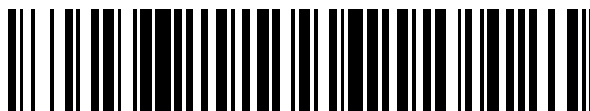


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 556**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2002** **E 11154847 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014** **EP 2390259**

54 Título: **Reactivos para amplificar y detectar el VIH-1**

30 Prioridad:

04.09.2001 US 945943

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

06.05.2014

73 Titular/es:

ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US

72 Inventor/es:

HACKETT, JOHN R. JR.;
SWANSON, PRISCILLA;
ABRAVAYA, KLARA;
DEVARE, SUSHIL;
GORZOWSKI, JACEK J.;
ESPING, CLAUDIA y
TANG, NING

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 458 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reactivos para amplificar y detectar el VIH-1

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). En particular la invención se refiere a métodos para amplificar y detectar secuencias de ácidos nucleicos del VIH-1.

10 Antecedentes de la invención

La caracterización molecular de cepas del VIH-1 recogidas por todo el mundo ha revelado una amplia diversidad genética. Basándose en análisis filogenéticos de secuencias genómicas virales, el VIH-1 se ha dividido en tres grupos distintos, M, N y O. Los virus del grupo M representan la mayoría del VIH-1 y basándose en la divergencia de secuencias se ha subdividido además en nueve clados diferenciados, denominados subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, y K (Robertson, D.L. et al en: Human Retroviruses and AIDS 1999 - A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences, Kuiken, C. et. al. Eds., páginas. 492-505 (1999)). El patrón filogenético para los aislados del grupo M se ha descrito como una filogenia en forma de estrella con los subtipos más o menos equidistantes entre sí que al mismo tiempo divergen de un ancestro común. Para las secuencias de aminoácidos del gen de la envoltura (*env*) viral, el grado de divergencia intrasubtipo varía hasta un 20 % y la divergencia intersubtipo varía entre el 25 y 30 % (Sharp, P.M. et al, AIDS 8: S27-S42 (1994)).

En 1990, se informó de una cepa inusual del VIH-1 (ANT70) aislada de un paciente camerunés (De Leys, R. et. al., J. Virol. 64:1207-1216 (1990)). Basándose en la información de secuencias disponibles, esta cepa del virus parecía ser muy diferente de otras secuencias del VIH-1. Se aisló un virus similar (MVP-5180) de un segundo paciente camerunés (Gürtler, L. et. al., J. Virol. 68:1581-1585 (1994)). Una secuenciación completa del genoma reveló que aunque estos virus compartían la misma estructura genómica general con las cepas del grupo M, sus secuencias eran altamente divergentes teniendo únicamente una homología de nucleótidos de aproximadamente el 50 % con el gen *env* en comparación con aislados del grupo M (Gürtler, L. et. al., J. Virol. 68:1581-1585 (1994)). Debido al grado de divergencia genética de las cepas del grupo M, estos aislados se denominaron virus (atípicos) del grupo O. Más recientemente, en Camerún, se han identificado virus del VIH-1 que son filogenéticamente equidistantes de las cepas del grupo M y del grupo O; estas cepas se han denominado cepas del grupo N (Simon, F. et. al., Nat. Med. 4:1032-1037 (1998)).

Una enzima transcriptasa inversa de forma innata propensa a error, las altas cargas virales y la presión selectiva *in vivo* contribuyen completamente a la diversidad genética del VIH-1. Una fuente de diversidad adicional es un producto secundario del ciclo replicativo del VIH en el que dos transcritos genómicos de ARN unidos en sus extremos 5' se encapsidan en un virión. Si una célula se infecta simultáneamente con más de una cepa del VIH-1, pueden producirse viriones heterocigotos. Después de la infección con el virión, la transcriptasa puede intercambiarse de un sitio a otro entre los dos transcritos de ARN, generando un virus recombinante (Hu, W. S. y H. M. Temin, Science 250:1227-1233 (1990)). Esta capacidad para recombinar proporciona una oportunidad para un cambio genético rápido y drástico. Sabino y colaboradores, que caracterizaron un mosaico B/F encontrado en dos pacientes relacionados epidemiológicamente, identificaron por primera vez un virus recombinante intersubtipo de origen natural (Sabino, E.C. et. al., J. Virol. 68:6340-6346 (1994)). En zonas donde circulan conjuntamente subtipos múltiples, los recombinantes intersubtipo pueden representar el 20 % o más de las infecciones por VIH-1 (Cornelissen, M. et. al., J. Virol. 70:8209-8212 (1996)). Aunque la mayoría de los recombinantes virales descritos hasta la fecha son mosaicos intersubtipo del grupo M, también se han identificado virus recombinantes intergrupo compuestos de segmentos de genes del grupo M y del grupo O (Peeters, M. et. al., J. de Virol. 73:7368-7375 (1999)).

La caracterización de genomas de longitud completa reveló que cepas de referencia de dos subtipos del grupo M previamente reconocidos eran en realidad virus recombinantes intersubtipo. Todos los representantes de las cepas del "subtipo E" secuenciadas hasta la fecha consisten en genes de ADN polimerasa (*pol*) dependiente de ARN y *gag* del subtipo A mientras que su gen *env* deriva del subtipo E (Gao, F. et. al., J. Virol. 70:7013-7029 (1996)). Desde entonces se ha demostrado que las cepas del VIH-1 previamente reconocidas como cepas del subtipo I son mosaicos triples que consisten en segmentos subgenómicos derivados de los subtipos A, G e I (Nasioulas, G. et. al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 15:745-758 (1999)). Dichas cepas recombinantes con confirmación de propagación epidémica se han clasificado como Formas Recombinantes Circulantes (FRC; Robertson, D.L. et In: Human Retroviruses and AIDS 1999- A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences, Kuiken, C. et. al. Eds., págs. 492-505 (1999)).

El potencial para la aparición de cepas de FRC está bien documentado. Las cepas del subtipo E, denominadas CRF01_AE, son la forma predominante del VIH-1 en Tailandia. En Kaliningrado, se ha documentado recientemente un brote de un virus recombinante A/B (CRF03_AB) en consumidores de drogas inyectables (Liitsola, K. et. al., AIDS 12:1907-1919 (1999)). En Nigeria, Yibuti y regiones del Centro Oeste de África se ha identificado un recombinante intersubtipo A/G con un patrón de mosaico único y complejo (CRF02_AG) (Carr, J.K. et. al., Virology 247:22-31

(1998)).

La distribución general de los grupos, subtipos y FRC del VIH-1 varía considerablemente en regiones geográficas distintas y está sufriendo un cambio constante. Aunque el subtipo B es predominante en América del Norte y en Europa Occidental (McCutchan, F.E., AIDS 14 (suplemento 3): S31-S44 (2000)), se están observando, tanto en Europa como en los Estados Unidos, números cada vez mayores de infecciones que no son del subtipo B. En Francia, durante la década que va de 1985 a 1995, la frecuencia de virus no B aumentó de aproximadamente un 4 % a más de un 20 % (Barin, F. et. al., AIDS 11:1503-1508 (1997)). Prácticamente en todas las regiones estudiadas se encontraron especímenes no-B reactivos. Extraordinariamente, casi todas las infecciones del subtipo M y del grupo O se presentaron en un solo hospital de París (Simon, F. et. al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 15:1427-1433 (1996)). El análisis de 24 pacientes alemanes recientemente infectados reveló que el 33 % estaba infectado con virus no-B; éstos incluían los subtipos A, E y C (Dietrich, U. et. al., AIDS 11:1532-1533 (1997)). En Bélgica se detectaron infecciones con los subtipos A, C, D, E, F, G y H que representaban más del 30 % de las infecciones totales por VIH-1 (Heyndrickx, L. et. al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 14:1291-1296 (1998)). También se están detectando en Estados Unidos números cada vez mayores de infecciones que no son del subtipo B, incluyendo los subtipos A, D, E, F y grupo O (Weidle, P.J. et. al., J. Infect. Dis. 181:470-475 (2000)). Por tanto, la heterogeneidad viral está aumentando en regiones en las que el subtipo B era tradicionalmente el más frecuente.

La cuantificación de ARN asociado a virión en plasma se ha convertido en un método bien establecido para el tratamiento clínico y seguimiento de pacientes con infección por VIH-1. Se han desarrollado diversas técnicas basadas en ácidos nucleicos para la detección y cuantificación de ARN viral del VIH-1 que incluyen, reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa inversa (RT-PCR), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), y ADN ramificado (ADNr) (Mulder, J. et. al., J. Clin. Microbiol. 32:292-300 (1994); Kievits, T. et. al., J. Virol. Methods 35:273-286 (1991); Kern, D. et. al., J. Clin. Microbiol. 34:3196-3202 (1996); Swanson P. et. al., J. Virol. Methods 89:97-108 (2000)). Todas estas técnicas se basan en la hibridación de oligonucleótidos con las secuencias diana. Los emparejamientos erróneos entre los cebadores/sondas y las secuencias diana tienen la posibilidad de suprimir o reducir la eficiencia de amplificación y/o detección de las secuencias diana. Por tanto, la selección de secuencias cebador y/o sonda juega un papel crítico en el rendimiento de estos ensayos.

Los ensayos originales basados en ácidos nucleicos se desarrollaron principalmente basándose en información de secuencias derivadas del VIH-1 de subtipo B común en los Estados Unidos y en Europa Occidental. La influencia de la diversidad genética del VIH-1 en la eficiencia de amplificación en el ensayo de primera generación Amplicor VIH-1 Monitor (versión 1.0) se puso de manifiesto rápidamente ya no detectaba o infracuantificaba especímenes clínicos y aislados virales de los subtipos A, E, F y G del grupo M y el grupo O (Loussert-Ajaka, I. et. al., Lancet 346:912-913 (1995); Coste, J. et. al., J. Med. Virol. 50:293-302 (1996); Swanson P. et. al. J. Virol. Methods 89:97-108 (2000)). También se demostró que los emparejamientos erróneos debidos a la diversidad genética del VIH-1 afectaban a la cuantificación de los especímenes de los subtipos A, G, H y J del grupo M y del grupo O por el ensayo QT de ARN del VIH-1 NASBA (Coste, J. et. al., J. Med. Virol. 50:293-302 (1996); Vandamme, A-M. et. al., J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 13:127-139 (1996); Debyser, Z. et. al. al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 14:453-459 (1998)). La diversidad intrasubtipo también tiene influye en estos ensayos ya que tanto el Amplicor VIH-1 Monitor como el QT de ARN del VIH-1 NASBA infracuantificaban los especímenes del subtipo 5 genéticamente divergentes (Alaeus, A. et. al., AIDS 11:859-865 (1997); Gobbers, E. et. al., J. Virol. Methods 66:293-301 (1997)). La influencia de la diversidad genética en el rendimiento del ensayo era todavía obvia incluso en las versiones de segunda generación de los ensayos RT-PCR, NASBA y ADNr (Segondy, M. et. al., J. Clin. Microbiol. 36:3372-3374 (1997); Holguin P. et. al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18:256-259 (1999)). El ensayo actual Amplicor Monitor 1.5 muestra una mejora notable en los subtipos del grupo M, pero no consigue detectar o cuantifica de manera poco fiable, los especímenes del grupo O (Swanson P. et. al., J. Virol. Methods 89:97-108 (2000)). Los ensayos NASBA y ADNr basados en *gag* tampoco consiguen detecta o infracuantifican los especímenes del grupo O (Gobbers, E. et. al., J. Virol. Methods 66:293-301 (1997, Swanson P. et. al., J. Clin. Micro. 39:862-870 (2001))

Debido a la distribución geográfica continuamente cambiante de los grupos y subtipos del VIH-1 y al número cada vez mayor de formas recombinantes del VIH-1, se ha convertido en crítico que los ensayos utilizados para controlar niveles de ARN del VIH-1 en plasma sean capaces de detectar todas las variantes del VIH-1. Idealmente, los ensayos utilizados para cuantificar el ARN viral del VIH-1 deberían funcionar de manera independiente del grupo y subtipo para garantizar una cuantificación fiable de todas las infecciones.

Complicando más la dificultad en encontrar un conjunto de cebadores capaz de hibridar inicialmente con los diversos grupos y subtipos del genoma del VIH-1, con gran capacidad de mutar, está el hecho de que los cebadores seleccionados al compararlos con diversos genomas no son necesariamente efectivos para amplificar la diana deseada. Tal como se describe en He Q., et al., BioTechniques, vol. 17, N° 1, páginas 82-86 (1994), los expertos en la técnica experimentan dificultades inexplicables en la obtención de un producto de amplificación significativo a partir de conjuntos de cebadores que se hibridan con una secuencia diana seleccionada. Este fenómeno, aún sin explicar, ha sido un desafío que afrontan los diseñadores de conjuntos de cebadores para una secuencia diana determinada y además complica la elección de cebadores para una diana, ya de por sí difícil, del VIH-1. El documento WO 01/46404 divulga un ensayo para detectar el VIH-1 utilizando conjuntos de cebadores específicos y

una sonda de baliza molecular.

Por lo tanto hay una necesidad de conjuntos de cebadores y reactivos para amplificar y detectar de manera específica y sensible variantes del VIH-1 que incluyen las de los grupos M, N y O del VIH-1, así como los diversos subtipos de o derivados de estos grupos.

