrifugar todos los tubos proporcionados

- DILUIR la mezcla de cebador VereFlu™ Primer Mix proporcionada

Preparación de muestras de ARN

[0215] Aunque es opcional, la adición de inhibidor de RNasa en la muestra de ARN para evitar la degradación de la muestra de ARN es altamente recomendada.

[0216] Se recomienda que el inhibidor de RNasa se añada a las muestras de ARN inmediatamente después de su preparación. Si no es posible, puede añadirse en la mezcla maestra de PCR (PCR Master Mix).

Contenidos del kit: VereFlu™ Influenza A/B Detection Kit (kit de detección de gripe A/B VereFlu) (nº catálogo.: VFLUA/B)

a) Artículos fríos:

[0217]

VereFlu™ Influenza A/B Detection Kit (Reactivos)		50 reacciones
Nº parte	**Descripción**	**Cantidad**
FLU-PMA01	Mezcla de cebadores A	1 tubo
FLU-PMB01	Mezcla de cebadores B	1 tubo
VCP-MHB01	Tampón de hibridación en micromatriz	2 tubos
VCP-CTL02	Control PCR	1 tubo

b) artículos a temperatura ambiente:

[0218]

VereFlu™ Influenza A/B Detection Kit (Chips de detección)		50 reacciones
Nº parte	**Descripción**	**Cantidad**
FLU-33	Chips de detección VereFlu™ (25 Chips)	2 cajas
COT-01	Abrazaderas PCR (55 abrazaderas de salida)	1 bolsa
CIN-01	Abrazaderas IN (55 abrazaderas de entrada)	2 bolsas
CHY-01	Abrazaderas Hyb (55 abrazaderas de hibridación)	1 bolsa
VCP-WBC01	Concentrado de tampón de lavado, 150 ml	1 botella
-	Botella vacía para dilución de tampón de lavado (1 L)	1 botella

Materiales y dispositivos adicionales necesarios pero no proporcionados

[0219]

- QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen (Nº Cat. 52904) o equivalente
- Quantitect Virus + ROX Vial Kit, Qiagen (Nº Cat. 211031)
- Inhibidor de RNasa (recomendado: Promega Nº Cat. N2111)
- Guantes sin polvo desechables
- Micropipetas (ajustables) y respectivas puntas con filtro estériles
- Puntas con filtro estériles, Axygen (Nº Cat TF-100-L-R-S)
- Tubos de centrifugación estériles de 50 ml (sin faldón)
- Centrifugadora con rotor o adaptador para tubo de centrifugación de 50 ml (sin faldón)
- Unidad refrigeradora o hielo

Ejemplo 12. Condiciones de almacenamiento

[0220] Todos los artículos del VereFluTM Influenza A/B Detection Kit (reactivos) deberían almacenarse a -20ºC y son estables hasta la fecha de expiración mostrada en la etiqueta del tubo. Debería evitarse la repetida descongelación y congelación (>6x), puesto que reduce la sensibilidad de los componentes.

[0221] Todos los artículos del VereFluTM Influenza A/B Detection Kit (chips de detección) deberían almacenarse a 25ºC y son estables hasta la fecha de expiración mostrada en la etiqueta. Puede ocurrir precipitación o cristalización en los tampones de lavado cuando se almacene en condiciones de bajas temperaturas.

Ejemplo 13. Precauciones generales

[0222] El usuario debería prestar atención siempre a lo siguiente:

- Todas las muestras deberían tratarse como potencialmente infecciosas.
- Las muestras clínicas de seres humanos, aves o cerdos nunca deberían procesarse en el mismo laboratorio.
- Usar puntas de pipeta estériles con filtros.
- Usar pipeta designada para cada reactivo, si es posible.
- Almacenar y extraer muestras por separado de todo el resto de reactivos.
- La muestra extraída debería añadirse a la mezcla de reacción en un área separada.
- Manejar el control positivo proporcionado en el kit cuidadosamente. No contaminar la muestra con control positivo.
- Descongelar todos los componentes cuidadosamente en hielo antes de comenzar.
- Tras la descongelación, centrifugar brevemente los componentes.
- Trabajar rápidamente en hielo.
- Cumplir siempre las reglas de seguridad de laboratorio y procedimientos según la definición realizada por las pautas o regulaciones de seguridad de peligro biológico aprobadas.

Ejemplo 14. Precauciones adicionales al tratar muestras de ARN

[0223]

- El usuario debería prestar especial atención siempre a lo siguiente:
- Llevar siempre guantes al manejar reactivos y muestras de ARN.
- Usar solo materiales de plástico desechables libres de RNasa y estériles.
- El trabajo con ARN debería realizarse en un área separada.

Ejemplo 15. Control de calidad

[0224] Bajo el programa de garantía de calidad de Veredus, el rendimiento de nuestro VereFluTM Influenza A/B Detection Kit se supervisa de forma rutinaria y lote por lote. Se realiza un muestreo en cada lote y se llevan a cabo pruebas mediante amplificación de los respectivos genes del plásmido viral de control.

Ejemplo 16. Principio de uso del kit

[0225] Los virus de la gripe aviar son virus *Orthomyxoviridae* de tipo A que infectan a las aves y, en ocasiones, a los seres humanos. Los virus se dividen en subtipos basándose en sus proteínas

superficiales - hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se conocen dieciséis subtipos H. Las variedades altamente patógenas son de los subtipos H5 y H7. Se sabe que tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos subtipos de NA (N1 y N2) circulan entre seres humanos.

[0226] VereFlu™ es una prueba de diagnóstico rápido que usa la plataforma LOC para identificar y diferenciar todos los tipos humanos de gripe A y B, con especial énfasis en la identificación de H5N1. VereFlu™ consta de un chip de silicio que integra un reactor en miniatura ultra rápido para la transcripción inversa de ARN, amplificación de ADN basada en PCR y una micromatriz personalizada de alta calidad para una detección rápida y eficaz de la gripe.

[0227] Al combinar dos tecnologías sólidas y que han superado la prueba del tiempo, PCR y micromatriz de ADN en un solo chip, hemos creado una prueba que combina la alta sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la poderosa capacidad de identificación de la micromatriz para dar respuestas a múltiples preguntas en el menor intervalo de tiempo posible en una sola prueba.

[0228] Cualquier muestra positiva debería remitirse a un centro nacional de control de la gripe o un centro colaborador de la OMS para referencia e investigación de la gripe y someterla a mayores pruebas.

Ejemplo 17. Protocolo para VereFlu™ Influenza A/B Detection

[0229] OBSERVACIONES: El siguiente protocolo se debe usar únicamente con Qiagen QuantiTect Virus +ROX Vial Kit.

[0230] OBSERVACIONES: Usar mezcla de cebadores A para la detección de H1N1, H3N2, H5N1 o gripe B. Usar mezcla de cebadores B para la detección de los subtipos H7 y H9N2.

i) Añadir los componentes en el orden siguiente en el tubo de PCR estéril en hielo.

