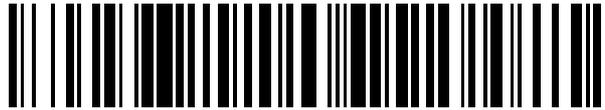


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 620**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009 E 09754142 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2300623**

54 Título: **Método para detectar agentes virales respiratorios en una muestra de ensayo**

30 Prioridad:

30.05.2008 GB 0809881

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

16.10.2013

73 Titular/es:

**GENOMICA S.A.U. (100.0%)
C/ Alcarria 7 Polígono Industrial de Coslada
28820 Coslada, Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**VILLAHERMOSA JAÉN, MARÍA L.;
MOSCOSO DEL PRADO, JUAN y
ALEMAN, AINEL**

74 Agente/Representante:

BALLESTER CAÑIZARES, Rosalía

ES 2 425 620 T3

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

MÉTODO PARA DETECTAR AGENTES VIRALES RESPIRATORIOS EN UNA MUESTRA DE ENSAYO

Descripción

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención hace referencia a la reivindicación 1 y a la reivindicación 8. También se describe la detección de los virus respiratorios influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV. La invención también hace referencia a las reivindicaciones 12 y 13.

10 [0002] También se describe un conjunto de secuencias de ácido nucleico, así como su uso como cebadores de amplificación para hMPV presentes en una muestra de ensayo. La amplificación de hMPV con las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es compatible con la determinación del genotipo hMPV presente en la muestra de ensayo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0003] Las infecciones de las vías respiratorias son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todos los grupos de edad pero especialmente en niños jóvenes, sujetos de edad avanzada y pacientes inmunodeprimidos. Los virus causan la mayoría de estas infecciones.

20 [0004] Además de los virus más comunes que provocan infecciones respiratorias, estudios recientes han sugerido que el metapneumovirus humano (hMPV) debería añadirse a la lista de patógenos virales respiratorios humanos en todos los grupos de edad (van den Hoogen *et al.*, 2001, *Nat. Med.* 7:719-724; Pere *et al.*, 2002, *J. Infect. Dis.* 185:1660-1663; Boivin *et al.*, 2002, *J. Infect. Dis.* 186:1330-1334).

25 [0005] Como ejemplo de un estudio prospectivo, en un análisis de 1.322 niños hospitalizados <2 años de edad en España durante 5 años, se halló que hMPV era el virus más común tras VRSh y rinovirus (García-García *et al.*, 2006, *Pediatr. Pulmonol.* 41 (9):863-71). Las coinfecciones eran frecuentes y clínicamente similares a las infecciones aisladas y a las infecciones de VRSh. Se pueden encontrar datos adicionales en García-García *et al.*, 2006, *Arch Dis Child.* 91 (4):290-5.

30 [0006] Últimamente, se ha sugerido una mayor virulencia del genotipo A de hMPV con respecto al B (Vicente *et al.*, 2006, *Clin Infect Dis.* 42(12):e111-3). Se analizó el espectro clínico de 69 episodios de la infección pediátrica metapneumovirus (55 episodios provocados por el genotipo A y 14 episodios provocados por el genotipo B) y se halló que la diagnosis de neumonía era más común y que el índice de gravedad de la enfermedad (determinado sobre la necesidad de hospitalización, saturación de oxígeno <90% y estancia en la unidad de cuidados intensivos) era más alto para pacientes con la infección del genotipo A de hMPV. La diferente gravedad que se observó podría atribuirse a una virulencia más alta del genotipo A de hMPV (hMPV-A) con respecto al B (hMPV-B).

35 [0007] Ya se han descrito intentos para la detección simultánea de hMPV y otros agentes virales que afectan a las vías respiratorias (WO2005/038427 y WO2006/070034 constituyen ejemplos representativos). Una lista completa de los virus respiratorios incluye: Influenza A y B, virus sincitial respiratorio humano (VRSh) A y B, los cuatro serotipos del virus de parainfluenza humana (VPI) y adenovirus, rinovirus, coronavirus, influenza C, así como enterovirus. Además, el conocimiento de
40

virus que provocan infecciones en las vías respiratorias inferiores se ha enriquecido recientemente con la caracterización de un nuevo miembro, Bocavirus Humano (HBoV) (Allander *et al.*, 2005, PNAS 102: 12891-12896).

5 **[0008]** Los cebadores de amplificación clásicos para hMPV son L6 y L7, descritos en primer lugar en Van den Hoogen *et al.*, 2003, *J. Infect. Dis.* 188:1571-1577. Algunos de los ejemplos del estado de la técnica en los que se usa L6 y L7 para la amplificación de hMPV se encuentran en WO2005/038427 y WO2006/070034.

[0009] En concreto, WO2005/038427 presenta un método para la amplificación de secuencias diana de virus de las vías respiratorias superiores, método que incluye amplificación por PCR usando 10 múltiples pares de cebadores para PCR. Como cebadores de amplificación para hMPV, se usan los cebadores L6 y L7.

[0010] Además, en WO2006/070034, puede llevarse a cabo la amplificación de los virus respiratorios presentes en un muestra antes de la hibridación de los productos de amplificación con sondas específicas de virus. Los cebadores usados para la amplificación de hMPV son de nuevo L6 y L7.

15 **[0011]** Otras solicitudes de patente del estado de la técnica dirigidas a la detección simultánea de los patógenos virales respiratorios son:

[0012] US2007/092871, que describe micromatrices que tienen una pluralidad de secuencias de sondas de oligonucleótidos para la identificación genética de patógenos respiratorios superiores. Por lo que respecta a los cebadores revelados en la solicitud, solo se presentan secuencias 20 correspondientes a un grupo de cebadores para PCR para amplificar muestras de influenza A.

[0013] CA2418004, que describe un ensayo para la detección en una muestra de ensayo de ácidos nucleicos de patógenos virales respiratorios clínicamente importantes en un formato múltiple. La mayoría de las secuencias de cebadores de amplificación dispuestas en la solicitud de patente han sido ya descritas por otros, a excepción de aquellas de hMPV, que se describieron inicialmente en la 25 solicitud de patente. Sin embargo, estas secuencias correspondientes a los cebadores de amplificación de hMPV son distintas a las aquí descritas.

[0014] WO2005/005658, que revela un método de detección para el coronavirus que provoca el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), método basado en un chip que comprende un soporte en el que se inmovilizan las sondas oligonucleótidas. Además del chip, la solicitud de patente 30 revela asimismo algunos cebadores oligonucleótidos para amplificar otros virus respiratorios, incluyendo algunos para la amplificación de metapneumovirus humano. Sin embargo, ningún cebador de amplificación de la solicitud de patente WO2005/005658 se corresponde con los aquí descritos.

[0015] WO2004/057021, que revela composiciones y métodos para la detección de virus respiratorios mediante el uso de secuencias de ácido nucleico específicas.

35 **[0016]** Ninguno de los cebadores de amplificación de hMPV revelados en WO2004/057021 se corresponde con los revelados en la invención aquí descrita.

[0017] WO2006/102695, que revela el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la detección de organismos contagiosos respiratorios. Aquí se presentan algunas secuencias correspondientes a cebadores así como a sondas *anchor* (receptoras) y *sensor* 40 (donadoras). Por lo que respecta a los cebadores de amplificación correspondientes a HMPV, las secuencias presentadas son distintas a las de la presente invención.

[0018] WO2004/096993, que presenta métodos para detectar metapneumovirus en mamíferos en una muestra, en el que el método comprende o bien poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico, o bien poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o de forma alternativa, la amplificación del ácido nucleico de MPV de la muestra. Por lo que respecta a este último método de
 5 detección, generalmente se manifiesta que los cebadores de amplificación pueden hibridarse de forma específica con la secuencia de ácido nucleico del ADN de metapneumovirus humano, sin aportar ninguna de las secuencias de cebadores específicas.

RESUMEN DE LA INVENCION

10 **[0019]** El problema que ha de solucionarse con la presente invención es la provisión de un método que permita una detección de hMPV en una muestra de ensayo alternativa o más eficaz que los métodos del estado de la técnica. Preferentemente, el método debería ser compatible con la posterior clasificación del hMPV presente y con la detección de otros virus respiratorios presentes en la muestra.