5

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación proporciona reactivos útiles para amplificar y detectar todas las cepas de los grupos M, N y O del VIH-1 incluyendo las FRC y recombinantes intergrupo. En particular, los reactivos están en forma de conjuntos de cebadores que pueden emplearse de acuerdo con procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar de manera específica y sensible variantes del VIH-1 mencionadas anteriormente. Los conjuntos de cebadores proporcionados en el presente documento pueden emplearse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos bien conocidos que utilizan un par de cebadores para amplificar una secuencia diana del VIH-1. También se proporcionan secuencias sonda. Las secuencias sonda se pueden combinar con diversos conjuntos de cebadores para formar conjuntos de oligonucleótidos u "oligo" que se pueden utilizar para amplificar y detectar una secuencia diana de VIH-1.

Los conjuntos de cebadores de la presente divulgación que pueden utilizarse para detectar el VIH-1 se designan en el presente documento como conjunto de cebadores 1 (SEC. ID. N°. 1 y SEC. ID. N°. 2); conjunto de cebadores 2 (SEC. ID. N°. 3 y SEC. ID. N°. 2); conjunto de cebadores 3 (SEC. ID. N°. 4 y SEC. ID. N°. 2); conjunto de cebadores 4 (SEC. ID. N°. 5 y SEC. ID. N°. 2); conjunto de cebadores 5 (SEC. ID. N°. 6 y SEC. ID. N°. 2); conjunto de cebadores 6 (SEC. ID. N°. 7 y SEC. ID. N°. 2); conjunto de cebadores 7 (SEC. ID. N°. 8 y SEC. ID. N°. 2); conjunto de cebadores 8 (SEC. ID. N°. 9 y SEC. ID. N°. 10); conjunto de cebadores 9 (SEC. ID. N°. 9 y SEC. ID. N°. 11); conjunto de cebadores 10 (SEC. ID. N°. 1 y SEC. ID. N°. 12); conjunto de cebadores 11 (SEC. ID. N°. 13 y SEC. ID. N°. 14); conjunto de cebadores 12 (SEC. ID. N°. 13 y SEC. ID. N°. 15); conjunto de cebadores 13 (SEC. ID. N°. 13 y SEC. ID. N°. 2); conjunto de cebadores 14 (SEC. ID. N°. 9 y SEC. ID. N°. 12); conjunto de cebadores 15 (SEC. ID. N°. 1 y SEC. ID. N°. 11); conjunto de cebadores 16 (SEC. ID. N°. 16 y SEC. ID. N°. 12); conjunto de cebadores 17 (SEC. ID. N°. 16 y SEC. ID. N°. 17); conjunto de cebadores 18 (SEC. ID. N°. 3 y SEC. ID. N°. 12); conjunto de cebadores 19 (SEC. ID. N°. 3 y SEC. ID. N°. 18); conjunto de cebadores 20 (SEC. ID. N°. 19 y SEC. ID. N°. 18); conjunto de cebadores 21 (SEC. ID. N°. 13 y SEC. ID. N°. 17); conjunto de cebadores 22 (SEC. ID. N°. 13 y SEC. ID. N°. 20); conjunto de cebadores 23 (SEC. ID. N°. 21 y SEC. ID. N°. 18); conjunto de cebadores 24 (SEC. ID. N°. 21 y SEC. ID. N°. 14); conjunto de cebadores 25 (SEC. ID. N°. 21 y SEC. ID. N°. 20); conjunto de cebadores 26 (SEC. ID. N°. 4 y SEC. ID. N°. 20); conjunto de cebadores 27 (SEC. ID. N°. 5 y SEC. ID. N°. 15); conjunto de cebadores 28 (SEC. ID. N°. 21 y SEC. ID. N°. 22); conjunto de cebadores 29 (SEC. ID. N°. 21 y SEC. ID. N°. 23); conjunto de cebadores 30 (SEC. ID. N°. 5 y SEC. ID. N°. 23); conjunto de cebadores 31 (SEC. ID. N°. 28 y SEC. ID. N°. 29); conjunto de cebadores 32 (SEC. ID. N°. 28 y SEC. ID. N°. 30); conjunto de cebadores 33 (SEC. ID. N°. 28 y SEC. ID. N°. 31); conjunto de cebadores 38 (SEC. ID. N°. 37 y SEC. ID. N°. 32); conjunto de cebadores 39 (SEC. ID. N°. 37 y SEC. ID. N°. 33); conjunto de cebadores 40 (SEC. ID. N°. 38 y SEC. ID. N°. 29); conjunto de cebadores 41 (SEC. ID. N°. 38 y SEC. ID. N°. 30); conjunto de cebadores 42 (SEC. ID. N°. 4 y SEC. ID. N°. 22); conjunto de cebadores 43 (SEC. ID. N°. 4 y SEC. ID. N°. 40); conjunto de cebadores 44 (SEC. ID. N°. 34 y SEC. ID. N°. 22); conjunto de cebadores 45 (SEC. ID. N°. 34 y SEC. ID. N°. 40); conjunto de cebadores 46 (SEC. ID. N°. 24 y SEC. ID. N°. 25); y conjunto de cebadores 47 (SEC. ID. N°. 26 y SEC. ID. N°. 27).

Las secuencias sonda proporcionadas que pueden emplearse para detectar una secuencia diana del VIH-1 (ya esté amplificada o no) se designan en el presente documento como SEC. ID. N°. 41; SEC. ID. N°. 42; SEC. ID. N°. 43; SEC. ID. N°. 44; SEC. ID. N°. 45; SEC. ID. N°. 47; SEC. ID. N°. 48; SEC. ID. N°. 49; SEC. ID. N°. 50; SEC. ID. N°. 51; SEC. ID. N°. 52; SEC. ID. N°. 53; SEC. ID. N°. 55; SEC. ID. N°. 57; SEC. ID. N°. 58; SEC. ID. N°. 59; SEC. ID. N°. 60; SEC. ID. N°. 61; SEC. ID. N°. 62; SEC. ID. N°. 63; SEC. ID. N°. 64; y SEC. ID. N°. 65.

50

Los conjuntos oligo que pueden utilizarse para amplificar y detectar una secuencia diana del VIH-1 se designan en el presente documento como conjunto oligo 1 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 41); conjunto oligo 2 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 42); conjunto oligo 3 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 43); conjunto oligo 4 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 44); conjunto oligo 5 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 45); conjunto oligo 7 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 47); conjunto oligo 8 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 48); conjunto oligo 9 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 49); conjunto oligo 10 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 50); conjunto oligo 11 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 51); conjunto oligo 12 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 52); conjunto oligo 13 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 29, y SEC. ID. N°. 53); conjunto oligo 14 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 41); conjunto oligo 15 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 42); conjunto oligo 16 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 43); conjunto oligo 17 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 44); conjunto oligo 18 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 45); conjunto oligo 20 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 47); conjunto oligo 21 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 48); conjunto oligo 22 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 49); conjunto oligo 23 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 50); conjunto oligo 24 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 51); conjunto oligo 25 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 52); conjunto oligo 26 (SEC. ID. N°. 28, SEC. ID. N°. 30, y SEC. ID. N°. 53);

65

conjunto oligo 27 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 41); conjunto oligo 28 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 42); conjunto oligo 29 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 43); conjunto oligo 30 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 44); conjunto oligo 31 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 45); conjunto oligo 33 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 47); conjunto oligo 34 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 48); conjunto oligo 35 (SEC. ID. N° 37, SEC. ID. N° 32, y SEC. ID. N° 55); conjunto oligo 36 (SEC. ID. N° 37, SEC. ID. N° 33, y SEC. ID. N° 55); conjunto oligo 38 (SEC. ID. N° 37, SEC. ID. N° 33, y SEC. ID. N° 57); conjunto oligo 39 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 50); conjunto oligo 40 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 51); conjunto oligo 41 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 52); conjunto oligo 42 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 53); conjunto oligo 43 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 50); conjunto oligo 44 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 51); conjunto oligo 45 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 52); conjunto oligo 46 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 53); conjunto oligo 47 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 58); conjunto oligo 48 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 59); conjunto oligo 49 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 60); conjunto oligo 50 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 61); conjunto oligo 51 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 62); conjunto oligo 52 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 63); conjunto oligo 53 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 64); y conjunto oligo 54 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 65).

También se proporcionan métodos para amplificar y detectar el VIH-1 en una muestra de ensayo. Generalmente, dichos métodos comprenden poner en contacto una muestra de ensayo con reactivos de amplificación y un conjunto de cebadores previamente mencionado para formar una mezcla de reacción. Después, la mezcla de reacción se pone en condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación, para así amplificar la secuencia diana del VIH-1. Los productos de amplificación pueden detectarse utilizando una diversidad de tecnologías de detección. Sin embargo, preferentemente, un híbrido entre sonda/producto de amplificación se forma y detecta como una indicación de la presencia del VIH-1 en la muestra de ensayo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la relación filogenética de los aislados virales utilizados para ensayar los conjuntos de cebadores para las cepas de referencia de grupo M y grupo O del VIH-1 basándose en el análisis del gen *p24 gag* (399 nucleótidos). Los aislados virales se muestran en negrita. Para las cepas de referencia, el identificador de cepa va precedido del subtipo/grupo. Las agrupaciones de subtipos se indican con un arco y una etiqueta de subtipo; para CRF01_AE y CRF02_AG, el arco es discontinuo. Los valores de arranque mayores del 70 % se muestran en los nodos de las ramas principales.

La Figura 2 muestra la relación filogenética de los aislados virales utilizados para ensayar los conjuntos de cebadores para las cepas de referencia de grupo M y grupo O del VIH-1 basándose en el análisis del gen de la integrasa *pol* (864 nucleótidos). Los aislados virales se marcan en negrita. Para las cepas de referencia, el identificador de cepa va precedido del subtipo/grupo. Las agrupaciones de subtipos se indican con un arco y una etiqueta de subtipo; para CRF01_AE y CRF02_AG, el arco es discontinuo. Los valores de arranque del 70 % o más se muestran en los nodos de las ramas principales.

La Figura 3 ilustra la relación filogenética de los aislados virales utilizados para ensayar los conjuntos de cebadores para las cepas de referencia del grupo M y grupo O del VIH-1 basándose en el análisis de la región inmunodominante gp41 de *env* (369 nucleótidos). Los aislados virales están marcados en negrita. Para las cepas de referencia, el identificador de cepa va precedido del subtipo/grupo. Las agrupaciones de subtipo se indican con un arco y una etiqueta de subtipo; para CRF01_AE y CRF02_AG, el arco se indica con una línea discontinua. Los valores de arranque mayores del 70 % se muestran en los nodos de las ramas principales.

La Figura 4 ilustra un esquema de los fragmentos de amplificación por PCR esperados para cada conjunto de cebadores alineados con el gen de longitud completa de la integrasa *pol*. Cada fragmento está etiquetado con el número del conjunto de cebadores y la longitud del fragmento esperada en pares de bases (pb). También se muestran la posición relativa y la dirección de los cebadores de la Tabla 3 utilizados para la primera ronda de amplificación del gen de longitud completa de la integrasa *pol* para los aislados tanto del grupo M como O.

La Figura 5A-D muestra la detección de fragmentos de la integrasa *pol* amplificada por RT-PCR por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio para todos los aislados ensayados. La Figura 5A muestra la amplificación utilizando el conjunto de cebadores N° 1. Las bandas de peso molecular que corresponden a los marcadores de 600, 500 y 1.000 pb se destacan con flechas. La Figura 5B muestra la amplificación utilizando el conjunto de cebadores N° 2. Las bandas de peso molecular que corresponden a los marcadores de 600 y 1.000 pb se destacan con flechas. La Figura 5C muestra la amplificación utilizando el conjunto de cebadores N° 12. Las bandas de peso molecular que corresponden a los marcadores de 600 y 1.000 pb se destacan con flechas. La Figura 5D muestra la amplificación utilizando el conjunto de cebadores N° 13. La banda de peso molecular que corresponde al marcador de 500 pb se destaca con una flecha.

La Figura 6 muestra la detección por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de fragmentos de la integrasa *pol* del aislado DJ263 grupo M subtipo CRF02_AG amplificados por RT-PCR.

utilizando todos los conjuntos de cebadores no mostrados en las Figuras 5 a 8. Las bandas de peso molecular que corresponden a los marcadores de 600, 500 y 1.000 pb se destacan con flechas.

Las Figuras 7A y 7B muestran la detección por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de fragmentos de la integrasa *pol* del aislado 3012 del grupo O amplificados por RT-PCR utilizando todos los conjuntos de cebadores no mostrados en la Figura 5. Las bandas de peso molecular que corresponden a los marcadores de 600, 500 y 1.000 pb se destacan con flechas.