[0231]

Componente	**Volumen**
Master Mix (mezcla maestra)	
5 X Tampón QuantiTect Virus +ROX Vial Kit	5,0 µl
Mezcla de cebador A (o B)	1,0 µl
H_2O grado PCR	3,0µl
Inhibidor RNasa (20 U/µl)	0,5 µl **
Mezcla de enzima QuantiTect Virus +ROX Vial Kit	0,5 µl
Control PCR	5,0 µl
Plantilla de ARN	10,0 µl
Volumen final	**25** µl
** Opcional pero altamente recomendado	

[0232] Para preparar la mezcla maestra de PCR para más de una reacción, multiplique la cantidad en

la columna "volumen" anterior por el número de reacciones.

[0233] **OBSERVACIONES:** Preparar siempre 1-2 reacciones más que el número de reacciones real.

Carga de la mezcla RT-PCR en VereFlu™ Lab-On-Chip

[0234]

i) Los siguientes componentes son necesarios para la carga de la mezcla de RT-PCR en el chip:

Abrazadera **IN** (marcada "2IN")

Abrazadera **PCR** (marcada "1PCR")

Abrazadera **HYB** (sin marcar)

Soporte del chip

Pipeta y puntas

ii) Insertar el VereFlu™ Lab-On-Chip en el soporte específico para asegurar una sujeción segura.

iii) Usar una pipeta calibrada de 20 µl para cargar cada entrada. El volumen de la mezcla de RT-PCR que puede dispensarse es 11,5 µl para cada entrada (configurar la pipeta en consecuencia usando la perilla de ajuste), dando así un volumen de mezcla general de 23 µl por chip.

iv) Sostener la pipeta en posición vertical, de forma que la punta (actualmente ***Axygen*** *TF-100-L-R-S, Maxymum Recovery)* esté perpendicular a la superficie.

v) Ajustar la punta exactamente en el orificio de entrada, asegurándose de que se asienta de forma firme (véase Figura 9A).

vi) Aplicar presión leve sobre la punta, presionar el émbolo suavemente hasta la primera posición de parada (véase Figura 9B), permitiendo que la mezcla fluya a la cámara de PCR.

vii) No presionar el émbolo más allá de la primera parada ya que esto introducirá aire en el chip y desplazará la mezcla cargada al pocillo de la micromatriz. Mantenga el émbolo en la primera parada hasta que retire la punta del agujero de entrada (este procedimiento evita derramamiento y la inyección de aire dentro de las cámaras).

[0235] Presionar y liberar el émbolo de la pipeta lentamente en todo momento. Nunca permitir que el botón pulsado vuelva hacia atrás. Comprobar la presencia de partículas extrañas en la punta. Sostener la pipeta en una posición vertical mientras aspire líquido.

Sellado del chip para fase de RT-PCR

[0236]

i) Se muestran las abrazaderas de sellado IN y PCR en la Figura 10. Una abrazadera (marcada "2IN") se ocupa del sellado de los orificios de entrada, y la otra (marcada "1PCR") del sellado de los orificios de salida durante los ciclos de PCR.

ii) Las partes inferiores de las abrazaderas son diferentes, debido a su función de sellado específica; la abrazadera IN tiene (Figura 11, a la izquierda) un elastómero con una protuberancia rectangular de dimensiones 3 x 7 mm (esta protuberancia sella los orificios de entrada) y un pasador de alineamiento que ajusta el orificio correspondiente en el chip (Figura

12); la abrazadera de PCR (Figura 12, a la derecha) tiene un elastómero con una protuberancia rectangular de dimensiones 1,2 x 7 mm (esta protuberancia sella los orificios de salida) y dos pasadores de alineamiento que ajustan los orificios correspondientes en el chip (Figura 12).

iii) Acoplar primero la abrazadera PCR **(1PCR)**, presionando las aletas laterales y situando el pasador en el orificio de alineamiento (Figura 12). Tras alcanzar la posición final (la parte sólida de la abrazadera toca el extremo del chip), liberar las aletas y presionar la parte superior de la abrazadera hasta escuchar un "clic".

iv) Acoplar la abrazadera IN (**2IN**) mediante el mismo procedimiento que la abrazadera PCR (Figura 12).

v) Tras sellar el chip (Figura 13), sacarlo del soporte e insertarlo en la bandeja de la estructura del módulo de control de temperatura (TCM, en inglés) para comenzar el ciclo térmico.

[0237] Configurar el programa de protocolo de la siguiente manera:

Condiciones de ciclo térmico:

Retención inicial:

50ºC durante 20 min

Desnaturalización inicial:

95ºC durante 5 min

Protocolo PCR:

95ºC **durante 15 s**
50ºC **durante 30 s**
72ºC **durante 45 s**
} **45 ciclos**

Desnaturalización:

95ºC durante 2 min

Hibridación:

55ºC durante 30 min

[0238] Una vez que se ha completado el último paso de extensión del protocolo, el protocolo no continuará más allá hasta que el chip esté preparado para el proceso de hibridación.

Hibridación en micromatriz

[0239] Observación importante: Descongelar el tampón de hibridación en micromatriz a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de su uso. Mantener el tampón de hibridación en micromatriz fuera del alcance de la luz hasta que esté listo para usar y mezclar suavemente antes de usar en caso de precipitación.

i) Sacar el VereFlu™ Lab-On-Chip de la TCM cuando se solicite.

ii) Insertar el VereFlu™ Lab-On-Chip en el soporte específico para asegurar una sujeción segura. Quitar las abrazaderas IN y PCR y desecharlas. NO reutilizar las abrazaderas.

iii) Usar una pipeta calibrada para rellenar cada entrada con 14,5 µl de tampón de hibridación. El volumen total de tampón de hibridación usado para cada chip es de 29 µl. Usar una punta nueva para cada carga para evitar la contaminación.

iv) Sostener la pipeta de forma que la punta esté perpendicular a la superficie.

v) Ajustar la punta exactamente en los orificios de entrada, asegurándose de que se asienta en el orificio de entrada. No aplicar presión excesiva sobre la punta.

vi) Administrar el volumen predeterminado presionando suavemente el émbolo hasta la primera posición de parada. La mezcla de RT-PCR contenida dentro de los canales será desplazada por el tampón de hibridación y se observará como se llena en la cámara de micromatriz (Figura 14).

Sellado del chip para fase de hibridación

[0240]

i) Preparar un nuevo conjunto de abrazaderas de entrada (IN) e hibridación (clara).

ii) La abrazadera de hibridación tiene una superficie de PDMS plana, de 100 µm de profundidad producida en la junta y una zanja alrededor utilizada para acomodar el aire desplazado por la solución (Figura 15).

iii) Sellar las entradas usando primero la abrazadera IN (Figura 16A).

iv) Sellar la cámara de la micromatriz cuidadosamente usando la abrazadera de hibridación, asegurándose de que no se introducen burbujas en la cámara (Figura 16B).

v) En caso de que se formen burbujas durante el sellado de la cámara de la micromatriz, golpee el chip suavemente con el banco de trabajo, con la micromatriz más cerca de la superficie del banco. Esto hará que las burbujas migren al borde de salida de la cámara de RT-PCR donde no hay sondas.

vi) Extraer el VereFlu™ Lab-On-Chip de su soporte, asegurándose de que las abrazaderas se sujetan firmemente en su posición. vii) Cargar el chip sellado en el respectivo TCM. Pulsar "start" cuando se le solicite.

viii) Cuando la hibridación esté completada, extraer el chip del TCM.