15 **[0020]** La solución, que se corresponde con un primer aspecto de la presente invención, se basa en una o más secuencias de ácido nucleico que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEQ ID nº 1-6, sus complementos y equivalentes y con su uso como cebadores de amplificación en la amplificación de hMPV. Mediante equivalentes se hace referencia a secuencias que pueden ser distintas a la secuencia dada, por ejemplo, por al menos una, preferiblemente una,
 20 dos, tres, cuatro mutaciones incluyendo alteraciones, supresiones e inserciones. Otros equivalentes pueden ser cebadores que incorporen nucleótidos modificados o alternativos en lugar de nucleótidos canónicos, siempre que la secuencia equivalente pueda actuar como cebadores de amplificación en la amplificación de hMPV. El ácido nucleico incluye, por ejemplo, ADN, ARN y APN y cualquier otra forma o modificación. Por lo tanto, la invención hace referencia a la reivindicación 1.

25 **[0021]** Las secuencias de ácido nucleico que comprenden las secuencias SEQ ID nº 1 y 2 y las secuencias SEQ ID nº 3 y 4 y SEQ ID nº 5 y 6 o los complementos y equivalentes de estas, constituyen pares de cebadores de amplificación para hMPV.

[0022] La amplificación de las muestras de ensayo con cebadores de acuerdo con la presente invención tiene como resultado una detección de hMPV más sensible que en el estado de la técnica,
 30 tanto en electroforesis en gel de agarosa, así como en sistemas de detección basados en la hibridación con sondas específicas de la diana.

[0023] El estado de la técnica muestra un interés generalizado en métodos de detección de virus respiratorios mediante la amplificación de ácido nucleico. Una persona especializada que utilice métodos conocidos en la técnica para generar cebadores de amplificación para hMPV produciría
 35 muchas secuencias, cuya efectividad sería desconocida e imposible de probar en un marco de tiempo razonable y con los recursos razonables.

[0024] El método de la presente invención permite una detección más eficaz que los métodos del estado de la técnica del hMPV presente en una muestra de ensayo. Por lo tanto, la amplificación con los cebadores L6.2 y L7.2 (SEQ ID nº 1 y 2, respectivamente) permite la detección de hMPV en
 40 muestras en las que la amplificación con L6 y L7 del estado de la técnica (SEQ ID nº 7 y 8, respectivamente) presentó un resultado negativo.

[0025] Además, la amplificación con cebadores SA, AA, SB y AB (SEQ ID nº 3 a 6, respectivamente) seguida de la hibridación con una sonda específica de la secuencia, tal como las sondas F249B, F256B o F256A (SEQ ID nº 11, 12 y 13, respectivamente) complementada con la capacidad de detección de un método de detección que comprende la amplificación con los cebadores L6 y L7 y L6.2 y L7.2, seguida de la hibridación con las sondas HMNVA-S37 y HMNVB-S38 (SEQ ID nº 9 y 10, respectivamente) hasta la detección de casi el 100 % de las muestras de hMPV positivas.

[0026] Además, el método de amplificación con cebadores L6.2 y L7.2 ya sea en presencia o ausencia de los cebadores L6 y L7 es compatible con la amplificación en presencia de los pares de cebadores de amplificación para influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV.

[0027] Una ventaja de la presente invención es que la amplificación de hMPV con los pares de cebadores de la invención es compatible con el genotipado de hMPV mediante hibridación de los productos de amplificación, transformados previamente en oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios, con las sondas de la presente invención. Por lo tanto, no se necesita una amplificación anidada para el genotipado.

[0028] Otro aspecto de la presente invención corresponde a la reivindicación 6.

[0029] La primera mezcla de cebadores de amplificación puede comprender de forma adicional los cebadores L6 (SEQ ID nº 7) y L7 (SEQ ID nº 8).

[0030] De forma adicional, el kit de la presente invención puede además permitir la detección de influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV en un muestra de ensayo, kit que comprende preferentemente:

- Pares de cebadores de SEQ ID nº 14-24 para VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, VRSh A y coronavirus tipo 229, dentro de la primera mezcla de amplificación;

- y pares de cebadores de SEQ ID nº 25-38 para influenza A, influenza B, influenza C, VRSh B, adenovirus, echovirus 30, rinovirus y hBoV, dentro de la segunda mezcla de amplificación.

[0031] Además de las mezclas de amplificación, el kit puede comprender asimismo:

i) un recipiente matriz o un conjunto de recipientes matrices, comprendiendo cada uno una micromatriz en la que se presentan sondas específicas de la diana; y

ii) reactivos para utilizarse a la hora de visualizar la hibridación de los ácidos nucleicos con las sondas de la micromatriz.

[0032] También describimos el uso del método y kit mencionados anteriormente para la detección e identificación, si se encuentra presente en una muestra de ensayo, de uno o más agentes virales elegidos del grupo que comprende hMPV, influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV

[0033] Aspectos adicionales de la presente invención corresponden a las reivindicaciones 12 y 13. También describimos (i) una mezcla de amplificación de ácido nucleico que comprende, como cebadores de amplificación, ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID nº 1 y 2, y/o ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID nº 3 y 4, y/o ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID nº 5 y 6, o sus complementos y equivalentes. La mezcla comprende preferiblemente como cebadores de amplificación del primero al cuarto ácido nucleico que comprenden SEQ ID nº 3-6 respectivamente.

La mezcla puede también comprender el quinto y sexto ácido nucleico que comprenden SEQ ID nº 1 y 2 respectivamente, pero en los modos de realización preferidos, el quinto y sexto ácido nucleico no se incluyen en la misma mezcla como del primero al cuarto. (ii) Fragmentos de amplificación obtenibles con los pares de cebadores de SEQ ID nº 1 y 2; 3 y 4; y 5 y 6; y (iii) Un método para producir secuencias de ácido nucleico que comprenden SEQ ID nº 1-6, sus complementos y equivalentes, en el que las secuencias de ácidos nucleicos pueden marcarse. Preferiblemente, este marcaje es biotina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 [0034]

Figura 1. Visualización en gel de agarosa de productos de amplificación obtenidos mediante reacción de amplificación RT-PCR con el par de cebadores de amplificación L6 (SEQ ID nº 7) y L7 (SEQ ID nº 8), en ausencia (carriles 2-5) o en presencia (carriles 6-9) del par de cebadores de amplificación L6.2 (SEQ ID nº 1) y L7.2 (SEQ ID nº 2).

15 Figura 2. Los resultados de los tubos matrices correspondientes a la muestra S7 (hMPV-A positiva), sujeta a condiciones de amplificación de acuerdo con Multiplex 1 (Panel A) y Multiplex 2 (Panel B) y a la muestra S2 (hMPV-B positiva), sujeta a condiciones de amplificación de acuerdo con Multiplex 1 (Panel C) y Multiplex 2 (Panel D).

[0035] Definiciones. Los siguientes términos tienen los significados indicados en la especificación a menos que se indique de forma expresa que tengna un significado diferente:

- 20 - Cebadores de amplificación: ácidos nucleicos que se unen a una o más secuencias diana y permiten su amplificación.
- Tubo matriz: un recipiente matriz individual que tiene una forma y tamaño típico de un recipiente de reacción de laboratorio (por ejemplo, un tubo Eppendorf de 1,5 ml) con una micromatriz dispuesta en este en el que pueden llevarse a cabo pruebas basadas en la micromatriz.
- 25 - Recipiente matriz: un recipiente de reacción con fondo plano que comprende una micromatriz. Las moléculas de sonda de la micromatriz pueden imprimirse en un soporte sólido donde este soporte sólido puede ser el fondo de un recipiente matriz o un soporte sólido diferente unido al fondo de un recipiente matriz.
- 30 - Equivalente: secuencia de nucleótidos correspondientes a la de una secuencia dada de ADN, donde uno o más de los nucleótidos son ribonucleótidos o nucleótidos modificados tal como inosina, que no cambian en esencia las características de hibridación.
- Marcaje: introducción de un grupo de modificación en una secuencia de ácido nucleico.
- Micromatriz: disposición de sondas moleculares en una superficie, donde la posición de cada sonda se determina de forma separada.
- 35 - Reacciones RT-PCR y PCR multiplex: reacciones PCR y RT-PCR que permiten la amplificación de dos o más secuencias de ácido nucleico si están presentes.
- Sondas: ácido nucleico con la capacidad de unirse de forma específica a una secuencia diana de ácido nucleico. Esto incluye ADN, ARN, APN y cualquier otra forma o modificación.
- 40 - Susceptibilidad de detección: número mínimo de copias detectadas. "Mayor susceptibilidad o susceptibilidad mejorada" aquí hace referencia a que existe un número de copias detectables mínimo

reducido.

- Tira de recipientes: un conjunto de recipientes matrices, normalmente 8, dispuestos cada uno con una micromatriz, en los que pueden llevarse a cabo ensayos basados en las micromatrices.