Descripción detallada de la invención

Los conjuntos de cebadores proporcionados en el presente documento comprenden dos cebadores de oligonucleótidos que pueden emplearse para amplificar una secuencia diana del VIH-1 en una muestra de ensayo. La expresión "muestra de ensayo", tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier cosa sospechosa de contener una secuencia diana del VIH-1. La muestra de ensayo es, o puede derivar de, cualquier fuente biológica, tal como, por ejemplo, sangre, fluido seminal, líquido de cristalino ocular, líquido cefalorraquídeo, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, tejido, caldos de fermentación, cultivos celulares y similares. La muestra de ensayo puede utilizarse (i) directamente tal como se obtiene de la fuente o (ii) después de un tratamiento previo para modificar el carácter de la muestra. Por tanto, la muestra de ensayo puede pretratarse antes de su uso, por ejemplo, preparando plasma a partir de sangre, alterando las células o partículas virales, preparando líquidos a partir de materiales sólidos, diluyendo líquidos viscosos, filtrando líquidos, destilando líquidos, concentrando líquidos, desactivando componentes de interferencia, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos, y similares.

Una "secuencia diana", tal como se utiliza en el presente documento, significa una secuencia de ácido nucleico que se amplifica, detecta, o tanto se amplifica como detecta utilizando los conjuntos de cebadores proporcionados en el presente documento. Además, aunque la expresión secuencia diana se cita en ocasiones como monocatenaria, los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia diana puede ser en realidad bicatenaria. Por tanto, en casos en los que la diana es bicatenaria, las secuencias de cebadores de la presente invención amplificarán las dos cadenas de la secuencia diana.

Los conjuntos de cebadores que pueden emplearse para amplificar una secuencia diana del VIH-1 comprenden preferentemente ácido desoxirribonucleico (ADN), o ácido ribonucleico (RNA). Dichos conjuntos de cebadores pueden emplearse de acuerdo con cualquier técnica de amplificación de ácidos nucleicos que emplee dos oligonucleótidos para amplificar una secuencia diana. Por ejemplo, los conjuntos de cebadores pueden utilizarse de acuerdo con cualquiera de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos bien conocidas tales como, por ejemplo, NASBA o reacciones similares tales como TMA descritas en la Patente de Estados Unidos Nº 5.399.491; y PCR que se describe en las Patentes de Estados Unidos números 4.683.195 y 4.683.202. Adicionalmente, a la luz de la naturaleza del ARN del genoma del VIH-1, los conjuntos de cebadores pueden emplearse de acuerdo con un formato "RT-PCR" que se describe en las Patentes de Estados Unidos números 5.322.770 y 5.310.652. En resumen, el formato RT-PCR proporciona un método para transcribir una cadena de ADN a partir de una secuencia diana de ARN. La cadena de ADN copiada, transcrita a partir de la diana de ARN, se cita comúnmente como "ADNc" que después puede servir como molde para la amplificación mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. El proceso para generar ADNc comparte muchos de los principios de hibridación y extensión que están relacionados con otros métodos de amplificación, tales como PCR, pero la enzima empleada debe tener actividad de transcriptasa inversa. Las enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa, así como el proceso de la RT-PCR, son bien conocidos y por lo tanto no requieren análisis adicional. Además, también se conocen otros métodos para sintetizar ADNc e incluyen los de la Patente de Estados Unidos del mismo solicitante Nº 5.686.272. Generalmente, por lo tanto, amplificar una secuencia diana del VIH-1 en una muestra de ensayo generalmente comprenderá las etapas de poner en contacto una muestra de ensayo con un conjunto de cebadores y reactivos de amplificación para formar una mezcla de reacción y poner la mezcla de reacción en condiciones de amplificación para así amplificar la secuencia diana.

La frase "reactivos de reacción de amplificación", tal como se utiliza en el presente documento, significa reactivos que son bien conocidos por su uso en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y puede incluir, pero sin limitación: un reactivo simple o múltiple, reactivos, enzima o enzimas por separado o individualmente que tienen actividad de transcriptasa inversa y/o polimerasa o actividad de exonucleasa; cofactores enzimáticos, tales como, magnesio o manganeso; sales; nicotinamida adenina dinucleótido (NAD); y desoxinucleósido trifosfatos (dNTP), tales como, por ejemplo, desoxiadenosina trifosfato, desoxiguanosina trifosfato, desoxicitidina trifosfato y timidina trifosfato. Los reactivos de amplificación exactos empleados son principalmente una cuestión de elección del experto en la técnica basándose en la reacción de amplificación particular empleada.

Las "condiciones de amplificación" se definen generalmente como condiciones que promueven la hibridación y extensión de secuencias de cebadores y son bien conocidas y una cuestión de elección para los expertos en la técnica basándose en la reacción de amplificación seleccionada. Así, por ejemplo, en el caso de las condiciones de amplificación por PCR pueden comprender el ciclado la mezcla de reacción entre dos o más temperaturas diversamente denominadas ciclado térmico. Típicamente, las reacciones por PCR se ciclan entre 20 y 50 veces para

conseguir la amplificación deseada. En casos en los que se emplean reacciones de amplificación denominadas “isotérmicas”, la amplificación se realiza sin realizar ciclado entre diferentes temperaturas y como resultado de la formación de una mezcla de reacción se produce un producto de amplificación, aunque para iniciar la reacción puede requerirse un aumento inicial de la temperatura.

Los conjuntos de cebadores que pueden emplearse para amplificar las secuencias diana del VIH-1 se presentan más adelante en la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 7 (los cebadores directos se muestran como el miembro superior del par, siendo el cebador inverso el miembro inferior del par). Se ha descubierto que la mayor parte de estos conjuntos de cebadores amplifican una secuencia diana del VIH-1 de manera sensible, de modo que puede detectarse un producto de amplificación producido utilizando estos cebadores, en gel o utilizando otros medios explicados con detalle a continuación. Los conjuntos de cebadores indicados en la Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 7 son, preferentemente, lo suficientemente sensibles como para producir un producto de amplificación detectable a partir de 100.000 copias de ácido nucleico del VIH-1 por mililitro de muestra, más preferentemente a partir de 10.000 copias de ácido nucleico del VIH-1 por mililitro de muestra y más preferentemente a partir de 1.500 copias de ácido nucleico del VIH-1 por mililitro de muestra.

Tabla 1

Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC. ID. Nº.
1	CCAGGAATATGGCAATTAGATTG	1
	CCTGCCATCTGTTTTCCATA	2
2	GCAGTCCATGTAGCCAGTGG	3
	CCTGCCATCTGTTTTCCATA	2
3	CACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGG	4
	CCTGCCATCTGTTTTCCATA	2
4	TAGACATAATAGCAACAGACATACAAAC	5
	CCTGCCATCTGTTTTCCATA	2
5	TATTACAGGGACAGCAGAGA	6
	CCTGCCATCTGTTTTCCATA	2
6	GACAGCAGAGACCCCAATTTGGAAAGGACC	7
	CCTGCCATCTGTTTTCCATA	2
7	TGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGT	8
	CCTGCCATCTGTTTTCCATA	2
8	AATTGGAGAGCAATGGCTAGTGA	9
	CCTTCTAAATGTGTACAATC	10
9	AATTGGAGAGCAATGGCTAGTGA	9
	TCTGCTGGGATAACTTCTGCTTCTA	11
10	CCAGGAATATGGCAATTAGATTG	1
	TTATTCATAGATTCTACTACTCCTTGACTTTG	12
11	AAGGCAGCCTGTTGGTGG	13
	GTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTA	14
12	AAGGCAGCCTGTTGGTGG	13
	ACTACTGCCCCCTTCACCTTTCCA	15
13	AAGGCAGCCTGTTGGTGG	13
	CCTGCCATCTGTTTTCCATA	2
14	AATTGGAGAGCAATGGCTAGTGA	9
	TTATTCATAGATTCTACTACTCCTTGACTTTG	12
15	CCAGGAATATGGCAATTAGATTG	1
	TCTGCTGGGATAACTTCTGCTTCTA	11
16	GATTGTACACATTTAGAAGG	16
	TTATTCATAGATTCTACTACTCCTTGACTTTG	12
17	GATTGTACACATTTAGAAGG	16
	AATACTGCCATTTGTACTGCTGT	17
18	GCAGTCCATGTAGCCAGTGG	3
	TTATTCATAGATTCTACTACTCCTTGACTTTG	12
19	GCAGTCCATGTAGCCAGTGG	3
	CCCCCAATCCCCCTTTTCTTTTAAAATTGTG	18
20	AAGATGGCCAGTAAAAGTAATACACACAGACAA	19
	CCCCCAATCCCCCTTTTCTTTTAAAATTGTG	18

Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC. ID. Nº.
21	AAGGCAGCCTGTTGGTGG	13
	AATACTGCCATTTGACTGCTGT	17
22	AAGGCAGCCTGTTGGTGG	13
	ACCCGAAAATTTTGAATTTTT	20
23	CAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAA	21
	CCCCCAATCCCCCTTTTCTTTTAAAATTGTG	18
24	CAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAA	21
	GTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTA	14
25	CAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAA	21
	ACCCGAAAATTTTGAATTTTT	20
26	CACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGG	4
	ACCCGAAAATTTTGAATTTTT	20
27	TAGACATAATAGCAACAGACATACAAAC	5
	ACTACTGCCCTTTCACCTTTCCA	15
28	CAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAA	21
	TCTCTGCTGTCCCTGTAATA	22
29	CAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAA	21
	GGTCCTTTCCAAATTGGGTCTCTGCTGTC	23
30	TAGACATAATAGCAACAGACATACAAAC	5
	GGTCCTTTCCAAATTGGGTCTCTGCTGTC	23

Los productos de amplificación producidos utilizando los conjuntos de cebadores proporcionados en el presente documento pueden detectarse utilizando una diversidad de tecnologías de detección bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los productos de amplificación pueden detectarse utilizando electroforesis en gel de agarosa y visualización por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta (UV) o por análisis de secuencia del producto de amplificación para confirmar la identidad del VIH-1.

Como alternativa, los productos de amplificación pueden detectarse por hibridación de oligonucleótidos con una sonda. Las secuencias sonda generalmente tienen una longitud de 10 a 50 nucleótidos, más típicamente de 15 a 40 nucleótidos de longitud, y de manera similar a las secuencias de cebadores, las secuencias sonda también son ácidos nucleicos. Por lo tanto, las sondas pueden comprender ADN, ARN o análogos de ácidos nucleicos tales como análogos de ácidos nucleicos sin carga, incluyendo, pero sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que se divulgan en la Solicitud de Patente Internacional WO 92/20702 o análogos de morfolino que se describen en las Patentes de Estados Unidos números 5.185.444, 5.034.506 y 5.142.047. Dichas secuencias pueden sintetizarse rutinariamente utilizando una diversidad de técnicas actualmente disponibles. Por ejemplo, una secuencia de ADN puede sintetizarse utilizando química de fosoramidita de nucleótidos convencional y los instrumentos disponibles de Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA); DuPont, (Wilmington, DE); o Milligen, (Bedford, MA). De manera similar, y cuando es deseable, las sondas pueden marcarse utilizando metodologías bien conocidas en la técnica, tales como las descritas en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos números 5.464.746, 5.424.414 y 4.948.882. Además, las sondas se hibridan típicamente con la secuencia diana entre las secuencias de cebadores. En otras palabras, la secuencia de la sonda típicamente no es coincidente con ningún cebador.

El término "marcador", tal como se utiliza en el presente documento, significa una molécula o resto que tiene una propiedad o característica que es susceptible de detección. Un marcador puede detectarse directamente, como con, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes y similares; o un marcador puede detectarse indirectamente como con, por ejemplo, miembros de unión específicos. Se entenderá que los marcadores directamente detectables pueden requerir componentes adicionales, tales como, por ejemplo, sustratos, reactivos desencadenantes, luz, y similares para permitir la detección del marcador. Cuando se utilizan marcadores indirectamente detectables, se utilizan típicamente en combinación con un "conjugado". Un conjugado es típicamente un miembro de unión específico que se ha unido o acoplado a un marcador directamente detectable. Los compuestos químicos de acoplamiento para sintetizar un conjugado se conocen bien en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, cualquier medio químico y/o medio físico que no destruya la propiedad específica de unión del miembro de unión específica o la propiedad detectable del marcador. Tal y como se utiliza en el presente documento, "miembro de unión específica" significa un miembro de un par de unión, es decir, dos moléculas diferentes donde una de las moléculas, a través de, por ejemplo, medios químicos o físicos, se une específicamente a la otra molécula. Además de las parejas de unión específica, de antígeno y anticuerpo, otras parejas de unión específica incluyen, pero sin pretender su limitación, avidina y biotina; haptenos y anticuerpos específicos para haptenos; secuencias de nucleótidos complementarias; cofactores enzimáticos o sustratos y enzimas; y similares.

Las secuencias sonda pueden emplearse utilizando una diversidad de metodologías homogéneas o heterogéneas para detectar productos de amplificación. Generalmente todos estos métodos emplean una etapa en la que la sonda se hibrida con una cadena de un producto de amplificación para formar un híbrido entre sonda/producto de amplificación. Después, el híbrido puede detectarse utilizando marcadores en el cebador, en la sonda o en ambos. Los ejemplos de plataformas de detección homogéneas para detectar productos de amplificación incluyen el uso de marcadores FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) unidos a sondas que emiten una señal en presencia de la secuencia diana. Los ensayos denominados TaqMan descritos en la Patente de Estados Unidos Número 5.210.015 y los ensayos de Baliza Molecular (*Molecular Beacon*) descritos en la Patente de Estados Unidos Número 5.925.517 son ejemplos de técnicas que pueden emplearse para detectar de modo homogéneo secuencias de ácidos nucleicos. De acuerdo con técnicas de detección homogéneas, los productos de la reacción de amplificación pueden detectarse a medida que se forman o de una manera que se denomina en tiempo real. Como resultado, se forman híbridos entre producto de amplificación/sonda y se detectan mientras la mezcla de reacción está en condiciones de amplificación.