Lavado de la micromatriz

[0241] Observación importante: En caso de precipitación o cristalización en el concentrado de tampón de lavado, calentar la botella completa de tampón en un baño de agua a 40ºC durante aproximadamente 15 minutos o hasta que se disuelvan los cristales. Mezclar completamente antes de usar.

[0242] Medir 50 ml del concentrado de tampón de lavado en la botella de 1 litro vacía suministrada. Llenar la botella de 1 litro con agua libre de RNasa/DNasa hasta la marca de 1000 ml.

[0243] Preparar y llenar los tubos de centrifugación de 50 ml sin faldón proporcionados con 50 ml del tampón de lavado preparado.

[0244] Insertar el chip con el extremo de la micromatriz en la parte superior en el tubo de centrifugación. Enroscar el tapón del tubo.

[0245] Situar el tubo con el lado de la micromatriz orientado hacia el rotor en la centrifugadora y centrifugar el tubo a

3000 rpm durante 1 min.

[0246] Tras la centrifugación, extraer el chip y situarlo en el lector óptico para su análisis.

Ejemplo 18. Análisis e interpretación de resultados de la micromatriz

[0247] Para cualquier cepa y tipo de gripe particular, sus sondas respectivas se iluminarán en un patrón particular en la micromatriz. En la Figura 8 se muestra una imagen de la micromatriz representativa usando H5N 1.

[0248] Para que una muestra resulte positiva para ese tipo de gripe concreto, deben satisfacerse determinados criterios. Este criterio se denomina Normas de Diagnóstico y puede modificarse para adecuarse a diferentes requisitos. El software de análisis de micromatriz de plataforma VereID se basa en este conjunto de normas para determinar el diagnóstico de la muestra.

[0249] El conjunto de Normas de Diagnóstico para VereFlu™ puede encontrarse en el siguiente ejemplo.

Procedimiento:

[0250] Ejecutar la herramienta E@syCheck. Se muestra una "New Report Window" (nueva ventana de informe) para crear un nuevo informe de chip.

ii) Situar el cursor en el área de texto en la columna "Lot" (lote). Usar un lector de códigos de barras para escanear el código de barras situado en el LOC. El código de barras también puede teclearse manualmente en el área de texto.

ii) Insertar el chip en el lector óptico y llevar a cabo un "Acquisition/Analysis" (registro/análisis). Observación: Antes de comenzar esta operación, puedes visualizar la información del chip obtenido por el archivo IPD:

iii) Elegir la opción "Acquisition/Analysis" (registro/análisis) por el cuadro combinado mostrado en la misma fila o pulsar el botón de "Acquisition and Analysis" en la barra de herramientas o seleccionar la opción "Tools→ Acquisition and Analysis" del menú.

[0251] Cuando empieza la operación "Acquisition/Analysis", la barra de progreso cerca del cuadro combinado avanza.

[0252] Durante este proceso, se llevan a cabo las siguientes operaciones:

Si no ocurre ningún error durante el registro de imagen del lab-on-chip, la imagen obtenida se guarda automáticamente en el disco en la carpeta "VereIDPlatform\Common\Sample" con el nombre "Lot-wafer-chip.tif'.

[0253] La imagen se analiza usando el protocolo de análisis de imágenes y los archivos del dispositivo asociados al chip por el archivo idp o seleccionados por el usuario.

Ejemplo 19. Detección del virus de la gripe usando el sistema VereChip

[0254] En un modo de realización, describimos un sistema de prueba que puede llevarse a cabo en un solo chip de silicio que integra un reactor en miniatura ultra rápido para la transcripción inversa de ARN, amplificación de ADN basada en PCR y una micromatriz personalizada de alta calidad para la detección rápida y precisa de la gripe. El sistema se denomina por conveniencia sistema "VereFlu" y no debería considerarse que limite la revelación contenida en este documento.

[0255] Por lo tanto, revelamos un método y kit para determinar la presencia o ausencia; y/o detección, diferenciación e identificación de una cepa y/o subtipo de gripe en una muestra biológica o a partir de material biológico aislado y/o purificado a partir de una muestra biológica.

[0256] Proporcionamos un enfoque novedoso mediante integración de la amplificación por PCR e hibridación en micromatriz en un solo chip de silicio (VereFlu). Esta prueba combina la alta sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la potente capacidad de identificación de la micromatriz para proporcionar respuestas a las preguntas múltiples en el plazo de tiempo más corto posible en una sola prueba. Mediante el uso de las sondas y/o cebadores descritos aquí, el/los método(s) y/o kit(s) se hacen más sensibles y/o específicos que otros métodos de detección de la técnica precedente.

[0257] Actuando como un reactor de PCR completamente integrado, el chip permite a los usuarios ejecutar protocolos de amplificación multiplex para dos genes (HA, NA) de la gripe. El material altamente conductor, calentadores integrados y sensores de temperatura permiten un excelente control y velocidad de los ciclos de temperatura de PCR, dando como resultado productos de PCR más específicos en un plazo de 45 a 100 minutos.

[0258] La capacidad de diagnóstico del chip VereFlu es una integración de las 3 tecnologías siguientes:

1. Preparación de la muestra : mediante un chip de preparación de la muestra de ARN que estará integrado en el dispositivo completo o en un dispositivo independiente. Actualmente, la preparación de la muestra se realiza fuera del chip usando kits de extracción de ARN comerciales.

2. RT-PCR multiplex: esto se lleva a cabo en el reactor miniaturizado ultra rápido del chip VereFlu. Los cebadores de PCR se diseñan para dirigirse a los diferentes genes de gripe A (incluyendo sus diferentes subtipos) y gripe B. También se incluyen plásmido y cebadores de control como controles positivos.

3. Micromatriz: Se han diseñado sondas de ADN para detectar los genes diana de la gripe A (incluyendo sus diferentes subtipos) y gripe B. Las sondas se identifican en la cámara de la micromatriz del chip, donde se producirá la hibridación con los productos amplificados del minirreactor de PCR. Los resultados de la micromatriz se leerán mediante un lector óptico que permitirá la detección e identificación rápida y precisa del subtipo de gripe.

[0259] VereFlu puede usarse junto con la plataforma VereID™ que consta de: VereChip, termociclador VereID™ (TCS), lector óptico VereID™ (OR) y software VereID™ Biosystem.

Detección

[0260] Tras la hibridación, el chip se somete a un breve lavado antes de analizarse en el lector óptico.

[0261] Un sistema de software controla la operación del sistema de prueba completo. El sistema de software analiza los resultados de imagen obtenidos de la micromatriz.

[0262] El software Easy-Check determina automáticamente los resultados de la muestra. La interpretación de los resultados de la muestra de ensayo es la siguiente:

Un algoritmo de alineamiento en cuadrícula automático alinea una cuadrícula virtual sobre la micromatriz utilizando las características de esquina como referencia.