- Secuencias diana: secuencias que han de detectarse.

- 5 - Sondas específicas de la diana: sondas que se hibridan de forma específica con las secuencias diana amplificables en las reacciones de amplificación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 **[0036]** La presente invención hace referencia a un conjunto de cebadores de ácido nucleico que comprenden las secuencias SEQ ID nº 1-6 (Tabla 1). También describimos los complementos y equivalentes de estas.

Tabla I

SEQ ID Nº	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
1	L6.2	TATGCCTACTATAAAAGGTCA
2	L7.2	CACCCCAGTCTTTCCTAAAG
3	SA	GAGAATCCCAGACAATCTAG
4	AA	ACTYTCAAGCCGGATGGTT
5	SB	GAAAATCCCAGACAATCAAG
6	AB	ACTCTCAAGCCTTATRGT
7	L6	CATGCCCACTATAAAAGGTCAG
8	L7	CACCCCAGTCTTTCCTTGAAA

- 15 **[0037]** Los nucleótidos de las secuencias se designan como se muestra a continuación: G para Guanina, A para Adenina, T para Timina, C para Citosina, R para G o A, Y para T o C, M para A o C, K para G o T, S para G o C, W para A o T, H para A o C o T, B para G o T o C, V para G o C o A, D para G o A o T y, finalmente, N para G o A o T o C.

- 20 **[0038]** También se describen ácidos nucleicos que comprenden secuencias elegidas del grupo que comprende SEQ ID nº 1-6 de la tabla I, sus complementos o equivalentes, que comprenden además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos extra, ya sea en los extremos 5', 3' o en ambos. En otro modo de realización preferido, consta de las secuencias SEQ ID nº 1-6 de la tabla I.

- 25 **[0039]** Los nucleótidos como se usan en la presente invención pueden ser desoxirribonucleótidos, pero también ribonucleótidos, nucleótidos modificados como inosina y nucleótidos que contienen grupos de modificación, siempre que las características de hibridación no cambien de forma esencial. Todas estas variaciones están incluidas en el término "equivalente". Preferiblemente, un equivalente incluye uno o más nucleótidos modificados. De forma alternativa, o de forma adicional, un equivalente incluye uno o más nucleótidos que se dan de manera no natural. En otros modos de realización un equivalente es ARN.

- [0040]** En un modo de realización preferido, se marcan las secuencias de ácido nucleico de la

presente invención. En un modo de realización más preferido, se marcan con biotina.

[0041] También describimos el uso de una o más secuencias de ácido nucleico como se describe previamente, como cebadores de amplificación en la amplificación de hMPV. En un modo de realización preferido de la presente invención, las secuencias de ácido nucleico que comprenden las secuencias SEQ ID nº 1 y 2, y/o las secuencias SEQ ID nº 3 y 4, y/o SEQ ID nº 5 y 6, o sus complementos y equivalentes, constituyen pares de cebadores de amplificación para hMPV. Puede marcarse uno o ambos cebadores de cada par de cebadores de amplificación.

[0042] Se compararon los productos de amplificación de las diferentes muestras de ensayo, obtenidas con el par de cebadores de amplificación del estado de la técnica L6 y L7 (SEQ ID nº 7 y 8, respectivamente, de la tabla I), en ausencia o presencia del par de cebadores de amplificación L6.2 y L7.2 (SEQ ID nº 1 y 2, respectivamente, de la tabla I) como se muestra en el ejemplo 1 a continuación. La visualización de los productos de amplificación se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa. Como se puede observar en la figura 1, la amplificación con cebadores L6.2 y L7.2 tuvo como resultado la detección de hMPV presente en la muestra, mientras que en su ausencia, la presencia de hMPV no se detectó.

[0043] Un aspecto de la presente invención hace referencia a la reivindicación 1.

[0044] Las secuencias de ácido nucleico que comprenden las secuencias SEQ ID nº 1 y 2, y las secuencias SEQ ID nº 3 y 4, y SEQ ID 5 y 6, o sus complementos y equivalentes, constituyen pares de cebadores de amplificación para hMPV.

[0045] Se llevó a cabo la amplificación de un número de muestras de ensayo con los conjuntos de cebadores de amplificación:

- L6 y L7, en ausencia de L6.2 y L7.2;
- L6 y L7, en presencia de L6.2 y L7.2; y
- SA, AA, SB y AB (de las respectivas SEQ ID nº 3, 4, 5 y 6).

[0046] Un ejemplo representativo de las condiciones de amplificación adecuadas correspondientes a este estudio comparativo puede encontrarse en el ejemplo 2.

[0047] Los productos de amplificación obtenidos de ese modo se transformaron en oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios, seguidos de una hibridación con sondas específicas de la diana correspondientes a los fragmentos de amplificación y la visualización de los resultados. Algunas imágenes ilustrativas se muestran en la figura 2. Los valores de la susceptibilidad de detección son normalmente una orden de magnitud mayor que los de la electroforesis en gel de agarosa.

[0048] La tabla II expone los resultados correspondientes a un numero de muestras probadas de acuerdo con las condiciones experimentales descritas bajo el ejemplo 2.

Tabla II

Muestra	Pares de cebadores de amplificación		
	L6/L7	L6/L7 + L6.2/L7.2	SA/AA + SB/AB
S1	-	hMPV-B	hMPV-B
S2	-	hMPV-B	hMPV-B

ES 2 425 620 T3

S3	-	hMPV-B	hMPV-B
S4	-	-	-
S5	-	hMPV-B	-
S5	-	hMPV-A	hMPV-A
S7	hMPV-A	hMPV-A	hMPV-A
S8	-	hMPV-A	-
S9	hMPV-A	hMPV-A	-
S10	hMPV-A	hMPV-A	-
S11	hMPV-B	hMPV-B	hMPV-B
S12	-	hMPV-A	-
S13	hMPV-A	hMPV-A	-
S14	-	-	hMPV-B
S15	hMPV-A	hMPV-A	-
S16	hMPV-B	hMPV-B	hMPV-B
S17	hMPV-A	hMPV-A	-
S18	-	hMPV-A	hMPV-A
S19	-	hMPV-B	hMPV-B
S20	hMPV-A	hMPV-A	hMPV-A
S21	-	hMPV-B	hMPV-B
S22	hMPV-A	-	hMPV-A

5 **[0049]** Los productos de amplificación obtenidos con el par de cebadores de amplificación L6 y L7, tanto en ausencia como en presencia de L6.2 y L7.2 se desnaturalizaron e hibridaron con las recientemente diseñadas sondas HMNVA-S37 y HMNVB-S38, que detectan, respectivamente, los genotipos A y B de hMPV.

SEQ ID N°	Nombre de la sonda	Secuencia (5'-3')
9	HMNVA-S37	GAGTCTTTRTCAGCAGCRTTAGC
10	HMNVB-S38	GAATCTTTATCTGCAGCACTTGC

[0050] Los nucleótidos de las secuencias se designan como se muestra a continuación: G para Guanina, A para Adenina, T para Timina, C para Citosina, R para G o A, Y para T o C, M para A o C,

K para G o T, S para G o C, W para A o T, H para A o C o T, B para G o T o C, V para G o C o A, D para G o A o T y, finalmente, N para G o A o T o C.

[0051] La hibridación de los productos de amplificación con una sonda genérica del estado de la técnica para hMPV, tal como (TGGTGTGGGATATTAACAG) no presentó un resultado diferente.

- 5 **[0052]** Los productos de amplificación obtenidos con los pares de cebadores de amplificación SA/AA y SB/AB se desnaturalizaron e hibridaron con sondas recientemente diseñadas:

SEQ ID N°	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Genotipo
11	F249B	CAG CAG CAG TCA CAG CAG GCA TT	hMPV-B
12	F256B	GTC ACA GCA GGC ATT GCR ATA GC	hMPV-B
13	F256A	GTT ACA GCA GGT GTT GCA ATT GC	hMPV-A

- 10 **[0053]** Los nucleótidos de las secuencias se designan como se muestra a continuación: G para Guanina, A para Adenina, T para Timina, C para Citosina, R para G o A, Y para T o C, M para A o C, K para G o T, S para G o C, W para A o T, H para A o C o T, B para G o T o C, V para G o C o A, D para G o A o T y, finalmente, N para G o A o T o C.