Los formatos de detección heterogénea emplean típicamente un reactivo de captura para separar secuencias amplificadas de otros materiales empleados en la reacción. Los reactivos de captura son típicamente un material de soporte sólido que está revestido con uno o más miembros de unión específicos, específicos para los mismos miembros de unión o distintos. Un "material de soporte sólido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier material que es insoluble, o puede hacerse insoluble por una reacción posterior. Por tanto, los materiales de soporte sólido pueden ser un látex, plástico, plástico derivatizado, metal magnético o no magnético, una superficie de silicio o vidrio o superficies de tubos de ensayo, pocillos de microtitulación, láminas, perlas, micropartículas, microplacas, y otras configuraciones conocidas para los expertos habituales en la materia. Para facilitar la detección de un híbrido entre producto de amplificación/sonda de una manera de tipo heterogénea, las sondas pueden marcarse con un primer miembro de unión que es específico para su compañero de unión que se une a un material de soporte sólido tal como una micropartícula. De manera similar, los cebadores pueden marcarse con un segundo miembro de unión específico para un conjugado tal como se define anteriormente. Los productos de amplificación unidos a las sondas pueden separarse a continuación de la mezcla de reacción restante poniendo en contacto la mezcla de reacción con el soporte sólido anterior y a continuación eliminando el soporte sólido de la mezcla de reacción. Cualquier híbrido entre producto de amplificación/sonda unido al soporte sólido puede ponerse después en contacto con un conjugado para detectar la presencia de los híbridos en el soporte sólido.

Tanto si se detecta de una manera heterogénea como homogénea, los métodos para detectar una secuencia diana en una muestra de ensayo generalmente comprenden las etapas de poner en contacto una muestra de ensayo con un conjunto de cebadores proporcionados en el presente documento, y reactivos de amplificación para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se pone a continuación en condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación, tal como se especifica anteriormente. El producto de amplificación se detecta después como indicación de la presencia de la secuencia diana en la muestra de ensayo. Como se ha indicado anteriormente, el producto de reacción puede detectarse utilizando electroforesis en gel, métodos heterogéneos u homogéneos. Por consiguiente, el producto de reacción puede detectarse en la mezcla de reacción, mientras que está en condiciones de amplificación, con técnicas homogéneas, tales como, sondas TaqMan o Balizas Moleculares (*Molecular Beacons*). Como alternativa, el producto de amplificación puede detectarse después de completarse la amplificación de la secuencia diana utilizando técnicas heterogéneas o geles.

La presente invención también proporciona conjuntos de oligonucleótidos útiles para amplificar y detectar una secuencia diana de VIH-1 en una muestra de ensayo. Estos conjuntos de oligonucleótidos, o "conjuntos oligo", comprenden un conjunto de cebadores y una sonda baliza molecular que puede utilizarse del modo indicado anteriormente. Además, los conjuntos oligo pueden empaquetarse en contenedores adecuados y proporcionarse con reactivos adicionales tales como, por ejemplo, reactivos de amplificación (también en contenedores adecuados) para proporcionar kits para detectar el VIH-1 en una muestra de ensayo.

En el caso de detección utilizando baliza molecular, las secuencias sonda se modifican y se marcan con un marcador de detección fluorescente y un grupo inactivador de fluorescencia. La parte sonda de la secuencia se utiliza para hibridarse con la secuencia generada por la secuencia cebadora y se hibrida típicamente con una secuencia que no incluye la secuencia cebadora. En este formato, también es posible explorar con balizas múltiples, cada una marcada con un fluoróforo diferente. Después de la formación de los híbridos entre secuencia copia/baliza molecular, pueden utilizarse marcadores diferenciales de diferentes balizas moleculares para separar y detectar ligeras variaciones de secuencias que pueden esperarse entre los productos amplificados. Los ejemplos de circunstancias en las que pueden esperarse variaciones en las secuencias amplificadas incluyen el uso de conjuntos de cebadores múltiples en la reacción de amplificación (por ejemplo, específicos para el VIH-1 y específicos para el VIH-2), adición y co-amplificación de una secuencia de control interno con la secuencia diana inicial, o la posibilidad de amplificar múltiples subtipos del VIH para un solo conjunto de cebadores, tal como los conjuntos de cebadores diseñados para ello, que pueden después distinguirse por secuencias de baliza molecular específicas de subtipo. La detección se realiza utilizando cualquiera de una diversidad de instrumentos disponibles para la detección de fluorescencia como bien saben los expertos en la materia.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención y no con la intención de limitarla.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran la amplificación y detección de diversos subtipos del VIH-1 utilizando los conjuntos de cebadores proporcionados en el presente documento. Estas secuencias de ADN que comprenden los conjuntos de cebadores se identifican como SECUENCIA ID N°. 1, SECUENCIA ID N°. 2, SECUENCIA ID N°. 3, SECUENCIA ID N°. 4, SECUENCIA ID N°. 5, SECUENCIA ID N°. 6, SECUENCIA ID N°. 7, SECUENCIA ID N°. 8, SECUENCIA ID N°. 9, SECUENCIA ID N°. 10, SECUENCIA ID N°. 11, SECUENCIA ID N°. 12, SECUENCIA ID N°. 13, SECUENCIA ID N°. 14, SECUENCIA ID N°. 15, SECUENCIA ID N°. 16, SECUENCIA ID N°. 17, SECUENCIA ID N°. 18, SECUENCIA ID N°. 19, SECUENCIA ID N°. 20, SECUENCIA ID N°. 21, SECUENCIA ID N°. 22, SECUENCIA ID N°. 23, SECUENCIA ID N°. 24, SECUENCIA ID N°. 25, SECUENCIA ID N°. 26, SECUENCIA ID N°. 27, SECUENCIA ID N°. 28, SECUENCIA ID N°. 29, SECUENCIA ID N°. 30, SECUENCIA ID N°. 31, SECUENCIA ID N°. 32, SECUENCIA ID N°. 33, SECUENCIA ID N°. 34, SECUENCIA ID N°. 35, SECUENCIA ID N°. 37, SECUENCIA ID N°. 38, y SECUENCIA ID N°. 40.

Las secuencias sonda empleadas en los ejemplos se identifican como:

SECUENCIA ID N°. 41, SECUENCIA ID N°. 42, SECUENCIA ID N°. 43, SECUENCIA ID N°. 44, SECUENCIA ID N°. 45, SECUENCIA ID N°. 46, SECUENCIA ID N°. 47, SECUENCIA ID N°. 48, SECUENCIA ID N°. 49, SECUENCIA ID N°. 50, SECUENCIA ID N°. 51, SECUENCIA ID N°. 52, SECUENCIA ID N°. 53, SECUENCIA ID N°. 54, SECUENCIA ID N°. 55, SECUENCIA ID N°. 56, SECUENCIA ID N°. 57, SECUENCIA ID N°. 58, SECUENCIA ID N°. 59, SECUENCIA ID N°. 60, SECUENCIA ID N°. 61, SECUENCIA ID N°. 62, SECUENCIA ID N°. 63, SECUENCIA ID N°. 64 y SECUENCIA ID N°. 65.

Ejemplo 1

Preparación de cebadores oligonucleotídicos

Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos para amplificar por RT-PCR todas las cepas del grupo M del VIH-1, cepas del grupo O del VIH-1, o cepas del grupo M y grupo O del VIH-1. Estos conjuntos de cebadores fueron SECUENCIA ID N°. 1, SECUENCIA ID N°. 2, SECUENCIA ID N°. 3, SECUENCIA ID N°. 4, SECUENCIA ID N°. 5, SECUENCIA ID N°. 6, SECUENCIA ID N°. 7, SECUENCIA ID N°. 8, SECUENCIA ID N°. 9, SECUENCIA ID N°. 10, SECUENCIA ID N°. 11, SECUENCIA ID N°. 12, SECUENCIA ID N°. 13, SECUENCIA ID N°. 14, SECUENCIA ID N°. 15, SECUENCIA ID N°. 16, SECUENCIA ID N°. 17, SECUENCIA ID N°. 18, SECUENCIA ID N°. 19, SECUENCIA ID N°. 20, SECUENCIA ID N°. 21, SECUENCIA ID N°. 22, y SECUENCIA ID N°. 23, SECUENCIA ID N°. 24, SECUENCIA ID N°. 25, SECUENCIA ID N°. 26, SECUENCIA ID N°. 27, SECUENCIA ID N°. 28, SECUENCIA ID N°. 29, SECUENCIA ID N°. 30, SECUENCIA ID N°. 31, SECUENCIA ID N°. 32, SECUENCIA ID N°. 33, SECUENCIA ID N°. 34, SECUENCIA ID N°. 35, SECUENCIA ID N°. 37, SECUENCIA ID N°. 38, SECUENCIA ID N°. 40. Las secuencias de cebadores se sintetizaron utilizando metodología de síntesis de oligonucleótidos estándar.

Ejemplo 2

Caracterización de aislados

Para determinar si los conjuntos de cebadores oligonucleotídicos de la presente invención (Tabla 1) podían detectar y amplificar cepas variantes del VIH-1, se usó un panel del grupo M (incluyendo los subtipos más frecuentes), FRC, y aislados virales del grupo O para examinar el rendimiento. Los aislados del VIH-1 se obtuvieron de varias fuentes. Doce aislados del grupo M se obtuvieron del Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR, Bethesda, MD); se obtuvo un aislado de grupo O a través de un Acuerdo de Investigación y Desarrollo Colaborador con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, GA); y se recibió un aislado de grupo O del Serologicals, Inc. (Atlanta, GA). Las reservas virales acelulares de los aislados se prepararon utilizando SRA Technologies (Rockville, MD). Los aislados virales se caracterizaron por análisis filogenéticos y de secuencias para designar la clasificación de grupo/subtipo del VIH-1.

Para el análisis de secuencias, se establecieron tres regiones del genoma del VIH-1: *p24* de *gag* (399 nucleótidos), integrasa *pol* (864 nucleótidos) y la región inmunodominante gp41 de *env* (IDR; 369 nucleótidos). Las reservas virales se diluyeron en plasma humano VIH-1 seronegativo. El ácido nucleico total se extrajo de 200-400 μ l de plasma utilizando el kit QIAamp Blood (Qiagen Inc., Valencia, CA). Los cebadores y las condiciones para la amplificación por RT-PCR de las tres regiones se describieron previamente (Brennan et al., AIDS 11:1823-1832 (1997); Brennan et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 13:901-904 (1997); Hackett et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 13:1155-1158 (1997); Swanson et al., J. Virol. Methods 89:97-108 (2000)). Los productos de

amplificación se purificaron utilizando un kit de purificación QIAquick PCR (QIAGEN Inc.). Ambas cadenas de los productos purificados de la PCR se secuenciaron directamente utilizando un secuenciador automático ABI modelo 377 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y el kit de secuenciación de ciclo de terminación Big Dye de ABI Prism (PE Applied Biosystems). Las secuencias de nucleótidos se alinearon con las de las cepas de referencia establecidas, representando todos los subtipos del grupo M y grupo O, y se analizaron utilizando Lasergene 99 (DNASTAR, Inc., Madison, WI). El paquete informático Phylip (versión 3.5c, J. Felsenstein, University of Washington, Seattle, WA) se usó para análisis filogenético. Las distancias evolutivas se estimaron utilizando DNADIST (método de dos parámetros de Kimura) y reconstrucción filogenética por el método de unión al vecino más cercano (NEIGHBOR). La reproducibilidad de los patrones de ramificación se examinó por análisis de arranque (bootstrap) (100 muestras) con SEQBOOT. Las tres regiones se amplificaron por RT-PCR satisfactoriamente y se secuenciaron a partir de los catorce aislados virales. Los resultados del análisis filogenético se muestran en las FIGURAS 1 a 3 y se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Aislado VIH-1	Subtipo	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>	País
Grupo M:					
BK132	B	B	B	B	Tailandia
US1		B	B	B	Estados Unidos
SE364	C	C	C	C	Senegal
SM145		C	C	C	Somalia
SE365	D	D	D	D	Senegal
UG274		D	D	D	Uganda
CM238	CRF01_AE	A	A	E	Tailandia
CM240		A	A	E	Tailandia
BZ126	F	F	F	F	Brasil
BZ163		F	F	F	Brasil
MIKAG *	G	T	T	T	Kenia
DJ263	CRF02_G (IbNG)	A	T	A	Yibuti
Grupo O:					
08692A					Estados Unidos
3012					España

*MIKAG es la ID de la muestra utilizada internamente para el aislado identificado típicamente como HH8793 (Carr, J.K. et. al., Virology 247:22-31 (1998)).