[0263] Cada celda de la cuadrícula virtual que contiene una característica es segmentada utilizando el cálculo del histograma y dos umbrales de percentiles para identificar el área de fondo y dos umbrales de percentiles para identificar el área de señal. El diseño de la micromatriz se mapea sobre la cuadrícula virtual. Cada nombre de característica de la micromatriz está conectado con una celda

específica de la cuadrícula virtual.

[0264] El área de señal se usa para calcular la MEDIANA DE SEÑAL y otras características del punto, mientras que el área de fondo se usa para calcular la MEDIANA DE FONDO y otras características del punto

[0265] Las Normas ON/OFF se aplican para asignar a cada punto el valor de ENCENDIDO (símbolo=1) o APAGADO (símbolo=0)

P.ej. Norma On/Off: *"Mediana de señal/mediana de fondo> 3 * max (med señal/med fondo) de controles negativos".*

[0266] La matriz 1/0 (encendido/apagado) se somete a un conjunto de normas sobre controles.

[0267] P.ej., Norma sobre control: *"Control de hibridación encendido=11"* significa que se tienen que encender exactamente *11* controles de hibridación. Se han contado todos los controles de hibridación sin considerar réplicas eventuales.

[0268] La matriz 1/0 (encendido/apagado) se somete a una norma de diagnóstico. La norma de diagnóstico especifica, para cada diana, el número mínimo de sondas que deben encenderse para dar un resultado positivo.

[0269] P.ej. Norma de diagnóstico: "Diana H3N2: sonda encendida ≥ 4" significa que el resultado será positivo si el SW encuentra al menos 4 sondas relacionadas con H3N2 que están encendidas.

Ejemplo 20. Métodos para modificar o adaptar nuevos biomarcadores - Actualización del panel de la gripe

[0270] Para comprender plenamente el potencial de diagnóstico de la plataforma LOC, se realizarán esfuerzos de manera constante para verificar la relevancia de la sonda en situaciones presentes.

[0271] Las bases de datos establecidas, p.ej., NCBI, se rastrearán para encontrar las últimas secuencias actualizadas. Las colaboraciones con centros de la gripe de la OMS y ministerios gubernamentales también permitirán que los datos esenciales y actualizados estén disponibles rápidamente. Una vez que se produce una mutación significativa y es detectada, se pueden diseñar y evaluar nuevas pruebas rápidamente para detectar la nueva cepa emergente siguiendo el proceso de diseño de sonda. El tiempo que lleva el descubrimiento de una mutación significativa para la actualización de la sonda de micromatriz tiene lugar en un periodo corto de aproximadamente un mes. Este proceso permitirá que el panel de la micromatriz esté tan actualizado y sea tan relevante como sea posible en relación con la situación sobre el terreno presente.

[0272] Varias modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la invención pueden ser evidentes para aquellos con experiencia en la técnica sin salir del alcance de la invención según la definición en las reivindicaciones adjuntas. Aunque se ha descrito la invención en relación con los modos de realización preferidos específicos, debería entenderse que la invención tal y como se reivindica no debe limitarse de forma indebida a dichos modos de realización específicos.

Reivindicaciones

1. Una combinación de ácidos nucleicos que comprende cebadores de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16 como se muestra en la Tabla D1, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas, para la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de virus de la gripe, y sondas de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Tabla D2, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tenga al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas, donde las sondas se inmovilizan y son capaces de hibridar con una secuencia de virus de la gripe.

2. La combinación de la reivindicación 1, en la que las sondas se inmovilizan en la forma de una matriz.

3. La combinación de la reivindicación 2, en la que la matriz es una micromatriz.

4. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la combinación comprende también una o más de las secuencias de cebadores presentadas en la Tabla D3.

5. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la combinación comprende también una o más de las secuencias de sonda presentadas en la Tabla D4.

6. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones previas para su uso en un dispositivo que comprende una primera cámara para la amplificación de ácido nucleico de la secuencia de virus de la gripe usando los cebadores y una segunda cámara para la hibridación de ácido nucleico de la secuencia de virus de la gripe usando las sondas inmovilizadas.

7. La combinación de la reivindicación 6, en la que la primera y segunda cámara del dispositivo se encuentran en conexión de fluido.

8. Un método para detectar una secuencia de virus de la gripe en una muestra biológica y/o determinar la cepa de una secuencia de virus de la gripe en una muestra biológica, que comprende:

a) llevar a cabo una amplificación de ácido nucleico que comprende amplificar la secuencia de virus de la gripe para producir amplicones usando cebadores de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16 como se muestra en la Tabla D1, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tenga al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas;

b) llevar a cabo una hibridación de ácido nucleico que comprende hibridar la secuencia de virus de la gripe amplificada a sondas inmovilizadas de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Tabla D2, o una variante, homólogo, derivado o fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud de las mismas que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas; y

c) detectar el enlace entre la sonda inmovilizada y la secuencia de virus de la gripe amplificada.

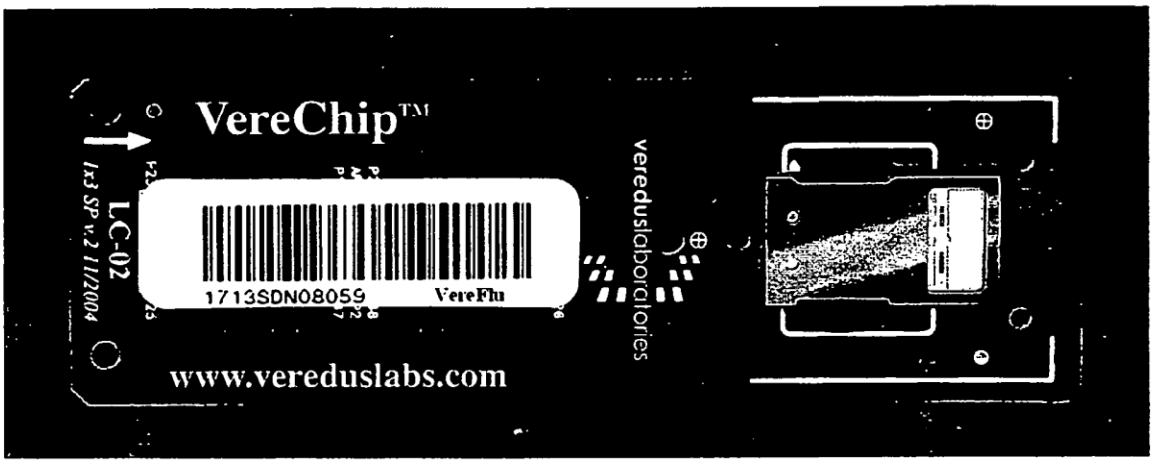
9. El método de la reivindicación 8, en el que el paso de amplificación de ácido nucleico a) se lleva a cabo en una primera cámara de un dispositivo, y el paso de hibridación de ácido nucleico b) se lleva a cabo en una segunda cámara del dispositivo.