- 15 **[0054]** Como se puede deducir a partir de la tabla II, el método de la presente invención permite una detección de hMPV presente en una muestra de ensayo más eficaz que los métodos del estado de la técnica. Por lo tanto, la amplificación con los cebadores L6.2 y L7.2 permite la detección de hMPV en muestras donde la amplificación con L6 y L7 presentaba un resultado negativo.

[0055] Además, la amplificación con los cebadores SA, AA, SB y AB y la hibridación con las sondas F249B, F256B y F256A, complementaba la capacidad de detección de los cebadores L6.2 y L7.2, hasta casi la detección del 100 % de las muestras de hMPV positivas.

- 20 **[0056]** Otra ventaja del método de la presente invención sobre los métodos existentes del estado de la técnica es que se puede distinguir entre los tipos A y B de hMPV sin secuenciación y/o análisis con enzimas de restricción. Además, la amplificación de hMPV es compatible con la presencia de cebadores de amplificación para los virus respiratorios adicionales influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV (véase el ejemplo 2, a continuación, como un ejemplo representativo).

- 25 **[0057]** En un modo de realización preferido de la presente invención, la primera mezcla de cebadores de amplificación comprende además cebadores de SEQ ID n° 7 y 8.

- 30 **[0058]** También describimos un método que comprende además poner en contacto la muestra con uno o más cebadores de amplificación para uno o más agentes virales elegidos del grupo formado por influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV.

[0059] Por ejemplo, los cebadores de amplificación correspondientes a influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV son como se muestra a continuación:

SEQ ID N°	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
14	1PIV13	AGG WTG YSM RGA TAT AGG RAA RTC ATA
15	Piv1-A-218	CAC AGT GGG CAR GGA GCA TAA

ES 2 425 620 T3

SEQ ID N°	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
16	3PIV24	CYM AYG GRT GYA YTM GAA TWC CAT CAT T
17	4PIV4	TGA CTA TRC TCG ACY TTR AAA TAA GG
18	4PIV2	GCT AGA TCA GTT GTG GCA TAA TCT
19	Piv3-S-118	CAA TAG RAA GTC ATG TTC TCT
20	Piv-3-A-313	TGG TCC AAC AGA TGG GTA TAA TGC C
21	RSVA-S-15	CCT CAA ARC AAA TGC AAT TAC CG
22	RSVA (2) 3?	TAT ACC AAC CAG TTC TTA GAG C
23	1HCoV	TGT GCC ATA GAR GAY WTA CTT TTT
24	Cor229-A-214	GTA TTG AAR CGG CTG ATG TTA G
25	NPAC11	GAA CTC RTC CYW WAT SWC AAW GRR GAA AT
26	FluA-A-241	AAC TCC AWY ACC ATT GTC CC
27	NPB1	ACA GAG ATA AAG AAG AGC GTC TAC AA
28	FluB-A-136	TGT CAT CAG TGG CAG CCA ATA G
29	RSVB-541	TCC AYA GRT CAA GTG CAA TCT TCC T
30	RSVB 3?	AAA GCA CTA AAA TAA CCT CTG C
31	ADV1 F+	CAA CAC CTA YGA STA CAT GAA
32	ADV2R-	ACA TCC TTB CKG AAG TTC CA
33	HER1	CTC CGG CCC CTG AAT RYG GCT AA
34	HER4	CTG TGT TGA WAC YTG AGC ICC CA
35	FluC-S-122	CGC AGC AAG AAG AAA CGG TT
36	FluC-A-217	GCG TCA GCT ATA AGA ACY CCA ATT C
37	NS1-1545S	TAT GGC CAA GGC AAT CGT CCA AG
38	NS1-A1835	GCC GCG TGA ACA TGA GAA ACA GA

[0060] Los nucleótidos de las secuencias se designan como se muestra a continuación: G para Guanina, A para Adenina, T para Timina, C para Citosina, R para G o A, Y para T o C, M para A o C, K para G o T, S para G o C, W para A o T, H para A o C o T, B para G o T o C, V para G o C o A, D para G o A o T y, finalmente, N para G o A o T o C.

[0061] En un modo de realización preferido, el método consiste en:

- a) dividir la muestra de ensayo en dos o más muestras;
- b) poner en contacto una muestra con una primera mezcla de cebadores de amplificación, comprendiendo dicha mezcla tanto secuencias de ácido nucleico que comprenden las secuencias SEQ ID nº 1 y 2, o los complementos o equivalentes de estas, y cebadores de SEQ ID nº 7 y 8, como cebadores de amplificación para hMPV y pares de cebadores de amplificación de SEQ ID nº 14-24 como cebadores de amplificación para VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, VRSh A y coronavirus tipo 229;
- c) poner en contacto otra muestra con una segunda mezcla de cebadores de amplificación que comprende las secuencias de ácido nucleico que comprenden las secuencias SEQ ID nº 3 y 4, y

SEQ ID nº 5 y 6, o los complementos y equivalentes de estas, como cebadores de amplificación para hMPV y pares de cebadores de amplificación de SEQ ID nº 25-38 como cebadores de amplificación para influenza A, influenza B, influenza C, VRSh B, adenovirus, echovirus 30, rinovirus y hBoV; y

- 5 d) someter los diferentes conjuntos de muestras de ensayo mezclados con los cebadores de amplificación a reacciones de amplificación que pretenden amplificar las secuencias diana presentes en la muestra.

[0062] En un modo de realización preferido, la muestra de ensayo consta de material genético extraído de la muestra original. La extracción del material genético puede llevarse a cabo tanto por técnicas de extracción automática así como manuales del estado de la técnica.

[0063] En un modo de realización más preferido, el sistema de extracción automática es NucliSENS easyMAG de BioMerieux (EP1694813), que usa partículas magnéticas junto con la tecnología BOOM® de BioMerieux para el aislamiento universal de todo el ácido nucleico a partir de una amplia variedad de tipos y volúmenes de muestras.

15 **[0064]** La persona especializada conocerá las técnicas y métodos para el procesamiento manual de las muestras con el fin de extraer ácidos nucleicos de una muestra y puede usarse cualquier método adecuado como tal.

[0065] En un ejemplo concreto, los ácidos nucleicos se extraen de 50 µl de muestra de ensayo. Tras el paso de extracción, se resuspende un precipitado en 20-25 µl de agua libre de RNasa.

20 **[0066]** En un modo de realización preferido/concreto, se añaden 5 µl de los 20-25 µl que comprenden el material genético extraído de una muestra de ensayo al recipiente que contienen los reactivos de amplificación, en un volumen final de 50 µl.

[0067] Un problema inherente de las PCR multiplex es que la presencia de varios cebadores en la misma reacción de amplificación podría llevar a una interacción entre los cebadores presentes, que podría descartar su hibridación con las secuencias diana y la correspondiente amplificación. Este obstáculo técnico se superó con la combinación específica de cebadores de amplificación de Multiplex 1 y 2.

[0068] En un modo de realización preferido, la reacción de amplificación es RT-PCR.

30 **[0069]** En otro modo de realización preferido, se marca uno o más cebadores de amplificación de cada par de cebadores de amplificación. En concreto, con biotina.

[0070] De forma alternativa, se introduce un marcaje en el producto de amplificación durante la amplificación.

[0071] En un modo de realización preferido, el método aquí descrito consiste además en obtener oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios de cualquier producto de amplificación, permitiendo que dichos oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios se hibriden con una pluralidad de sondas específicas de la diana y detectando los oligonucleótidos o polinucleótidos hibridados. Más preferiblemente, los oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios se obtienen al desnaturalizar cualquier oligonucleótido o polinucleótido bicatenario presente.

40 **[0072]** En un modo de realización preferido, los productos de la RT-PCR obtenidos con los cebadores de amplificación según lo aquí descrito pueden caracterizarse mediante tecnología de micromatrices. La tecnología de micromatrices proporciona la detección simultánea de múltiples

marcadores moleculares para uso diagnóstico, mientras que proporciona los controles necesarios para asegurar la fiabilidad de los resultados.

[0073] En un modo de realización preferido, el marcaje puede introducirse en el producto amplificado durante su amplificación con el fin de permitir una mayor detección, preferiblemente un marcaje que permita una señal que pueda detectarse mediante métodos colorimétricos. En el modo de realización más preferido, el marcaje es biotina. Sin embargo, puede usarse cualquier otro tipo de marcaje conocido en la técnica (p. ej., digoxigenina). Pueden usarse marcajes radioactivos o fluoróforos en determinados modos de realización. En un modo de realización preferido, el marcaje del producto amplificado puede conseguirse al añadir nucleótidos modificados que llevan un marcaje (p. ej., derivados de digoxigenina dUTP o biotinilados) en la mezcla de amplificación. En otro modo de realización aún más preferido, el marcaje lo contienen los cebadores de amplificación.