El panel de aislados seleccionados para el ensayo representa un ámbito geográfico amplio e incluye los subtipos más ampliamente distribuidos del grupo M que incluyen dos cepas FRC y el grupo O. Estos aislados se seleccionaron basándose en los resultados del análisis filogenético del gen de la integrasa *pol* ya que los cebadores de la presente invención están diseñados para dirigirse al gen de la integrasa *pol* del VIH-1. De los 14 aislados, hay una distribución homogénea de dos por cada subtipo del grupo M, tal como se indica mediante el análisis de la región de la integrasa *pol* (Figura 2, Tabla 2), y dos aislados del grupo O. Tal como se describió anteriormente el CRF01_AE es subtipo A en la región de la integrasa *pol*, y por lo tanto, la detección de los aislados del subtipo CRF01_AE demuestra la capacidad de los conjuntos de cebadores para detectar tanto los subtipos A como CRF01_AE. El ensayo de este panel proporciona pruebas de que los cebadores de la presente invención son efectivos para la detección de cepas genéticamente diversas del VIH-1.

Ejemplo 3

Detección de subtipo del VIH-1

Los aislados virales caracterizadas en el Ejemplo 2 se utilizaron para ensayar los conjuntos de cebadores de la Tabla 1 para demostrar que los conjuntos de cebadores detectarán cada una de las cepas de los subtipos del grupo M y FRC del VIH-1, así como aislados del grupo O.

Para facilitar el análisis de los productos de amplificación de la PCR, se realizó la transcripción inversa de las diluciones del ARN purificado del VIH-1, y se amplificó el gen completo de la integrasa *pol* por PCR utilizando los cebadores específicos para el grupo M (*pol*8 y *pol*5) o grupo O (*O-pol*8 y *O-pol*5) indicados en la Tabla 3. Después, se realizó una segunda ronda de amplificación utilizando los conjuntos de cebadores del VIH-1 de la presente invención (Tabla 1) en reacciones distintas.

Tabla 3.

Conjunto de cebadores	Cebador	Secuencia 5'-3' *	Secuencia N°
46	poll8	TAGTGGGATGTGTACTTCTGAAC	24
	poll5	CACACAAAGGRATTGGAGGAAATG	25
47	O-poll8	GATTYCTGGATTTCATAATGATG	26
	O-poll5	GTATCTTACATGGGTTCTGC	27

* Las posiciones de nucleótidos degeneradas se identifican utilizando el código IUPAC.

La RT-PCR se realizó utilizando los componentes del kit de PCR Gene Amp ARN de Perkin Elmer de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADN complementario (ADNc) por transcripción inversa del ácido nucleico con un volumen de muestra de 3 µl en un volumen de reacción total de 20 µl, que contenía los siguientes reactivos: tampón II para PCR, MgCl₂ 5 mM, transcriptasa inversa MuLV a una concentración de 2,5 U/reacción, los dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) a una concentración de 1,0 mM cada uno de ellos, inhibidor de RNasa a una concentración de 1 U/reacción, y 1 µM de cebador. Se realizó la transcripción inversa de las mezclas de reacción y se amplificaron en un termociclador Perkin-Elmer 9600. Las mezclas de reacción RT se incubaron primero a 42 °C durante 40 minutos seguido de 5 minutos a 99 °C.

La primera ronda de amplificación por PCR se realizó añadiendo reactivos adicionales directamente a los 20 µl de la reacción de ADNc para dar un volumen de reacción total de 100 µl. Las reacciones contenían concentraciones finales de MgCl₂ 5 mM, 2,5 U/reacción de ADN polimerasa AmpliAq y 0,5 µM de cada uno de los cebadores directo e inverso. Después las reacciones se ciclaron de la manera siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 minuto, 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 45 °C durante 30 segundos, después 72 °C durante 90 segundos, seguido de una incubación final a 72 °C durante 10 minutos.

Después, los productos de amplificación de la integrasa *pol* de longitud completa se utilizaron como moldes para examinar el rendimiento de los conjuntos de cebadores para el VIH-1 de la presente invención (Tabla 1). Cada conjunto de cebadores se ensayó individualmente en una reacción de 100 µl que contenía: 5 µl de reacción de PCR primaria, tampón de PCR, los dNTP (dATP, dGTP, dTTP y DCTP) a una concentración de 0,2 mM cada uno de ellos, 2,5 U/reacción de ADN polimerasa AmpliAq y 0,5 µM de cada cebador. Las mezclas de reacción se amplificaron en un termociclador Perkin-Elmer 9600 o 9700. Las mezclas de reacción se ciclaron de la manera siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 minuto, 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C o 55 °C durante 30 segundos, después 72 °C durante 90 segundos, seguido de una incubación final a 72 °C durante 10 minutos. Las muestras se mantuvieron a 4 °C antes de efectuar la electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de reacción se detectaron por electroforesis en gel de agarosa. De cada 100 µl de reacción, 5 µl se procesaron en un gel de agarosa junto con marcadores de peso molecular para determinar la longitud del fragmento. La Figura 4 muestra un esquema de los tamaños de fragmento esperados y sus posiciones, relativos al gen de la integrasa, para cada conjunto de cebadores. Los fragmentos se visualizaron después de la tinción con bromuro de etidio por exposición a luz ultravioleta. Se muestra un muestreo representativo de estos datos (Figura 5 - Figura 7). La Figura 5 muestra la amplificación de cada aislado con los conjuntos de cebadores N° 1, N° 2, N° 12 y N° 13. Las Figuras 6 y 7 muestran la amplificación con todos los conjuntos de cebadores restantes para dos aislados específicos: aislado DJ263 de grupo M subtipo CRF02_AG y aislado 3012 de grupo O. Los datos de todos los ensayos llevados a cabo en este experimento se resumen en la Tabla 4 y muestran detección de los subtipos A G del grupo M del VIH-1, así como del grupo O, mediante los conjuntos de cebadores N° 1 a N° 30 para el VIH-1

Para algunos fragmentos, la parte restante de la reacción se purificó y secuenció posteriormente para confirmar la amplificación del producto pretendido. La purificación se realizó con un kit de purificación QIAamp PCR o con un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de la PCR purificados se secuenciaron directamente utilizando los cebadores correspondientes de la presente invención, el kit de secuenciación de ciclo de terminación Big Dye de ABI Prism (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) con ADN polimerasa FS AmpliTaq, y un secuenciador automático ABI modelo 377 (PE Applied Biosystems). La Tabla 5 resume los resultados de secuenciación y demuestra que se amplificaron los fragmentos esperados.

Tabla 4

Aislado del VIH-1	Subtipo/grupo	Conjuntos de cebadores (especificados en la Tabla 1)																													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
BK132	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
US1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nr	+	+
SE364	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SM145		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SE365	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UG274		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CM238	CRF01_A E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CM240		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BZ126	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BZ163		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MIKAG	G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DJ263		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
08692A	Grupo O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3012		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Indica que el tamaño del fragmento esperado se detectó por electroforesis en gel de agarosa, tinción con bromuro de etidio y visualización con luz UV "nr" indica que el ensayo no se realizó
 *MIKAG es la ID de la muestra utilizada internamente para el aislado típicamente identificado como HH8793 (Carr, J. K. et al., Virology 247:22-31 (1998)).

Tabla 5

Aislado del VIH-1	Subtipo/Grupo en la integrasa <i>pol</i>	Número del conjunto de cebadores	Longitud esperada del fragmento	Secuencia del Fragmento Verificada *
CM238	A	4	229	Sí
CM238	A	10	296	Sí
CM240	A	19	353	Sí
CM240	A	29	278	Sí
US1	B	8	158	Sí
BK132	B	26	128	Sí
SE364	C	6	146	Sí
E364	C	14	416	Sí
SM145	C	16	278	Sí
UG274	D	5	155	Sí
DJ263	T	17	353	Sí
3012	Grupo O	3	284	Sí
08692A	Grupo O	9	224	Sí
3012	Grupo O	18	242	Sí
* Verificación del fragmento amplificado correcto determinada por comparación con la secuencia del aislado diana.				

Los conjuntos de cebadores para el VIH-1 N° 1 a N° 30 detectaron satisfactoriamente todos los subtipos del VIH-1 ensayados (Tabla 4), incluyendo los aislados del grupo O genéticamente divergentes. Para cada conjunto de cebadores se detectó un fragmento de la longitud esperada basándose en el análisis en gel de agarosa. Para aquellos fragmentos que se secuenciaron, el análisis de secuencias confirma que cada fragmento amplificado era el fragmento esperado basándose en la comparación con la secuencia de la integrasa del aislado diana.

Ejemplo 4

Sensibilidad al VIH-1

Dos de los aislados virales descritos en los Ejemplos 2 y 3 se utilizaron para evaluar la sensibilidad de los conjuntos de cebadores de la Tabla 1. Los aislados se diluyeron en plasma humano seronegativo al VIH-1 desfibrinado y después se ensayaron utilizando el ensayo cuantitativo de ARN para el VIH de Abbott LCx (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL) para determinar la carga viral. Las muestras diluidas se ensayaron después utilizando los conjuntos de cebadores 1-30 tal como se describe en el Ejemplo 3. Los dos aislados seleccionados para el ensayo fueron un aislado del grupo M, UG274 (subtipo D), a 1.585 copias/ml y un aislado del grupo O, 3012, a 1.479 copias/ml.

Los resultados del ensayo de sensibilidad se resumen en la Tabla 6. Todos los conjuntos de cebadores detectaron satisfactoriamente ambos aislados. Un conjunto de cebadores (conjunto N° 1) necesitó una ligera modificación de las condiciones de la PCR para detectar el aislado del grupo O. El ensayo inicial del aislado del grupo O con el conjunto de cebadores N° 1 mostró resultados mixtos. El primer ensayo mostró una banda muy débil de la longitud del fragmento esperada en el gel de agarosa. Sin embargo, ensayos repetidos no mostraron ninguna banda. Una ligera modificación de las condiciones de la PCR disminuyendo de 50 °C a 45 °C la temperatura de hibridación durante el ciclado, mejoró los resultados y se detectó una banda clara por la electroforesis en gel de agarosa. Las condiciones descritas en el Ejemplo 3 se diseñaron para una exploración general de los conjuntos de cebadores frente a todos los aislados. Los resultados para el conjunto de cebadores N° 1 pueden indicar que, para una sensibilidad óptima, las condiciones de amplificación pueden optimizarse, específicamente para cada conjunto de cebadores.

Estos resultados muestran que los conjuntos de cebadores de la presente invención detectan el VIH-1, tanto del grupo M como del grupo O, con una sensibilidad de al menos 1.500 copias/ml, la concentración más baja ensayada.

Tabla 6

Conjuntos de cebadores (Especificados en la Tabla 1)	Aislado del VIH-1, grupo	
	UG274, grupo M	3012, grupo O
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+

Conjuntos de cebadores (Especificados en la Tabla 1)	Aislado del VIH-1, grupo	
	UG274, grupo M	3012, grupo O
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23	+	+
24	+	+
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	+
30	+	+

Ejemplo 5

Detección de los productos de amplificación del VIH-1, grupos M y O, utilizando sondas de Baliza Molecular (*Molecular Beacon*)

Los cebadores empleados para generar un producto de amplificación que se detectó utilizando sondas de Baliza Molecular fueron SECUENCIA ID N°. 28, SECUENCIA ID N°. 29, SECUENCIA ID N°. 30, SECUENCIA ID N°. 31, SECUENCIA ID N°. 32, SECUENCIA ID N°. 33, SECUENCIA ID N°. 34, SECUENCIA ID N°. 35, SECUENCIA ID N°. 4, SECUENCIA ID N°. 37, SECUENCIA ID N°. 38, SECUENCIA ID N°. 22 y SECUENCIA ID N°. 40. Las secuencias de los cebadores se sintetizaron utilizando metodología de síntesis de oligonucleótidos estándar. Las secuencias de cebadores se utilizaron de manera conjunta en conjuntos de cebadores, tal como se indica a continuación en la Tabla 7, para la detección del VIH (el cebador directo se muestra como el miembro superior del par, siendo el cebador inverso el miembro inferior del par).