10. El método de la reivindicación 8 o 9, en el que el método es capaz de realizar una detección multiplex de dianas.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 10, en la que el paso de amplificación de ácido nucleico a) comprende además amplificar la secuencia de gripe usando una o más de las secuencias de cebadores presentadas en la Tabla D3.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 11, en el que el paso de hibridación de ácido nucleico b) comprende además hibridar la secuencia de gripe usando una o más de las secuencias de sonda presentadas en la Tabla D4.

FIGURA 1A


VereChip™
LC-02
1713SDN08059
VereFlu
www.vereduslabs.com
vereduslaboratories

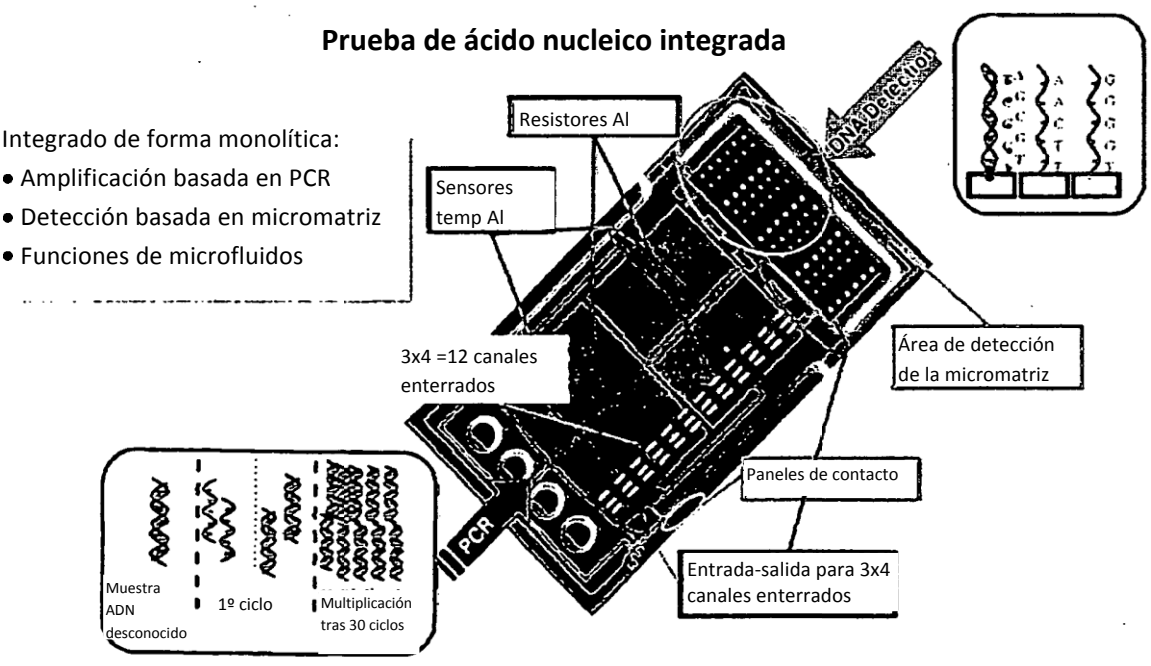

Prueba de ácido nucleico integrada
Integrado de forma monolítica:
• Amplificación basada en PCR
• Detección basada en micromatriz
• Funciones de microfluidos
Resistores Al
Sensores temp Al
3x4 =12 canales enterrados
Área de detección de la micromatriz
Paneles de contacto
Entrada-salida para 3x4 canales enterrados
DNA detección
PCR
Muestra ADN desconocido
1º ciclo
Multiplicación tras 30 ciclos

FIGURA 1B

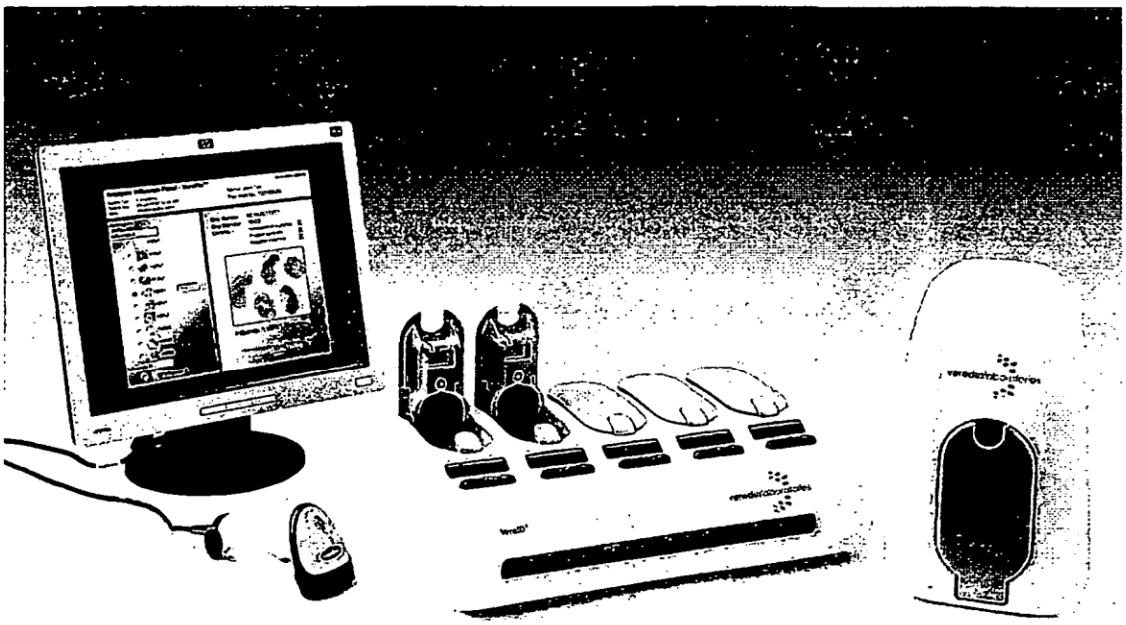


FIGURA 2

Extracción ARN viral

(Recomendado: QIAamp

RT-PCR de ARN viral extraído usando
VereFlu ™ Lab-on-Chip
& QIAGEN OneStep RT-PCR Kit
(Recomendado)