[0074] En un modo de realización preferido, se hibrida el producto amplificado desnaturalizado previamente con sondas específicas de la diana con el fin de minimizar el problema de la PCR multiplex, que normalmente tiene como resultado la producción de fragmentos de amplificación no específicos, debido a la presencia de varios cebadores.

[0075] En un modo de realización preferido, la desnaturalización de ADN amplificado puede llevarse a cabo mediante calentamiento. En su lugar o de forma adicional, pueden usarse otras formas de preparar ADN monocatenario tras la amplificación; por ejemplo, medios químicos.

[0076] En un modo de realización preferido, el ADN monocatenario se incuba con una pluralidad de sondas específicas de la diana proporcionadas en una micromatriz. En la micromatriz se presenta al menos una sonda, aunque preferiblemente más de una con la capacidad de hibridarse con cada secuencia diana. En determinados modos de realización, el ADN monocatenario puede incubarse con sondas específicas de la diana provistas en solución. Sin embargo, es preferible que las sondas se presenten en un soporte sólido.

[0077] En un modo de realización preferido, las sondas se encuentran en una micromatriz, que puede colocarse en un portaobjetos o puede encontrarse en un recipiente de reacción, que se llama, por tanto, recipiente matriz. Los recipientes matrices pueden tener diferentes formatos de presentación, incluyendo recipientes matrices individuales, en concreto, tubos matrices o conjuntos de recipientes matrices dispuestos en tiras o placas planas. Normalmente, las placas constan de conjuntos de tiras de recipientes matrices. Por lo tanto, una micromatriz aquí descrita puede encontrarse en un recipiente matriz individual. De forma alternativa, dos o más micromatrices pueden encontrarse en una tira de recipientes. En un modo de realización preferido, la tira de recipientes está formada por 8 recipientes. Además, pueden disponerse tres o más recipientes matrices en un conjunto de tiras de recipientes. En otro modo de realización preferido, el conjunto de tiras de recipientes es una placa de microtitulación.

[0078] En modos de realización preferidos, las moléculas de la sonda de la micromatriz pueden imprimirse en un soporte sólido donde dicho soporte sólido puede ser el fondo de un recipiente matriz o un soporte sólido diferente fijado al fondo de un recipiente matriz. Esto significa que la superficie de la micromatriz puede ser el fondo plano de un recipiente matriz. De forma alternativa, la superficie de la micromatriz puede ser un soporte sólido fijado al fondo de un recipiente matriz.

[0079] En un modo de realización, el recipiente de reacción tiene un tamaño típico para un recipiente

de reacción de laboratorio. Los volúmenes de llenado típicos varían entre 100 µl a 2,5 ml, pero también pueden ser más altos o más bajos en modos de realización especiales. Concretamente, el recipiente de reacción es preferiblemente un tubo matriz, es decir, un recipiente matriz con un volumen de llenado normal para un tubo Eppendorf estándar de hasta 1,5 ml. Los volúmenes de llenado adicionales preferidos llegan hasta 0,4 ml, hasta 0,5 ml, hasta 0,7 ml, hasta 1,0 ml o hasta 2,0 ml.

[0080] Debido al marcaje del ADN amplificado, siempre que las moléculas muestra interactúan con moléculas de la sonda en la superficie de la micromatriz, un reactivo indicador se une al marcaje y produce señales visibles que pueden detectarse con un dispositivo de detección. Las moléculas de muestra y sonda que interactúan se identifican mediante la ubicación de la señal en la superficie de la micromatriz. En el caso concreto en el que las moléculas de ADN de la muestra se marquen con biotina, el agente indicador puede ser peroxidasa de rábano unida mediante enlace covalente a estreptavidina. Esta última se une concretamente a biotina y la peroxidasa desencadena la precipitación de sustratos como tetrametilbenzidina (TMB). Puede usarse cualquier otra reacción que tenga como resultado un precipitado sobre los elementos matrices y que pueda usarse para detectar la interacción entre las moléculas diana y de sonda de acuerdo con la presente invención.

[0081] La presente invención hace referencia además a la reivindicación 6.

[0082] La primera mezcla de los cebadores de amplificación puede comprender de forma adicional los cebadores L6 (SEQ ID N° 7) y L7 (SEQ ID N° 8).

[0083] De forma adicional, el kit de la presente invención puede además permitir la detección de influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV, en una muestra de ensayo, kit que comprende preferiblemente:

- Pares de cebadores de SEQ ID N° 14-24 para VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, VRSh A y coronavirus tipo 229, dentro de la primera mezcla de amplificación y
- Pares de cebadores de SEQ ID N° 25-28 para la influenza A, influenza B, influenza C, VRSh B, adenovirus, echovirus 30, rinovirus y hBoV, dentro de la segunda mezcla de amplificación.

[0084] Además de las mezclas de amplificación, el kit de la invención puede comprender además:

- i) un recipiente matriz o un conjunto de recipientes matrices, comprendiendo cada uno una micromatriz en el que se presentan las sondas específicas de la diana y
- ii) reactivos para usarlos a la hora de visualizar la hibridación de ácidos nucleicos a las sondas de la micromatriz.

[0085] Por ejemplo, uno o más tubos de amplificación comprenden además uno o más controles internos. En un modo de realización preferido, el protocolo de la presente invención incluye un control interno del paso de extracción de los ácidos nucleicos. En otro modo de realización preferido, el protocolo de la presente invención incluye un control interno del paso de amplificación del ácido nucleico.

[0086] Un control interno preferido sería un plásmido de ADN que sería amplificable con un par de cebadores de amplificación. En un modo de realización más preferido, uno o más tubos Multiplex comprenden un ADN del control interno en forma de plásmido de ADN y cebadores RTS

ES 2 425 620 T3

GCTTGGGCGTGTCTCAAAATCT, SEQ ID N° 39) y RTA (GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT, SEQ ID N° 40) para su amplificación. Concretamente, las condiciones preferidas son:

Reactivos Multiplex	volumen (μl)
ADN de Control Interno, 10 ⁴ copias/μl	1
RTS 20 μM	0,5
RTA 20μM	0,5

[0087] En un volumen de reacción final de 50 μl.

5 **[0088]** Otras condiciones preferidas de forma concreta son:

Reactivos Multiplex	Volumen (μl)
ADN de Control Interno, 10 ⁴ copias/μl	4
RTS 20 μM	0,5
RTA 20μM	0,5

[0089] En un volumen de reacción final de 50 μl.

[0090] Se puede marcar tanto uno como ambos cebadores de amplificación RTS/RTA.

10 **[0091]** El producto de amplificación correspondiente al ADN del control interno es un fragmento de ADN de 885 pb.

[0092] En un modo de realización concreto, la micromatriz comprende sondas para la detección específica del control interno amplificable con cebadores de amplificación RTS y RTA. En concreto, pueden usarse

CI 1 5' (CAGCTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGG, SEQ 10 N° 41),

15 CI 1 3' (TTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG, SEQ ID N° 42) y

CI 2 5' (CGTTCCACTGAGCGTCAGACCC, SEQ 10 N° 43)

20 **[0093]** Un control interno preferido adicional sería un fragmento de ARN que se añadiría preferiblemente a la muestra de ensayo antes de la extracción del ácido nucleico. Otro control interno preferido sería un fragmento de ARN que se añadiría preferiblemente a los ácidos nucleicos tras la extracción de la muestra de ensayo. En un modo de realización preferido, el fragmento de ARN estaría presente en el recipiente que contiene los reactivos de amplificación, antes de la incubación con los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra de ensayo.

25 **[0094]** En un modo de realización más preferido, el fragmento de ARN podría obtenerse mediante transcripción de ARN de un plásmido. En otro modo de realización preferido, el fragmento de ARN podría obtener mediante síntesis química.

30 **[0095]** Concretamente, las sondas específicas de la diana preferidas correspondientes a los productos de amplificación de hMPV aquí descritas comprenden secuencias elegidas del grupo que comprende SEQ ID n° 9 a 13, sus complementos y equivalentes. En un modo de realización más preferido, las sondas específicas de la diana correspondientes a los productos de amplificación hMPV constan de SEQ ID n° 9 a 13.

[0096] Las sondas pueden obtenerse mediante diferentes métodos, tal como síntesis química (p. ej., mediante el método fosfotriéster convencional) o técnicas de ingeniería genética, por ejemplo mediante clonación molecular de plásmidos recombinantes en los que se han insertado las secuencias nucleótidas correspondientes y pueden obtenerse a continuación mediante digestión con nucleasas.