Tabla 7

Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC. ID. N°.
31	ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	28
	CCCCTGCACTGTACCCCCCAATCCC	29
32	ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	28
	CCTGCACTGTACCCCCCAATCC	30
33	ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	28
	CCAATCCCCCTTTTCTTTTAAATTGTC	31
34	ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	28
	TGTATTACTACTGCCCTTCACCTTTCCA	32
35	ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	28
	ATCATCACCTGCCATCTGTTTTCCATA	33
36	CACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG	34
	TGTATTACTACTGCCCTTCACCTTTCC	35
37	CACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGG	4
	ATCATCACCTGCCATCTGTTTTCCATA	33
38	TTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGA	37

Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC. ID. N°.
	TGTATTACTACTGCCCTTCACCTTTCCA	32
39	TTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGA	37
	ATCATCACCTGCCATCTGTTTTCCATA	33
40	CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGT	38
	CCCCTGCACTGTACCCCCCAATCCC	29
41	CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGT	38
	CCTGCACTGTACCCCCCAATCC	30
42	CACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGG	4
	TCTCTGCTGTCCCTGTAATA	22
43	CACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGG	4
	TCTCTGCTGTCCCTGTAATAAACC	40
44	CACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG	34
	TCTCTGCTGTCCCTGTAATA	22
45	CACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG	34
	TCTCTGCTGTCCCTGTAATAAACC	40

Ejemplo 6

Preparación de sondas de Baliza Molecular (*Molecular Beacon*) del VIH

- 5 Las sondas de baliza molecular se diseñaron para hibridarse con la secuencia diana de la integrasa del VIH por hibridación de oligonucleótidos. Las sondas eran SECUENCIA ID N° 41, SECUENCIA ID N° 42, SECUENCIA ID N° 43, SECUENCIA ID N° 44, SECUENCIA ID N° 45, SECUENCIA ID N° 46, SECUENCIA ID N° 47, SECUENCIA ID N° 48, SECUENCIA ID N° 49, SECUENCIA ID N° 50, SECUENCIA ID N° 51, SECUENCIA ID N° 52, SECUENCIA ID N° 53, SECUENCIA ID N° 54, SECUENCIA ID N° 55, SECUENCIA ID N° 56, SECUENCIA ID N° 57, SECUENCIA ID N° 58, SECUENCIA ID N° 59, SECUENCIA ID N° 60, SECUENCIA ID N° 61, SECUENCIA ID N° 62, SECUENCIA ID N° 63, SECUENCIA ID N° 64 y SECUENCIA ID N° 65. Las secuencias sonda se sintetizaron utilizando metodología de síntesis de oligonucleótidos estándar y se marcaron con el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (6-FAM) en el extremo 5' y con C6-NH-DABCYL en el extremo 3' utilizando química de acoplamiento con cianoetil fosoramidita, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.464.746 (incorporada en el presente documento por referencia). Las secuencias sonda de baliza molecular del VIH se utilizaron como se muestra a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8

Sonda	Secuencia (5'-3 ')	SEC. ID. NO.
A	gcgAGACAGCAGTACAAATGGCActcgc	41
B	cgggACAGCAGTACAAATGGCAfccc	42
C	atctcACAGCAGTACAAATGGCAGTgagat	43
D	ctccACAGCAGTACAAATGGCAGTggag	44
E	ccACAGCAGTACAAATGGCAGTgtggt	45
F	cgggACAGCAGTACAAATGGCAGTtccg	46
G	accgtACAGCAGTACAAATGGCAGTATTacgg	47
H	cggttACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCAaacgg	48
I	CACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCACACAATTTTAAgtctgt	49
J	cttactACAATTTTAAAAGAAAAGagtaag	50
K	cttactACAATTTTAAAAGAAAAGGagtaag	51
L	ctgactACAATTTTAAAAGAAAAGGagtcag	52
M	gtacACAATTTTAAAAGAAAAGGGtac	53
O	acggcAATTTTCGGGTTTATTACAGGGcgt	54
P	catcCTTTGGAAAGGACCAGCAgggatg	55

Sonda	Secuencia (5'-3')	SEC. ID. NO.
Q	caccCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGGggtg	56
R	tcgacAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTgtcga	57

En la Tabla 8 anterior, las letras en mayúscula representan secuencias específicas para el VIH, las letras en minúscula representan secuencias aleatorias utilizadas para generar el tronco de la sonda de baliza molecular, y las regiones enmarcadas son las secuencias que forman el tronco.

Las sondas A (SEC. ID. N°. 41), B (SEC. ID. N°. 42), C (SEC. ID. N°. 43), D (SEC. ID. N°. 44), E (SEC. ID. N°. 45), F (SEC. ID. N°. 46), G (SEC. ID. N°. 47) and H (SEC. ID. N°. 48) pueden utilizarse con los conjuntos de cebadores 31, 32, 33, 34 y 35; la sonda I (SEC. ID. N°. 49) puede utilizarse con los conjuntos de cebadores 31, 32, 34 y 35; las sondas J (SEC. ID. N°. 50), K (SEC. ID. N°. 51), L (SEC. ID. N°. 52), y M (SEC. ID. N°. 53) pueden utilizarse con los conjuntos de cebadores 31, 32, 34, 35, 40 y 41; la sonda O (SEC. ID. N°. 54) puede utilizarse con los conjuntos de cebadores 34, 35, 36 y 37; la sonda P (SEC. ID. N°. 55) puede utilizarse con los conjuntos de cebadores 34, 35, 36, 37, 38 y 39; y las sondas Q (SEC. ID. N°. 56) y R (SEC. ID. N°. 57) pueden utilizarse con los conjuntos de cebadores 35, 37 y 39.

Ejemplo 7

Sensibilidad de los conjuntos de cebadores con sondas de baliza molecular

El rendimiento de los conjuntos de cebadores, preparados tal y como se indica en el Ejemplo 5 y mostrados en la Tabla 7, se evaluó utilizando diluciones de una muestra de ARN del VIH (Abravaya, K, et al, J Clin Microbiol, 38: 716-723 (2000)) con sondas de baliza molecular seleccionadas, preparadas como en el Ejemplo 6 y mostradas en la Tabla 8. El ARN del VIH purificado se diluyó a 100.000 copias/ml, 10.000 copias/ml, 1.000 copias/ml, 100 copias/ml y 25 copias/ml, posteriormente se efectuó la transcripción inversa, se amplificó por PCR y se detectó en reacciones distintas utilizando diversas combinaciones de conjunto de cebador/sonda. También se incluyó un control negativo que no contenía ARN del VIH con cada combinación de conjunto de cebador/sonda. La RT-PCR se realizó en una mezcla de reacción de 100 µl que contenía 130 nM del cebador directo apropiado, 478 nM del cebador inverso apropiado, 81 nM de la sonda de baliza molecular del VIH apropiada, MnCl₂ 4,38 mM, 0,375 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 13 unidades de polimerasa recombinante de *Thermus thermophilus*, tampón de Bicina y una dilución de ARN del VIH o control negativo.

Se efectuó la transcripción inversa de las mezclas de reacción y se amplificaron en un termociclador Perkin-Elmer 9700. Las mezclas de reacción se incubaron primero a 59 °C durante 30 minutos para efectuar la transcripción inversa del ARN, seguido de 4 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Después, se realizó una amplificación adicional con de 36 a 40 ciclos a 90 °C durante 30 segundos, 59 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Después de someter las mezclas de reacción a termociclado, se realizó la hibridación con la sonda oligo elevando la temperatura de las mezclas a 94 °C durante 5 segundos y después disminuyendo la temperatura a 45 °C durante 15 segundos, seguido de 25 °C durante 10 segundos. Las muestras se mantuvieron a 25 °C hasta la detección de los productos de reacción. Los productos de reacción se detectaron utilizando un lector fluorescente, tal como Cytofluor (Perceptive; Framingham, MA) o BioTek 600 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia y se muestran en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Conjunto de cebadores/sonda	Concentración de ARN del VIH (copias/ml)					
	0	25	100	1.000	10.000	100.000
31 / A	2.103 *	9.351	11.477 *	34.600 *	61.587 *	80.751
32 / A	1.167 *	3.396	5.915 *	21.031 *	46.082 *	50.989
33 / A	1.914	2.716	2.904	3.427	6.588	21.149
34 / A	1.948	2.851	3.025	2.784	3.352	5.931
35 / A	1.418	2.045	2.007	2.223	2.121	2.709
36 / P	3.347	4.884	6.162	5.660	6.253	9.190
37 / P	6.309	6.592	7.470	7.815	8.378	8.491
38 / P	1.599	11.721	19.634	40.023	62.986	NE
39 / P	4.314	5.244	7.447	8.939	15.112	30.633
40 / M	4.078	2.177	2.272	3.668	6.131	20.734
41 / M	3.940	4.292	3.548	6.765	29.004	58.700
* Los resultados son la media de dos experimentos. NE: no ensayado.						

Los conjuntos de cebadores 31, 32 y 38 dieron los mejores resultados, detectando 25 copias/ml de VIH, fácilmente diferenciados del control negativo (0 copias/ml). Los conjuntos de cebadores 33, 39, 40 y 41 detectaron de 1.000 a 10.000 copias/ml de VIH. Aunque los conjuntos de cebadores 34, 35, 36 y 37 no rindieron tan bien, esto no se debió a la sonda utilizada ya que la sonda A o P mostraron buenos resultados cuando se utilizaron con otros conjuntos de cebadores.

Los conjuntos de cebadores 42, 43, 44 y 45 también se ensayaron como se indica anteriormente, pero sin la etapa de hibridación con la sonda. Los resultados se analizaron procesando geles con los productos de la RT-PCR. La banda esperada fue visible utilizando 10.000 copias/ml de VIH.

Ejemplo 8

Sensibilidad de las sondas de baliza molecular

El rendimiento de las sondas de baliza molecular de la A a la M, preparadas como en el Ejemplo 6 y mostradas en la Tabla 8, se evaluó ensayando diluciones de ARN del VIH como en el Ejemplo 7 anterior, con el conjunto de cebadores 32, preparado como en el Ejemplo 5. De manera similar, la sonda O se utilizó con el conjunto de cebadores 35 y las sondas P, Q y R se utilizaron con el conjunto de cebadores 39. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10

Sonda/conjunto de cebadores	Concentración de ARN del VIH (copias/ml)					
	0	25	100	1000	10.000	100.000
A / 32	3.677	8.576	12.146	34.960	NE	56.174
B / 32	1.903	3.410	5.104	11.774	25.845	41.580
C / 32	50.358	5.4011	55.097	60.032	65.914	74.810
D / 32	22.822	24.670	25.162	29.706	38.057	52.024
E / 32	3.873	11.193	15.319	42.271	NE	59.370
F / 32	6.041	6.447	6.372	7.348	8.272	10.759
G / 32	14.213	16.582	16.874	25.797	43.201	63.271
H / 32	5.795	11.068	15.553	41.118	NE	51.347
E / 32	6.300	12.259	16.921	40.591	NE	51.280
J / 32	8.816	10.858	11.357	17.149	25.053	31.438
K / 32	9.099	11.223	12.826	26.377	46.112	59.508
L / 32	40.578	44.234	45.760	46.854	48.856	53.210
M / 32	2.079	3.307	4.176	11.356	26.509	40.455
O / 35	3.502	4.561	5.728	5.433	5.322	6.840
P / 39	4.314	5.244	7.447	8.939	15.112	30.633
Q / 39	-178	-1.678	-2.353	-114	9.933	41.434
R / 39	8.295	8.975	10.129	10.811	26.606	53.356
NE: no ensayado.						

Las sondas A, B, E, H e I detectaron 25 copias/ml de VIH y distinguieron esta cantidad del control negativo (0 copias/ml). Las sondas J, K, M, P y R detectaron de 100 a 1.000 copias/ml de VIH. Las sondas F, O y Q fueron menos eficientes, y las sondas C, D, G y L dieron mayores valores de fondo con el control negativo. Las diferencias de rendimiento observadas con las sondas C, D, E y F fueron sorprendentes ya que tenían la misma secuencia de unión al VIH. Sin embargo, solamente diferían en la composición de las secuencias troncales. Las sondas J, K y L también fueron sorprendentes, ya que solamente diferían en una base en su secuencia de unión al VIH y tenían composiciones de secuencia trocal idénticas o muy similares. Las sondas J y K detectaron el VIH a aproximadamente 1.000 copias/ml mientras que la sonda L proporcionó mayores valores de fondo que la sonda J o K.

Ejemplo 9Sensibilidad de las sondas de Baliza Molecular con sustituciones indol o inosina

- 5 Las sondas A, B, E, H e I, se analizaron frente a 325 secuencias conocidas del VIH-1. Se identificaron los sitios más habituales con emparejamientos erróneos y las sondas se modificaron para contener una base universal en las posiciones con emparejamiento erróneo. Las posiciones con emparejamiento erróneo en las sondas se sustituyeron con nitro-indol o inosina, tal como se muestra en la Tabla 11. Estas sondas modificadas se sintetizaron como en el Ejemplo 6. Las secuencias de estas sondas modificadas se muestran a continuación en la Tabla 11.

10

Tabla 11

Sonda	Secuencia (5'-3')	SEC. ID. N°.
AI	<u>g</u> cgAGACAGCAGTACANATGGCA <u>ctcgc</u>	58
BI	<u>c</u> ggaACAGCAGTACANATGGCA <u>tccg</u>	59
EI	<u>cc</u> ACAAGCAGTACANATGGCAG <u>Tgtgg</u>	60
HI	<u>ccgttt</u> ACAGCAGTACANATGGCAGTATTCA <u>aaacgg</u>	61
Eino	<u>cc</u> ACAAGCAGTACAIATGGCAG <u>Tgtgg</u>	62
Hino	<u>ccgttt</u> ACAGCAGTACAIATGGCAGTATTCA <u>aaacgg</u>	63
Iino	<u>ccgttt</u> ACAGCAGTACAIATGGCAGTATTCA <u>aaacgg</u>	64
Iino2	<u>C</u> ACAGCAAGTACAIATGGCAGTATTCATCACAAATTTAA <u>tgctgtg</u>	65
N: Indol I: inosina		

- 15 El rendimiento de las sondas de baliza molecular sustituidas con indol o inosina se evaluó ensayando diluciones de ARN del VIH como en el Ejemplo 7 anterior, con el conjunto de cebadores 32, preparado como en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 12. Todas las sondas contenían sustituciones de indol o inosina detectaron 25 copias/ml de VIH y distinguieron esta cantidad del control negativo (0 copias/ml).