Hibridación de producto de RT-PCR en la micromatriz

Lavado de la micromatriz

Análisis de resultados de micromatriz

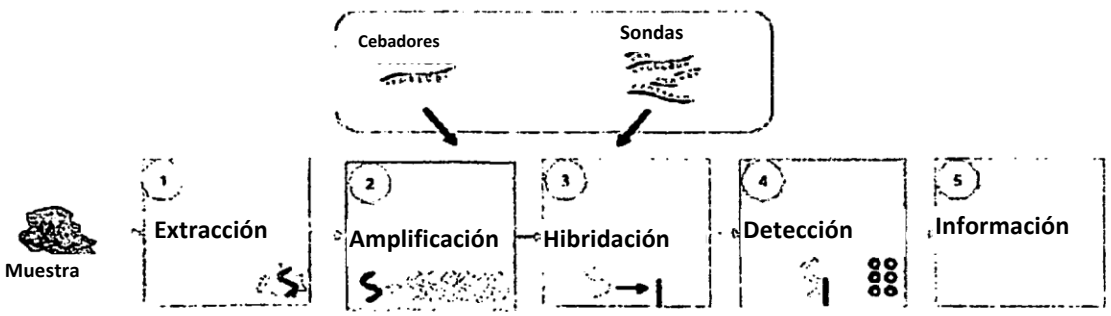
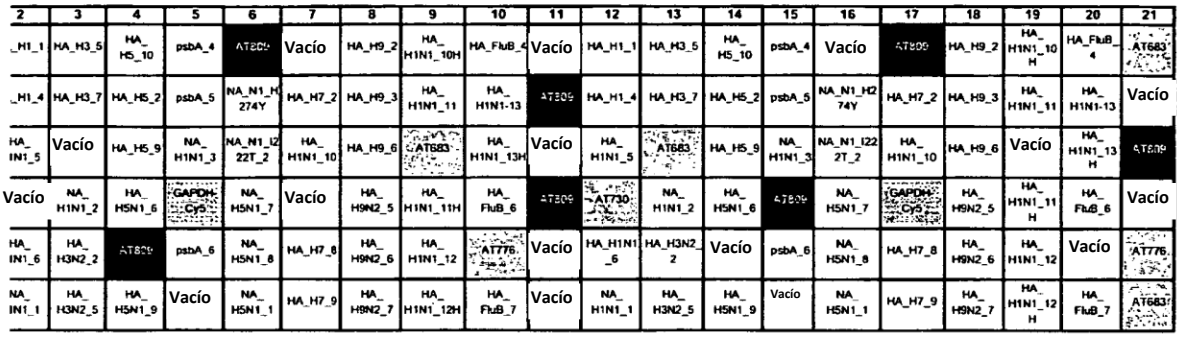


FIGURA 3



2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
_H1_1	HA_H3_5	HA_ H5_10	psbA_4	AT809	Vacío	HA_H9_2	HA_ H1N1_10H	HA_FluB_4	Vacío	HA_H1_1	HA_H3_5	HA_ H5_10	psbA_4	Vacío	AT809	HA_H9_2	HA_ H1N1_10 H	HA_FluB_ 4	AT683
_H1_4	HA_H3_7	HA_H5_2	psbA_5	NA_N1_H 274Y	HA_H7_2	HA_H9_3	HA_ H1N1_11	HA_ H1N1-13	AT809	HA_H1_4	HA_H3_7	HA_H5_2	psbA_5	NA_N1_H2 74Y	HA_H7_2	HA_H9_3	HA_ H1N1_11	HA_ H1N1-13	Vacío
HA_ IN1_5	Vacío	HA_H5_9	NA_ H1N1_3	NA_N1_I2 22T_2	HA_ H1N1_10	HA_H9_6	AT683	HA_ H1N1_13H	Vacío	HA_ H1N1_5	AT683	HA_H5_9	NA_ H1N1_3	NA_N1_I22 2T_2	HA_ H1N1_10	HA_H9_6	Vacío	HA_ H1N1_13 H	AT809
Vacío	NA_ H1N1_2	HA_ H5N1_6	GAPDH-Cy5	NA_ H5N1_7	Vacío	HA_ H9N2_5	HA_ H1N1_11H	HA_ FluB_6	AT809	AT730	NA_ H1N1_2	HA_ H5N1_6	AT809	NA_ H5N1_7	GAPDH-Cy5	HA_ H9N2_5	HA_ H1N1_11 H	HA_ FluB_6	Vacío
HA_ IN1_6	HA_ H3N2_2	AT809	psbA_6	NA_ H5N1_8	HA_H7_8	HA_ H9N2_6	HA_ H1N1_12	AT776	Vacío	HA_H1N1 _6	HA_H3N2_ 2	Vacío	psbA_6	NA_ H5N1_8	HA_H7_8	HA_ H9N2_6	HA_ H1N1_12	Vacío	AT776
NA_ IN1_1	HA_ H3N2_5	HA_ H5N1_9	Vacío	NA_ H5N1_1	HA_H7_9	HA_ H9N2_7	HA_ H1N1_12H	HA_ FluB_7	Vacío	NA_ H1N1_1	HA_ H3N2_5	HA_ H5N1_9	Vacío	NA_ H5N1_1	HA_H7_9	HA_ H9N2_7	HA_ H1N1_12 H	HA_ FluB_7	AT683