[0097] Las sondas específicas pueden diseñarse usando el programa de alineamiento de ácido nucleico Oligo 6. Los parámetros de T_m y la relación G/C se analizan en todos los casos y se evita la formación de una estructura secundaria. Las sondas preferidas son aquellas con la misma T_m bajo la concentración de sal que se usa en el paso de hibridación. En un modo de realización preferido, las sondas se eligen para unirse a sus correspondientes secuencias diana bajo las mismas condiciones de hibridación. La persona experta conocerá otras formas en las que pueden diseñarse las sondas específicas.

[0098] Las sondas pueden elegirse de forma que no se hibriden con el ADN genómico y no se hibriden de forma imprecisa con fragmentos amplificados correspondientes a otros virus.

[0099] Pueden presentarse una o más sondas aquí descritas en un soporte sólido.

[0100] En otro modo de realización preferido, se presentan dos o más sondas específicas de la diana para la misma secuencia diana sobre el soporte sólido con el fin de mejorar la detección de agentes virales que sean de interés.

[0101] Dichas sondas o mezclas de sondas pueden inmovilizarse en una única ubicación del soporte sólido, preferiblemente en dos ubicaciones distintas del soporte sólido y más preferiblemente en tres ubicaciones distintas del soporte sólido.

[0102] En un modo de realización preferido, las sondas se presentan en un soporte sólido ubicado dentro de un recipiente matriz.

[0103] En otro modo de realización, las sondas se presentan en un soporte sólido ubicado dentro de una tira matriz.

[0104] En un modo de realización más preferido, la tira matriz tiene 8 recipientes matrices.

[0105] En un modo de realización preferido, el soporte sólido es un portaobjetos de vidrio revestido.

[0106] En otro modo de realización preferido, el soporte sólido es el fondo de un recipiente matriz, recipiente matriz que es o bien un tubo matriz individual o un componente de una tira de recipientes o conjunto de tiras de recipientes, tal como una placa de microtitulación.

[0107] En un modo de realización preferido, las interacciones que tienen lugar entre ADN amplificado con los pares de cebadores de la presente invención y las correspondientes sondas de detección se dan en un recipiente matriz individual, en una tira de recipientes o en un conjunto de tiras de recipientes.

[0108] En un modo de realización preferido, la visualización de dichas interacciones consta de los siguientes pasos:

- En primer lugar, se captura la imagen de la matriz usando un dispositivo óptico.
- A continuación, se analiza la imagen.
- Finalmente, se presenta un informe que contiene una interpretación del resultado.

[0109] Preferiblemente, se analiza la imagen mediante el software adecuado.

[0110] Puede usarse cualquier dispositivo adecuado para este procesamiento.

[0111] También describimos el uso del método y kit mencionados anteriormente para la detección e identificación, si estuviera presente en una muestra de ensayo, de uno o más agentes virales seleccionados del grupo que comprende hMPV, influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV.

5 **[0112]** Se ha confirmado, como en los ejemplos proporcionados en la presente invención, que los ácidos nucleicos de SEQ ID nº 1 a 6, cuando se usan como cebadores de amplificación en la amplificación hMPV, proporcionan mejores valores de susceptibilidad de detección de hMPV que los pares de cebadores L6/L7 del estado de la técnica. Esto ocurre incluso con la presencia de cebadores de amplificación correspondientes a otros virus respiratorios.

10 **[0113]** Otros aspectos de la presente invención se corresponden con las reivindicaciones 12 y 13. También describimos (i) una mezcla de amplificación de ácido nucleico que comprende, como cebadores de amplificación, ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID nº 1 y 2, y/o ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID nº 3 y 4, y/o ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID nº 5 y 6, o sus complementos y equivalentes; (ii) fragmentos de amplificación obtenibles con los pares de cebadores
 15 de SEQ ID nº 1 y 2, 3 y 4 y 5 y 6; y (iii) un método para producir secuencias de ácido nucleico que comprenden SEQ ID nº 1-6, sus complementos y equivalentes, donde pueden marcarse las secuencias de ácido nucleico. Preferiblemente este marcaje es biotina.

[0114] También se describen sondas para la detección de hMPV que comprenden una secuencia elegida del grupo formado por SEQ ID nº 9 a 13, sus complementos y equivalentes.

20

Ejemplos

[0115] Los ejemplos proporcionados a continuación simplemente ilustran la invención y de ningún modo limitan el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 EJEMPLO 1.

[0116] Se sometieron 200 µl de una muestra de ensayo de lavado nasofaríngeo al sistema de extracción automática NucliSENS easyMAG de BioMerieux, seguido de una resuspensión en 20 µl de agua libre de RNasa.

30 **[0117]** Se añadieron 5 µl de los 20 µl totales a dos recipientes diferentes, conteniendo cada uno reactivos de amplificación, en un volumen final de 50 µl. Los reactivos de amplificación incluían los cebadores de amplificación del estado de la técnica L6 y L7 (SEQ ID Nº 7 y 8) en ausencia (“Tubo -”) o presencia (“Tubo +”) de los cebadores de amplificación L6.2 y L7.2 (SEQ ID Nº 1 y 2, respectivamente, de la tabla I)

[0118] La mezcla de amplificación correspondiente al “Tubo +” era como se muestra a continuación:

Mezcla 1X	Volumen (µl)
agua libre de RNasa	7,6
tampón QUIAGEN 5X	10
mezcla de dNTP 10mM	2

ES 2 425 620 T3

solución Q 5X	10
mezcla de enzimas QUIAGEN	2
B-L6 (40µM)	1
B-L7 (40µM)	1
B-L6.2 (40µM)	1
B-L7.2 (40µM)	1
B-3PIV24 (40µM)	1
B-4PIV4 (40µM)	0,8
B-4PIV2 (40µM)	0,8
B-RSVA S15 (40µM)	0,7
B-RSVA (2) 3' (40µM)	0,7
B-1PIV13+ (40)	1
B-PIV1 A218 (40µM)	1
B-1HCoV (40µM)	0,5
B-Cor229-214 (40µM)	0,5
B-PIV3 S118 (40µM)	0,7
B-PIV3 A313 (40µM)	0,7
B-RTS 6/9/07 (20µM)	0,5
B-RTA 6/9/07 (20µM)	0,5
Control interno (10e4 copias/µl)	1
Muestra	5
El prefijo "B" significa marcado con biotina.	

[0119] La mezcla de amplificación correspondiente a "Tubo -" era exactamente la de "Tubo +" con la excepción de que los cebadores de amplificación L6.2 y L7.2 se sustituyeron por agua libre de RNasa.

5 **[0120]** Las condiciones de amplificación eran:

1 ciclo	45 °C 45min
	95 °C 15min
45 ciclos	95 °C 30 s

ES 2 425 620 T3

	50 °C 1:30 min
	68 °C 1 min
1 ciclo	68 °C 10 min
4 °C finales (opcional)	

[0121] La visualización de los productos de amplificación correspondientes a las cuatro muestras de ensayo diferentes amplificadas tanto con “Tubo -” como con “Tubo +”, mediante electroforesis en gel de agarosa se muestra en la figura 1.

- 5 **[0122]** Las condiciones experimentales descritas previamente han demostrado una eficacia equivalente para el análisis de las muestras formadas por exudados faríngeos, exudados nasofaríngeos o lavados broncoalveolares.

EJEMPLO 2.

- 10 **[0123]** Se añadieron 5 µl de un total de 20 µl, obtenidos de las muestras de ensayo S7 (hMPV-a positivo) y S2 (hMPV-B positivo) siguiendo el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, a los reactivos de Multiplex 1 o Multiplex 2, en un volumen final de 50 µl.

[0124] Las condiciones de Multiplex 1 y 2 eran las siguientes:

Reactivos Multiplex 1	Concentración inicial	Volumen (µl)
Agua libre de RNasa		Hasta 50 µl
TAMPÓN QIAGEN ONE STEP RT-PCR 5X	5X	10
SOLUCIÓN Q 5X		10
B-L6	40 µM	1
B-L7	40 µM	1
B-L6.2	40 µM	1
B-L7.2	40 µM	1
B-1PIV13	40 µM	1
B-Piv1-A-218	40 µM	1
B-3PIV24	40 µM	0,8
B-4PIV2	40 µM	0,8
B-Piv3-S-118	40 µM	0,7
B-Piv-3-A-313	40 µM	0,7
B-4PIV4	40 µM	0,8
B-1HCoV	40 µM	0,5
B-Cor229-A-214	40 µM	0,5
B-RSVA-S-15	40 µM	0,7
B-RSVA (2) 3'	40 µM	0,7

ES 2 425 620 T3

RTS-B	20 µM	0,5
RTA-B	20 µM	0,5
MEZCLA dNTP 10 mM	10 mM	2
Control interno	10e4 copias/µl	1
Enzima		2
Muestra		5
TOTAL		50
El prefijo "B" significa marcado con biotina.		