Tabla 12

Sonda	Concentración de ARN del VIH (copias/ml)					
	0	26	100	1.000	10.000	100.000
AI	669	1.381	2.650	7.561	19.305	32.949
BI	4.774	6.415	8.035	13.758	23.041	33.279
EI	3.943	7.162	8.696	20.493	38.823	56.091
HI	1.903	3.281	5.507	12.706	30.425	48.131
Eino	4.894	11.911	13.906	34.961	50.555	62.953
Hino	6.444	10.869	16.542	40.345	49.053	54.063
Iino	8.217	16.767	20.793	49.331	65.591	75.008
Iino2	8.169	14.273	20.896	52.639	72.729	78.684

20

Ejemplo 10Detección de diferentes subtipos de VIH con sondas de Baliza Molecular

- 25 Se obtuvieron diferentes subtipos de VIH y el ARN se aisló tal y como describen Abravaya, K, et al, en J Clin Microbial, 38: 716-723 (2000) y Johanson J, et al, en J Virol Methods, 95: 81-92 (2001). El ARN de VIH aislado de estos diferentes subtipos se diluyó a aproximadamente 1.000 copias/ml y se ensayó tal como se describe en el Ejemplo 7 por RT-PCR e hibridación de sonda oligo utilizando el conjunto de cebadores 32 con la sonda A, el conjunto de cebadores 32 con la sonda H o el conjunto de cebadores 38 con la sonda P (los conjuntos de cebadores descritos en el Ejemplo 7) y se expresaron en unidades de fluorescencia. Como puede observarse a continuación en la Tabla 13, todos los subtipos de VIH se detectaron con los tres conjuntos de cebador/sonda ensayados.
- 30

Tabla 13

Subtipo grupo	ID de la muestra	Conjunto de cebador 32 y sonda A	Conjunto de cebador 32 y sonda H	Conjunto de cebador 38 y sonda P
A	422	20.501	41.503	32.465
	327	7.308	20.296	36.468
	312	24.360	49.007	26.481
	419	29.44	51.112	34.378
B	t1600	27.660	49.467	20.334
	t1273	25.396	48.658	41.079
	t50788	19.239	38.155	27.698
D	306	NE	20.437	15.807
	308	6.171	34.772	22.959
	418	14.863	44.930	29.918
CRF01_AE	155	14.460	51.900	47.237
	577	11.429	52.058	44.851
	1102	14.933	48.197	48.147
	50436	16.213	47.370	46.162
F	Br97	24.661	43.367	32.467
	Br112	23.503	43.043	25.331
	BR58	26.642	42.463	27.637
	BR41	17.728	47.758	35.496
	BR57	11.335	56.803	30.719
G *	3671	30.315	56.658	47.201
O	11897755A (08692A)	29.736	57.056	46.569
Control negativo		951	2.189	1.068
Control Positivo	Transcrito de ARN de subtipo B	18.253	35.279	40.421

NE: No ensayado
 * Este aislado es un recombinante intersubtipo entre los subtipos A y G. La región de la integrasa *pol* es subtipo G.

Se generaron transcritos de ARN a partir de clones de los subtipos A, C, D, CRF01_AE y F del VIH, tal como describen Abravaya, K, et al, en J Clin Microbiol, 38: 716-723 (2000) y Johanson J, et al, en J Virol Methods, 95: 81-92 (2001). Los transcritos se diluyeron a aproximadamente 10.000 copias/ml, se amplificaron y se detectaron tal y como se describe en el Ejemplo 8 utilizando el conjunto de cebadores 32 con la sonda A o con la sonda H. Los resultados de la Tabla 14 muestran que todos los subtipos del VIH ensayados se detectaron con los dos conjuntos de sonda/cebador utilizados.

Tabla 14

Subtipo	Conjunto de cebador 32 y sonda A	Conjunto de cebador 32 y sonda H
A	12.626	62.852
C	44.322	65.210
D	51.682	79.109
CRF01_AE	42.098	74.776
F	35.517	73.741
Control negativo	1.386	3.213
Control positivo (B)	52.259	53.336

Ejemplo 11

Quantificación de diferentes subtipos de VIH con sondas de Baliza Molecular

El ARN aislado de los diferentes subtipos de VIH descritos en el Ejemplo 10, se diluyó a aproximadamente 1.000 (o 3 log) copias/ml y se ensayó tal y como se describe en el Ejemplo 7 utilizando el conjunto de cebadores 32 con la sonda A o el conjunto de cebadores 32 con la sonda H. Para obtener resultados cuantitativos, la mezcla de reacción de la RT-PCR también contenía 0,1 μ M de una sonda de baliza molecular (SEC. ID. N°. 66: específica para una secuencia de transcripción de Control Interno, y 500 copias/reacción del transcrito de Control Interno (SEC. ID. N°. 67). El transcrito de CI tiene los mismos sitios de unión a cebador que el VIH y una región de unión a sonda CI específica. La sonda CI se sintetiza como en el Ejemplo 6 pero en el extremo 5' se marca con un fluoróforo diferente,

sulforodamina 101 (Rojo Texas), utilizando después de modo sintético una sonda derivada de C6-NH en el extremo 5' conjugada con sulforodamina 101 derivatizada de cloruro de sulfonilo. En este formato competitivo, la señal de la sonda de VIH aumenta mientras que la señal de la sonda CI disminuye a medida que la concentración del VIH diana aumenta. Se generó una curva de calibración dividiendo el log de la señal de la sonda de VIH entre el log de la señal de la sonda CI, y después se cuantificaron las muestras de VIH utilizando esta curva de calibración.

Los resultados de la cuantificación de los aislados de ARN procedentes de los diferentes subtipos de VIH por este método se muestran en la Tabla 15, con valores expresados como log copias/ml. Con la excepción del aislado 327 del subtipo A, todos los aislados ensayados se cuantificaron a aproximadamente 3 log copias/ml. Este aislado también se ensayó con el conjunto de cebadores 31, que es idéntico al conjunto de cebadores 32 excepto que el cebador inverso es 3 bases más largo (véase la Tabla 7; dos nucleótidos adicionales en el extremo 5' y un nucleótido adicional en el extremo 3'), la señal fue dos veces mayor (no se muestran los datos).

Tabla 15

Subtipo/Grupo	ID de la muestra	Conjunto de cebadores 32 y Sonda A	Conjunto de cebadores 32 y Sonda H
A	422	3,59	3,66
	327	1,72	1,98
	312	3,50	3,55
	419	3,38	3,43
B	t1600	3,48	3,46
	t1273	3,11	3,15
	t50788	3,18	3,26
D	306	2,96	2,87
	308	3,31	3,26
	418	3,41	3,38
CRF01_AE	155	3,18	3,23
	577	3,47	3,52
	1102	3,44	3,48
	50436	3,38	3,44
F	Br97	3,48	3,48
	Br112	3,41	3,42
	BR58	3,33	3,40
	BR41	3,46	3,44
	BR57	3,65	3,61
G *	3671	3,52	3,59
O	11897755 A (08692A)	3,69	3,81
* Este aislado es un recombinante intersubtipo entre los subtipos A y G. La región de la integrasa <i>pol</i> es subtipo G.			

De manera similar, los transcritos de ARN generados a partir de clones de los aislados de VIH-1 que representan los subtipos A, C, D, CRF01_AE y F, tal como se describe en el Ejemplo 10, se diluyeron a aproximadamente 10.000 copias/ml, y se cuantificaron tal como se describe anteriormente en el Ejemplo 11 utilizando el conjunto de cebadores 32 con la sonda A o con la sonda H. Los resultados de la Tabla 16 muestran que prácticamente todos los transcritos de VIH (véase Abravaya, K, et al, J Clin Microbiol, 38: 716-723 (2000)) se cuantificaron a 4 log copias/ml.

Tabla 16

Subtipo	Conjunto de cebadores 32 y Sonda A	Conjunto de cebadores 32 y Sonda H
A	3,02	3,99
C	4,10	3,92
D	4,31	4,15
CRF01_AE	4,12	4,04
F	4,06	4,02

Otros aspectos de la divulgación son los siguientes:

Aspecto A: Un conjunto de cebadores seleccionados del grupo que consiste en: conjunto de cebadores 1 (SEC. ID. N° 1 y SEC. ID. N° 2); conjunto de cebadores 2 (SEC. ID. N° 3 y SEC. ID. N° 2); conjunto de cebadores 3 (SEC. ID. N° 4 y SEC. ID. N° 2); conjunto de cebadores 4 (SEC. ID. N° 5 y SEC. ID. N° 2); conjunto de cebadores 5 (SEC. ID. N° 6 y SEC. ID. N° 2); conjunto de cebadores 6 (SEC. ID. N° 7 y SEC. ID. N° 2); conjunto de cebadores 7 (SEC. ID. N° 8 y SEC. ID. N° 2); conjunto de cebadores 8 (SEC. ID. N° 9 and SEC. ID.

Nº. 10); conjunto de cebadores 9 (SEC. ID. Nº. 9 y SEC. ID. Nº. 11); conjunto de cebadores 10 (SEC. ID. Nº. 1 y SEC. ID. Nº. 12); conjunto de cebadores 11 (SEC. ID. Nº. 13 y SEC. ID. Nº. 14); conjunto de cebadores 12 (SEC. ID. Nº. 13 y SEC. ID. Nº. 15); conjunto de cebadores 13 (SEC. ID. Nº. 13 y SEC. ID. Nº. 2); conjunto de cebadores 14 (SEC. ID. Nº. 9 y SEC. ID. Nº. 12); conjunto de cebadores 15 (SEC. ID. Nº. 1 y SEC. ID. Nº. 11); conjunto de cebadores 16 (SEC. ID. Nº. 16 y SEC. ID. Nº. 12); conjunto de cebadores 17 (SEC. ID. Nº. 16 y SEC. ID. Nº. 17); conjunto de cebadores 18 (SEC. ID. Nº. 3 y SEC. ID. Nº. 12); conjunto de cebadores 19 (SEC. ID. Nº. 3 y SEC. ID. Nº. 18); conjunto de cebadores 20 (SEC. ID. Nº. 19 y SEC. ID. Nº. 18); conjunto de cebadores 21 (SEC. ID. Nº. 13 y SEC. ID. Nº. 17); conjunto de cebadores 22 (SEC. ID. Nº. 13 y SEC. ID. Nº. 20); conjunto de cebadores 23 (SEC. ID. Nº. 21 y SEC. ID. Nº. 18); conjunto de cebadores 24 (SEC. ID. Nº. 21 y SEC. ID. Nº. 14); conjunto de cebadores 25 (SEC. ID. Nº. 21 y SEC. ID. Nº. 20); conjunto de cebadores 26 (SEC. ID. Nº. 4 y SEC. ID. Nº. 20); conjunto de cebadores 27 (SEC. ID. Nº. 5 y SEC. ID. Nº. 15); conjunto de cebadores 28 (SEC. ID. Nº. 21 y SEC. ID. Nº. 22); conjunto de cebadores 29 (SEC. ID. Nº. 21 y SEC. ID. Nº. 23); conjunto de cebadores 30 (SEC. ID. Nº. 5 y SEC. ID. Nº. 23); conjunto de cebadores 31 (SEC. ID. Nº. 28 y SEC. ID. Nº. 29); conjunto de cebadores 32 (SEC. ID. Nº. 28 y SEC. ID. Nº. 30); conjunto de cebadores 33 (SEC. ID. Nº. 28 y SEC. ID. Nº. 31); conjunto de cebadores 38 (SEC. ID. Nº. 37 y SEC. ID. Nº. 32); conjunto de cebadores 39 (SEC. ID. Nº. 37 y SEC. ID. Nº. 33); conjunto de cebadores 40 (SEC. ID. Nº. 38 y SEC. ID. Nº. 29); conjunto de cebadores 41 (SEC. ID. Nº. 38 y SEC. ID. Nº. 30); conjunto de cebadores 42 (SEC. ID. Nº. 4 y SEC. ID. Nº. 22); conjunto de cebadores 43 (SEC. ID. Nº. 4 y SEC. ID. Nº. 40); conjunto de cebadores 44 (SEC. ID. Nº. 34 y SEC. ID. Nº. 22); conjunto de cebadores 45 (SEC. ID. Nº. 34 y SEC. ID. Nº. 40); conjunto de cebadores 46 (SEC. ID. Nº. 24 y SEC. ID. Nº. 25); y conjunto de cebadores 47 (SEC. ID. Nº. 26 y SEC. ID. Nº. 27).