FIGURA 4

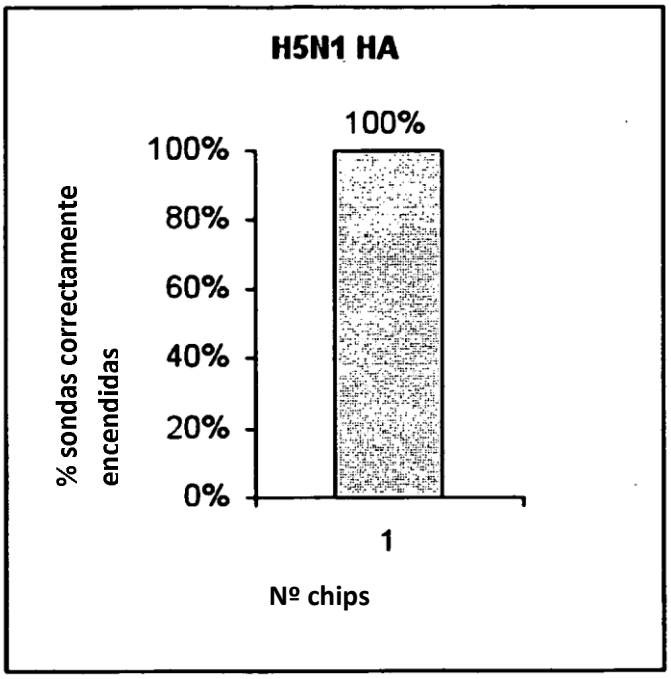


FIGURA 5

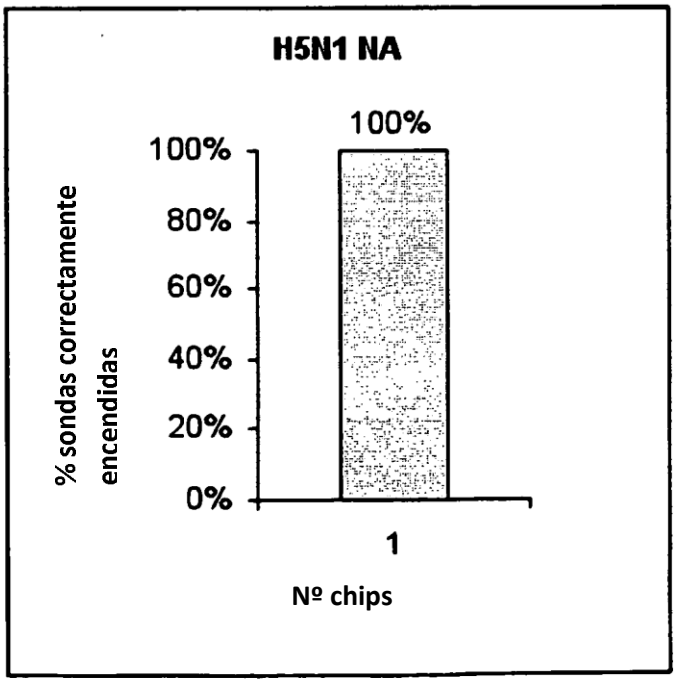


FIGURA 6

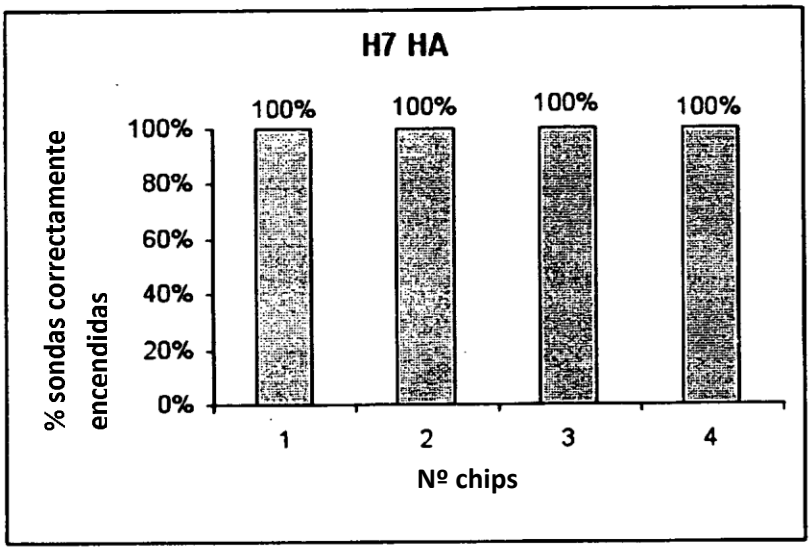


FIGURA 7

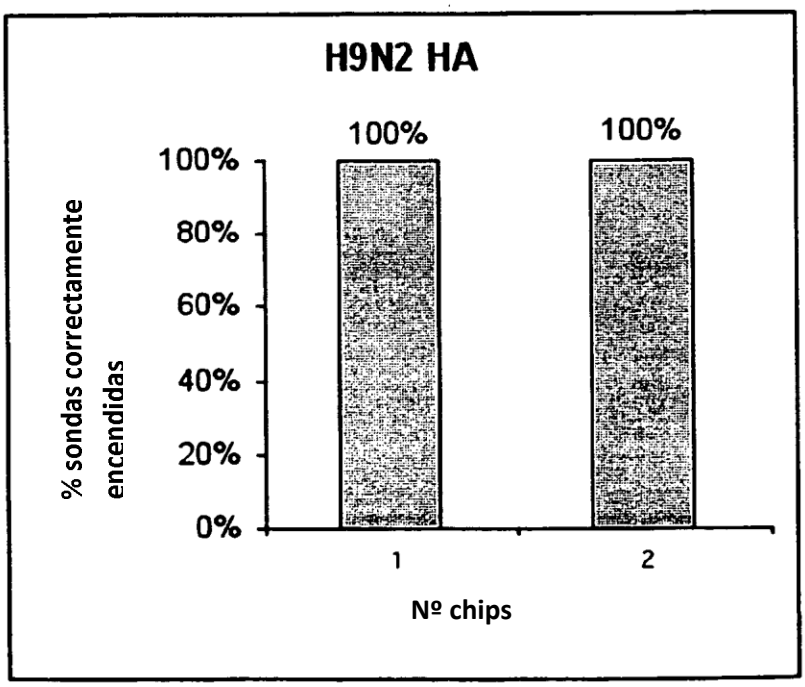


FIGURA 8

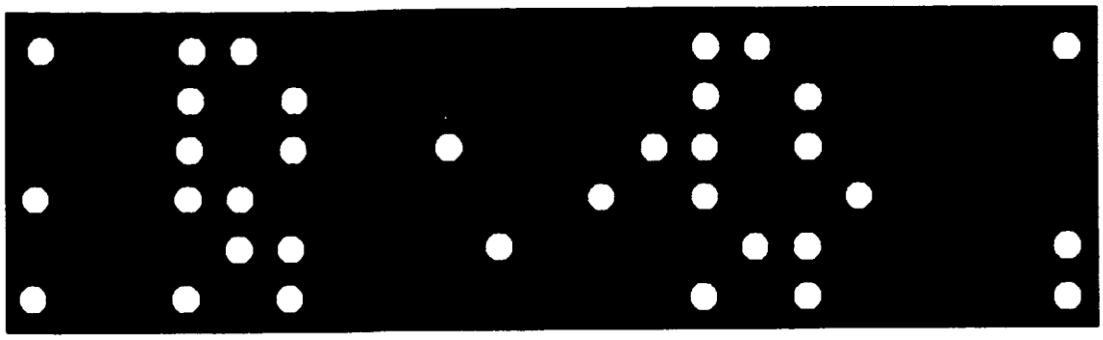
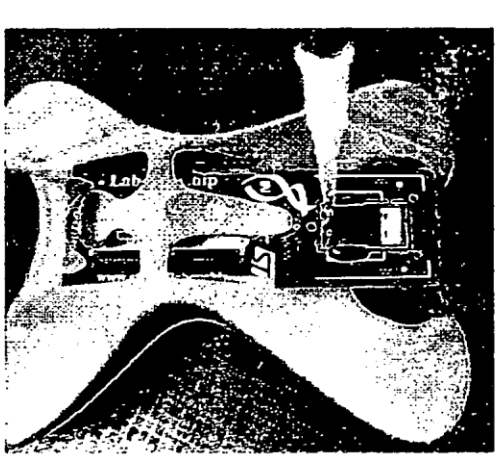


FIGURA 9



(a)

(b)