Reactivos Multiplex 2	Concentración inicial	Volumen (µl)
Agua libre de RNasa		Hasta 50 µl
TAMPÓN QIAGEN ONE STEP RT-PCR 5X	5X	10
SOLUCIÓN Q 5X		10
B-SA	40 µM	0,1
B-SB	40 µM	0,1
B-AA	40 µM	0,1
B-AB	40 µM	0,1
B-NPAC11+	40 µM	1
B-FluA-A-241	40 µM	0,8
B-NPB1+	40 µM	0,5
B-FluB-A-136	40 µM	0,5
B-FluC-S-122	40 µM	0,3
B-FluC-A-217	40 µM	0,3
B-ADV1F+	40 µM	0,8
B-ADV2R-	40 µM	0,8
B-HER1	40 µM	0,2
HER4	40 µM	0,2
B-RSVB-541	40 µM	0,5
B-RSVB 3'	40 µM	0,5
B-NS1 S-1545	40 µM	0,25
B-NS1 A-1835	40 µM	0,25
B-RTS	20 µM	0,5
B-RTA	20 µM	0,5
MEZCLA dNTP 10 mM	10 mM	2
Control interno	10e4 copias/µl	1
Enzima		2

Muestra		5
TOTAL		50
El prefijo "B" significa marcado con biotina.		

[0125] Las condiciones de amplificación eran las mismas que para Multiplex 1 y 2:

1 ciclo	45 °C 45min 95 °C 15min
45 ciclos	95 °C 30 s 50 °C 1:30 min 68 °C 1 min
1 ciclo	68 °C 10 min
4 °C finales (opcional)	

[0126] Se obtuvieron oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios de los correspondientes productos de amplificación y permitieron hibridarse con una pluralidad de sondas específicas de la diana provistas en un soporte solido, comprendidas en el tubo matriz.

[0127] Los productos de amplificación obtenidos con el par de cebadores de amplificación L6 y L7 en ausencia y presencia de L6.2 y L7.2 se desnaturalizaron e hibridaron con sondas recientemente diseñadas HMNVA-S37 y HMNVB-S38 (SEQ ID nº 9 y 10, respectivamente) que detectan respectivamente los genotipos A y B de hMPV.

[0128] La hibridación de los productos de amplificación mencionados anteriormente con una sonda genérica para hMPV proporcionaron el mismo resultado.

[0129] Los productos de amplificación obtenidos con los pares de cebadores de amplificación SA/AA y SB/AB se desnaturalizaron e hibridaron con las sondas recientemente diseñadas F249B, F256B y F256A (SEQ ID nº 11, 12 y 13, respectivamente), que detectan respectivamente los genotipos B, B y A de hMPV.

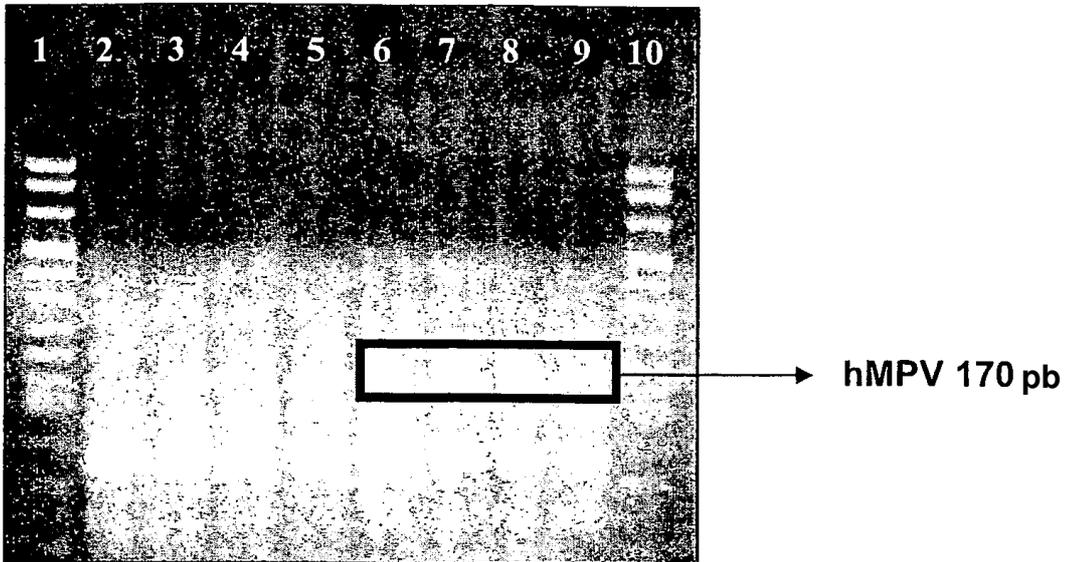
[0130] Los ejemplos representativos de las imágenes correspondientes a una muestra positiva de hMPV-A (muestra S7 de la tabla II) y a una muestra positiva de hMPV-B (muestra S2 de la tabla II) se muestran en la figura 2. Las condiciones de amplificación eran las de Multiplex 1 y Multiplex 2 y las sondas de hibridación eran: HMNVA-S37 y HMNVB-S38, en el caso de los productos de amplificación obtenidos en Multiplex 1 y F249B, F256B y F256A, en el caso de los productos de amplificación obtenidos en Multiplex 2.

Reivindicaciones

1. Un método para la detección de hMPV en una muestra de ensayo que consiste en:
 - a) dividir la muestra de ensayo en dos o más muestras;
 - b) poner en contacto un primera muestra con una primera mezcla de cebadores de amplificación, comprendiendo dicha mezcla una primera y segunda secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 3 y 4 respectivamente y una tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 5 y 6 respectivamente y/o sus complementos o secuencias que son distintas a las secuencias SEQ ID N° 3, 4, 5 y 6 por 1 mutación de estas;
 - c) poner en contacto una segunda muestra con una segunda mezcla de cebadores de amplificación, comprendiendo dicha mezcla una primera y segunda secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 1 y 2 respectivamente y/o sus complementos o secuencias que son distintas a las secuencias SEQ ID N° 1 y 2 por 1 mutación de estas;
 - d) someter la primera y segunda muestra, mezcladas con los cebadores de amplificación de los pasos b) y c) respectivamente, a reacciones de amplificación que buscan amplificar las secuencias diana presentes en la muestra;
 - e) obtener oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios a partir de cualquier producto de amplificación y permitir que dichos oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios se hibriden con una pluralidad de sondas específicas de la diana y
 - f) detectar oligonucleótidos o polinucleótidos hibridados.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios se obtienen al desnaturalizar cualquier oligonucleótido o polinucleótido bicatenario presente en los productos de amplificación.
3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 en el que la pluralidad de sondas específicas de la diana comprende una o más secuencias elegidas del grupo formado por SEQ ID N° 9, 10, 11, 12 y 13, sus complementos y secuencias que son distintas a ellas por 1 mutación de estas.
4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que:
 - los productos de amplificación, obtenidos con la primera mezcla de los cebadores de amplificación que comprenden la primera y segunda secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 3 y 4 respectivamente y la tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 5 y 6 respectivamente, o sus complementos y secuencias que son distintas a ellas por 1 mutación de estas, se hibridan con sondas específicas de la diana que comprenden una o más sondas elegidas del grupo que comprenden SEQ ID N° 11 a 13, y
 - los productos de amplificación, obtenidos con la segunda mezcla de los cebadores de amplificación que comprenden la primera y segunda secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 1 y 2 respectivamente, o sus complementos y secuencias que son distintas a ellas por 1 mutación de estas, se hibridan con sondas específicas de la diana que comprenden una o más sondas elegidas del grupo que comprenden SEQ ID N° 9 y 10.
5. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 en el que la segunda mezcla de cebadores de amplificación comprende los cebadores de SEQ ID N° 7 y 8.