FIGURA 10

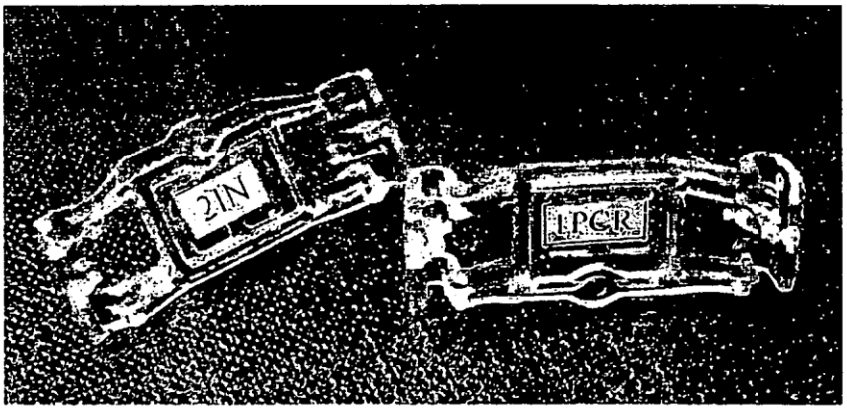


FIGURA 11

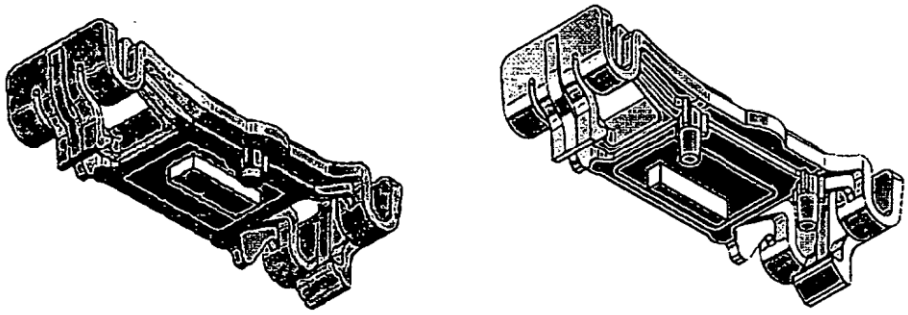


FIGURA 12

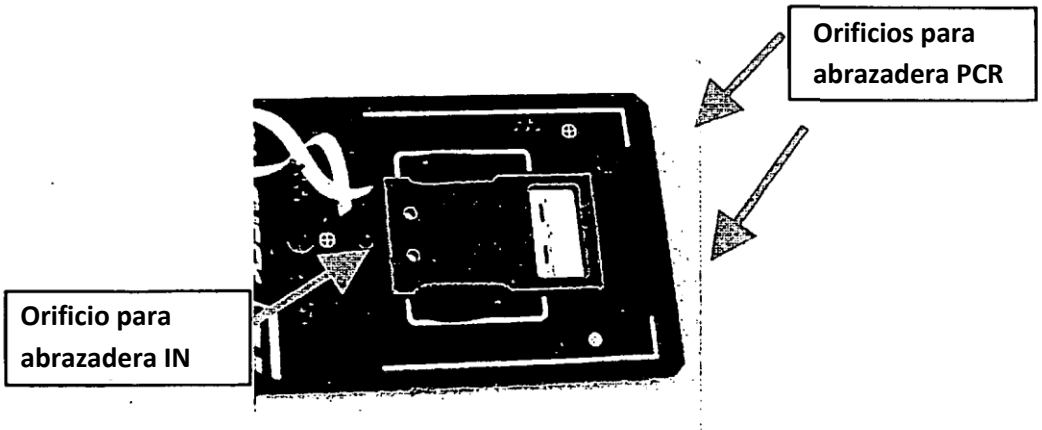


FIGURA 13

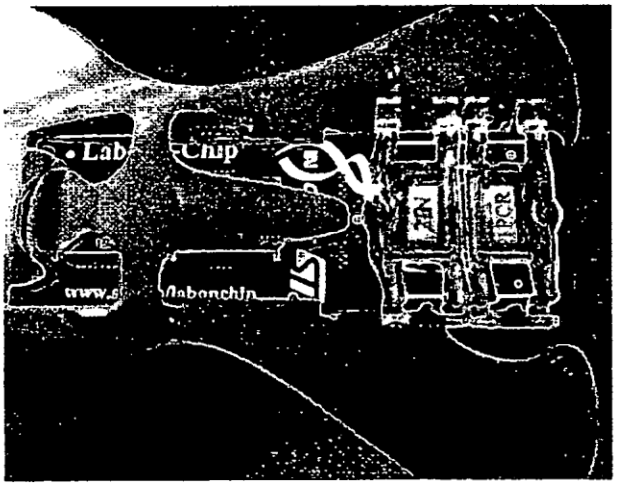
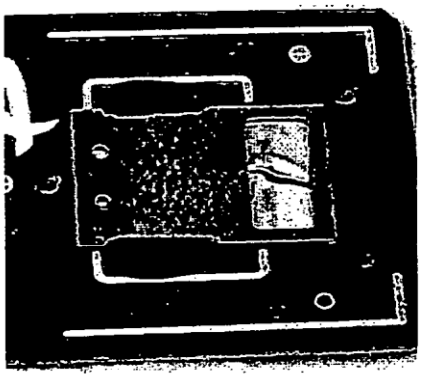


FIGURA 14



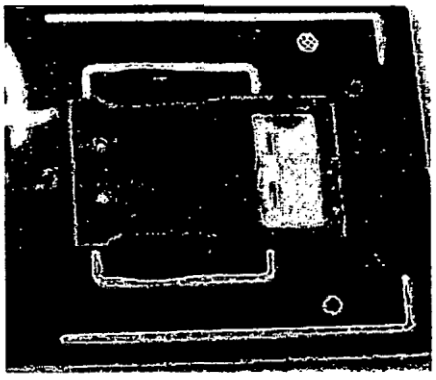


FIGURA 15

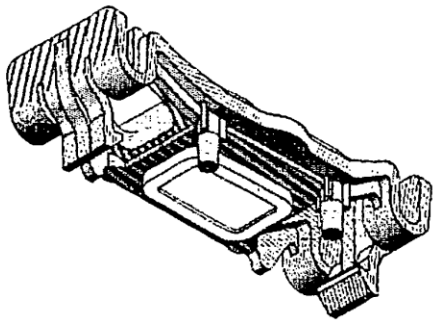


FIGURA 16A

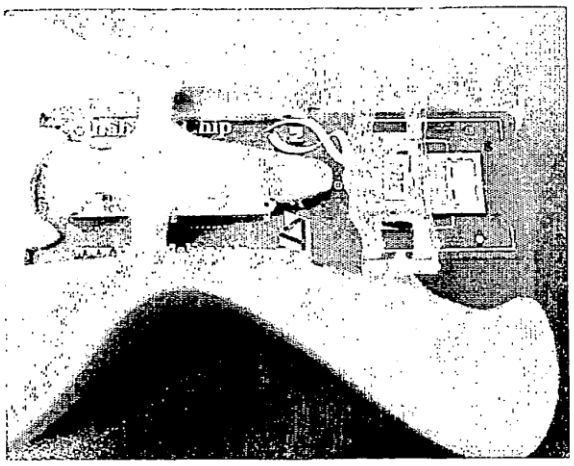
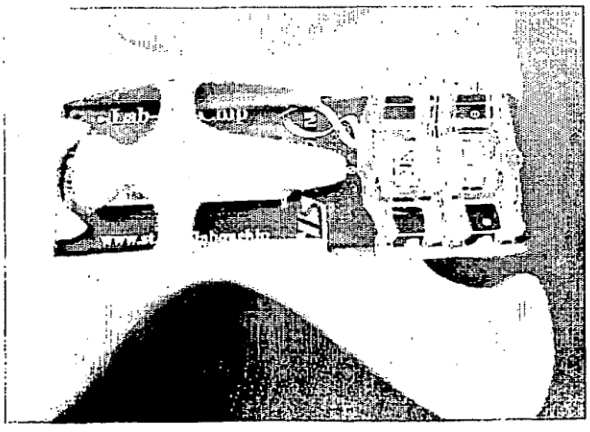



FIGURA 16B