6. Un kit para la detección e identificación en una muestra de ensayo de hMPV, en el que dicho kit comprende dos o más mezclas de amplificación,
- Una primera mezcla que comprende una primera y segunda secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 3 y 4 respectivamente y una tercera y cuarta secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 5 y 6 respectivamente o sus complementos y secuencias que son distintas a las secuencias de SEQ ID N° 3, 4, 5 y 6 por 1 mutación de estas, como componentes de un par de cebadores de amplificación para hMPV; y
 - Una segunda mezcla que comprende una primera y segunda secuencia de ácido nucleico que comprenden SEQ ID N° 1 y 2 respectivamente o sus complementos y secuencias que son distintas a las secuencias de SEQ ID N° 1 y 2 por 1 mutación de estas, como componentes de otros pares de cebadores de amplificación para hMPV.
7. Kit de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la segunda mezcla de cebadores de amplificación comprende además cebadores que comprenden las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID N° 7 y 8.
8. Kit de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7, que permiten además la detección de la influenza A, influenza B, influenza C, VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, adenovirus, VRSh A, VRSh B, coronavirus229, echovirus 30, rinovirus y hBoV, en una muestra de ensayo, kit que comprende:
- Pares de cebadores que comprenden secuencias de ácido nucleico elegidas del grupo que comprende SEQ ID N° 25-38 para la influenza A, influenza B, influenza C, VRSh B, adenovirus, echovirus 30, rinovirus y hBoV, dentro de la primera mezcla de amplificación y
 - Pares de cebadores que comprenden secuencias de ácido nucleico elegidas del grupo que comprende SEQ ID N° 14-24 para VPI 1, VPI 2, VPI 3, VPI 4A, 4B, VRSh A y Coronavirus tipo 229, dentro de la segunda mezcla de amplificación.
9. Kit de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además:
- i) un recipiente matriz o un conjunto de recipientes matrices, comprendiendo cada uno una micromatriz en el que se presentan sondas específicas de la diana; y
 - ii) reactivos para utilizarse a la hora de visualizar la hibridación de los ácidos nucleicos con las sondas de la micromatriz.
10. Kit de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las sondas específicas de la diana comprenden una o más secuencias elegidas del grupo formado por SEQ ID N° 9 a 13, sus complementos y secuencias que son distintas a estas por 1 mutación de estas, como sondas específicas de la diana para hMPV.
11. Kit de acuerdo con la reivindicación 9 y 10, en el que las sondas específicas de la diana están comprendidas en un recipiente matriz individual o en un conjunto de recipientes matrices.
12. Un conjunto de cebadores que comprenden las secuencias de ácido nucleico SEQ ID N° 1 a 6.
13. Un conjunto de sondas formado por al menos una sonda elegida de SEQ ID N° 9 y 10 y al menos una sonda elegida de SEQ ID N° 11 a 13.

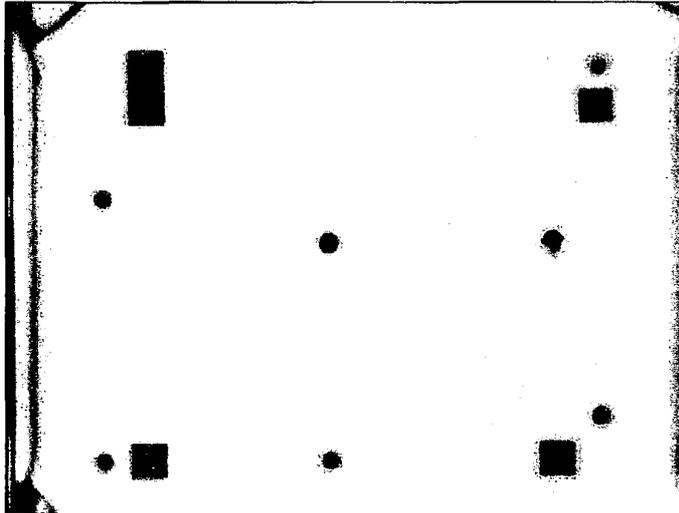
Figura 1.



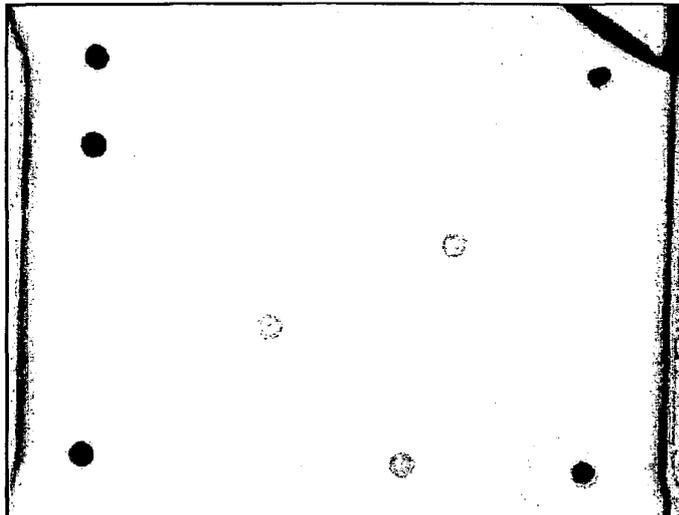
Pocillo	Muestra	Cebadores de amplificación
1	Peso Molecular Marcador	
2	S2	L6 / L7
3	S3	
4	S11	
5	S16	
6	S2	L6 / L7 + L6.2 / L7.2
7	S3	
8	S11	
9	S16	
10	Peso Molecular Marcador	

Figura 2.

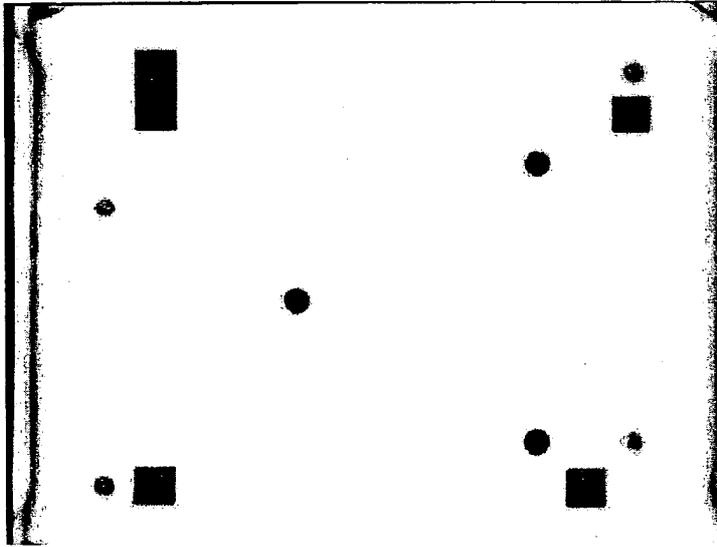
A. Muestra S7 de la tabla II (hMPV, tipo A). Condiciones de amplificación según Multiplex 1.



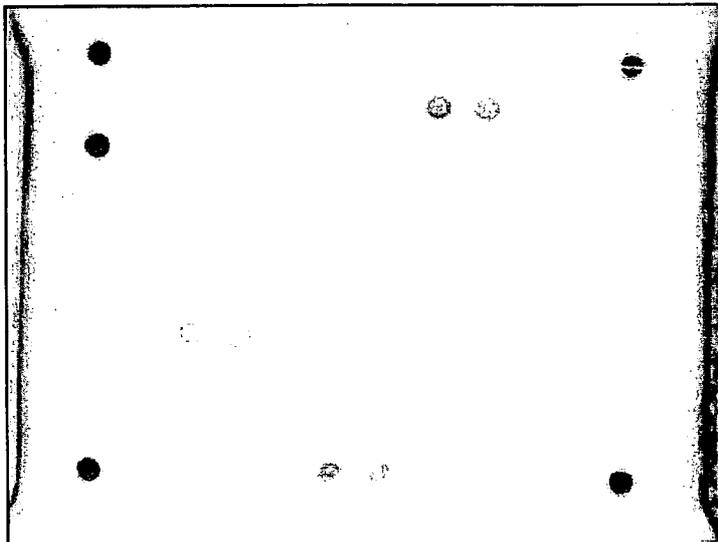
B. Muestra S7 de la tabla II (hMPV, tipo A). Condiciones de amplificación según Multiplex 2.



C. Muestra S2 de la tabla II (hMPV, tipo B). Condiciones de amplificación según Multiplex 1.



D. Muestra S2 de la tabla II (hMPV, tipo B). Condiciones de amplificación según Multiplex 2.



Todos los puntos, a excepción de algunos marcadores de posición, corresponden a híbridos de los productos de amplificación desnaturalizados con sondas específicas de la diana.