Aspecto B:

Un conjunto de oligonucleótidos para comprender un conjunto de cebadores y sonda de detección en que el conjunto de oligonucleótidos se selecciona del grupo que consiste en: conjunto oligo 1 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 41); conjunto oligo 2 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 42); conjunto oligo 3 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 43); conjunto oligo 4 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 44); conjunto oligo 5 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 45); conjunto oligo 7 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 47); conjunto oligo 8 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 48); conjunto oligo 9 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 49); conjunto oligo 10 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 50); conjunto oligo 11 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 51); conjunto oligo 12 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 52); conjunto oligo 13 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 53); conjunto oligo 14 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 41); conjunto oligo 15 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 42); conjunto oligo 16 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 43); conjunto oligo 17 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 44); conjunto oligo 18 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 45); conjunto oligo 20 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 47); conjunto oligo 21 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 48); conjunto oligo 22 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 49); conjunto oligo 23 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 50); conjunto oligo 24 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 51); conjunto oligo 25 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 52); conjunto oligo 26 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 53); conjunto oligo 27 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 41); conjunto oligo 28 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 42); conjunto oligo 29 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 43); conjunto oligo 30 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 44); conjunto oligo 31 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 45); conjunto oligo 33 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 47); conjunto oligo 34 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 31, y SEC. ID. N° 48); conjunto oligo 35 (SEC. ID. N° 37, SEC. ID. N° 32, y SEC. ID. N° 55); conjunto oligo 36 (SEC. ID. N° 37, SEC. ID. N° 33, y SEC. ID. N° 55); conjunto oligo 38 (SEC. ID. N° 37, SEC. ID. N° 33, y SEC. ID. N° 57); conjunto oligo 39 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 50); conjunto oligo 40 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 51); conjunto oligo 41 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 52); conjunto oligo 42 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 29, y SEC. ID. N° 53); conjunto oligo 43 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 50); conjunto oligo 44 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 51); conjunto oligo 45 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 52); conjunto oligo 46 (SEC. ID. N° 38, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 53); conjunto oligo 47 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 58); conjunto oligo 48 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 59); conjunto oligo 49 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 60); conjunto oligo 50 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 61); conjunto oligo 51 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 62); conjunto oligo 52 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 63); conjunto oligo 53 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 64); y conjunto oligo 54 (SEC. ID. N° 28, SEC. ID. N° 30, y SEC. ID. N° 65).

Aspecto C:

Una sonda seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N° 41; SEC. ID. N° 42; SEC. ID. N° 43; SEC. ID. N° 44; SEC. ID. N° 45; SEC. ID. N° 47; SEC. ID. N° 48; SEC. ID. N° 49; SEC. ID. N° 50; SEC. ID. N° 51; SEC. ID. N° 52; SEC. ID. N° 53; SEC. ID. N° 55; SEC. ID. N° 57; SEC. ID. N° 58; SEC. ID. N° 59; SEC. ID. N° 60; SEC. ID. N° 61; SEC. ID. N° 62; SEC. ID. N° 63; SEC. ID. N° 64; y SEC. ID. N° 65.

Aspecto D:

Un método para amplificar una secuencia diana del VIH-1 que comprende las etapas de:

- 5 a) poner en contacto una muestra de ensayo con reactivos de amplificación y un conjunto de cebadores de la realización A para formar 4 mezclas de reacción; y
- b) poner la mezcla de reacción en condiciones de amplificación para amplificar la secuencia diana del VIH-1.

Aspecto E:

- 10 El método de la realización D que además comprende la etapa de detectar la secuencia diana del VIH-1 amplificada.

Aspecto F:

- 15 Un método para detectar la presencia del VIH-1 en una muestra de ensayo que comprende:
 - a) poner en contacto una muestra de ensayo con reactivos de amplificación y un conjunto de oligonucleótidos de la realización B para formar una mezcla de reacción;
 - 20 b) poner la reacción en condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación;
 - c) formar un híbrido entre producto de amplificación/sonda; y
 - d) detectar el híbrido como una indicación de la presencia de VIH-1 en la muestra de ensayo.

Aspecto G:

- 25 El método de la realización F en el que el híbrido entre producto de amplificación/sonda se forma mientras que la mezcla de reacción está en condiciones de amplificación.

Aspecto H:

- 30 Un kit para amplificar VIH-1 que comprende:
 - (a) un conjunto de cebadores de la realización A; y
 - 35 (b) reactivos de amplificación.

Aspecto I:

- Un kit para detectar VIH-1 que comprende:
 - 40 (a) un conjunto de oligonucleótidos de la realización B; y
 - (b) reactivos de amplificación.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> Abbott Laboratories Harris, Barbara J. Hackett, John R. Swanson, Priscilla A. Abravaya, Klara Devare, sushil Esping, Claudia A. Gorzowski, Jacek J. Tang, Ning
- <120> Reactivos amplificar y detectar el VIH-1
- 50 <130> 6836.WO.01
- <140> PCT/USO2/22230
- <141> 12-07-2002
- 55 <150> US 09/945.943
- <151> 04-09-2001
- <160> 67
- 60 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> ADN
- 65 <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 1 ccaggaatat ggcaattaga ttg	23
10	<210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 2 cctgccatct gtttccata	20
20	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<400> 3 gcagtccatg tagccagtgg	20
	<210> 4 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
40	<400> 4 cacaatttta aaagaaaagg ggggattgg	29
45	<210> 5 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
50	<400> 5 tagacataat agcaacagac atacaaac	28
55	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
60	<400> 6 tattacaggg acagcagaga	20
65	<210> 7 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Cebador

 <400> 7
 5 gacagcagag acccaatttg gaaaggacc 29

 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 8
 15 tggaaagggtg aaggggcagt agt 23

 <210> 9
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 9
 25 aattggagag caatggctag tga 23

 <210> 10
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 10
 35 ccttctaaat gtgtacaatc 20

 <210> 11
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 11
 45 tctgctggga taacttctgc ttcta 25

 <210> 12
 <211> 32
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 12
 55 ttattcatag attctactac tccttgactt tg 32

 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 65

	<220>		
	<223> Cebador		
5	<400> 13 aaggcagcct gttggtgg	18	
	<210> 14		
	<211> 28		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
15	<400> 14 gtttgtatgt ctgttgctat tatgtcta	28	
	<210> 15		
	<211> 23		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
25	<400> 15 actactgccc cttcaccttt cca	23	
	<210> 16		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Cebador		
	<400> 16 gattgtacac atttagaagg	20	
40	<210> 17		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 17 aatactgcca ttgtactgc tgt	23	
50	<210> 18		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 18 cccccaatcc ccccttttct tttaaaattg tg	32	
60	<210> 19		
	<211> 33		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 19
 aagatggcca gtaaaagtaa tacacacaga caa 33

10 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 20
 accgaaaat ttggaattt t 21

 <210> 21
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador

30 <400> 21
 caaagtcaag gagtagtaga atctatgaat aa 32

 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

40 <400> 22
 tctctgctgt ccctgtaata 20

 <210> 23
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

50 <400> 23
 ggtcctttcc aaattgggtc tctgctgtc 29

55 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador poll8

60 <400> 24
 tagtgggatg tgtactctg aac 23

65 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Cebador poll5		
5	<400> 25 cacacaaagg rattggagga aatg	24	
	<210> 26		
	<211> 22		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador O-poll8		
15	<400> 26 gatttctgga ttcataatga tg	22	
	<210> 27		
	<211> 21		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador O-pol15		
25	<400> 27 gtatcttaca tgggttcctg c	21	
	<210> 28		
30	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Cebador		
	<400> 28 attccctaca atccccaag tcaaggagt	29	
40	<210> 29		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 29 cccctgcact gtacccccca atccc	25	
50	<210> 30		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 30 cctgcactgt acccccaat cc	22	
60	<210> 31		
	<211> 29		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Cebador		
5	<400> 31 ccaatcccc ctttctttt aaaattgtc	29	
	<210> 32 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Cebador		
15	<400> 32 tgtattacta ctgccccttc acctttcca	29	
	<210> 33 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Cebador		
25	<400> 33 atcatcacct gccatctgtt ttccata	27	
	<210> 34 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Cebador		
35	<400> 34 cacaatttta aaagaaaagg ggggattg	28	
40	<210> 35 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Cebador		
50	<400> 35 tgtattacta ctgccccttc acctttcc	28	
	<210> 36 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Cebador		
60	<400> 36 cacaatttta aaagaaaagg ggggattgg	29	
	<210> 37 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
65			

	<220>		
	<223> Cebador		
5	<400> 37 tttcgggttt attacaggga cagcaga	27	
	<210> 38		
	<211> 26		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
15	<400> 38 cttaagacag cagtacaaat ggcagt	26	
	<210> 39		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
25	<400> 39 tctctgctgt ccctgtaata	20	
	<210> 40		
30	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Cebador		
	<400> 40 tctctgctgt ccctgtaata aacc	24	
40	<210> 41		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Sonda A		
	<400> 41 gcgagacagc agtacaaatg gcactcgc	28	
50	<210> 42		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Sonda B		
	<400> 42 cggaacagca gtacaaatg catccg	26	
60	<210> 43		
	<211> 30		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Sonda C		
5	<400> 43 atctcacagc agtacaaatg gcagtgagat	30	
	<210> 44 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Sonda D		
15	<400> 44 ctccacagca gtacaaatgg cagtggag	28	
	<210> 45 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Sonda E		
25	<400> 45 ccacagcagt acaaatggca gtgtgg	26	
	<210> 46 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Sonda F		
35	<400> 46 cggaacagca gtacaaatgg cagttccg	28	
	<210> 47 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Sonda G		
45	<400> 47 accgtacagc agtacaaatg gcagtattac ggt	33	
50	<210> 48 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Sonda H		
60	<400> 48 ccgtttacag cagtacaaat ggcagtattc aaaacgg	37	
	<210> 49 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
65			

<220>
 <223> Sonda I

 <400> 49
 5 cacagcagta caaatggcag tattcatcca caattttaat gctgtg 46

 <210> 50
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda J

 <400> 50
 15 ctactcaca attttaaaag aaaagagtaa g 31

 <210> 51
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda K
 25
 <400> 51
 ctactcaca attttaaaag aaaaggagta ag 32

 <210> 52
 30 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda L
 35
 <400> 52
 ctgactcaca attttaaaag aaaaggaggt cag 33

 <210> 53
 40 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda M
 45
 <400> 53
 50 gtaccacaat tttaaaagaa aagggtac 28

 <210> 54
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Sonda O

 <400> 54
 60 acgcctaatt ttcgggttta ttacagggcg t 31

 <210> 55
 <211> 27
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Sonda P		
5	<400> 55 catcctttgg aaaggaccag caggatg	27	
	<210> 56 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Sonda Q		
15	<400> 56 cacctctgga aaaggtgaag gggcagtagg gtg	33	
	<210> 57 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Sonda R		
25	<400> 57 tcgacaaagg tgaaggggca gtagtgcga	30	
30	<210> 58 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Sonda A1		
	<221> misc_feature <222> (17)...(17) <223> N = Indol en la posición	17	
40	<400> 58 gcgagacagc agtacanatg gcactcgc	28	
45	<210> 59 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Sonda B1		
	<221> misc_feature <222> (16)...(16) <223> N = Indol en la posición	16	
55	<400> 59 cggaacagca gtacanatgg catccg	26	
60	<210> 60 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
65	<220> <223> Sonda E1		

	<221> misc_feature		
	<222> (14)...(14)		
	<223> N = Indol en la posición	14	
5	<400> 60		
	ccacagcagt acanatggca gtgtgg	26	
	<210> 61		
	<211> 37		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda H1		
15	<221> misc_feature		
	<222> (18)...(18)		
	<223> N = Indol en la posición	18	
20	<400> 61		
	ccgtttacag cagtacanat ggcagtattc aaaacgg	37	
	<210> 62		
	<211> 26		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda Eino		
30	<221> misc_feature		
	<222> (14)...(14)		
	<223> N = Inosina en la posición	14	
35	<400> 62		
	ccacagcagt acanatggca gtgtgg	26	
	<210> 63		
	<211> 37		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda Hino		
45	<221> misc_feature		
	<222> (17)...(17)		
	<223> N = Inosina en la posición	17	
50	<400> 63		
	ccgtttacag cagtacanat ggcagtattc aaaacgg	37	
	<210> 64		
	<211> 46		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda lino		
60	<221> misc_feature		
	<222> (28)...(28)		
	<223> N = Inosina en la posición	28	
65	<400> 64		
	cacagcagta caaatggcag tattcatnca caattttaat gctgtg	46	

5 <210> 65
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda lino2

 10 <221> misc_feature
 <222> (13)...(13)
 <223> N = Inosina en la posición 13

 15 <221> misc_feature
 <222> (28)...(28)
 <223> N = Inosina en la posición 28

 <400> 65
 cacagcagta canatggcag tattcatnca caattttaat gctgtg 46

 20 <210> 66
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Sonda de Baliza Molecular

 30 <400> 66
 gcgagacgag ttcattgagg cagctcgc 28

 35 <210> 67
 <211> 189
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia Diana

 40 <400> 67

 attccctaca atccccaaag tcaaggagta gtagaatcta tgaataaaga attaaagaaa 60
 attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaagt tgcagctgca agaaggatcg 120
 ttgaagctga cgagttcatg agggcaggcc gctatgatga aggggggatt ggggggtaca 180
 gtgcagggg 189

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia del VIH-1 en una muestra de ensayo que comprende:
 - 5 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con reactivos de amplificación y un conjunto de cebadores que consiste en la SEC. ID. N°. 37 y SEC. ID. N°. 32 para formar una mezcla de reacción;
 - (b) poner la mezcla de reacción en condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación; (c) formar un híbrido entre el producto de amplificación y una sonda que consiste en la SEC. ID. N°. 55; y
 - 10 (d) detectar el híbrido como una indicación de la presencia de VIH-1 en la muestra de ensayo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el híbrido se forma y se detecta mientras que la mezcla de reacción está en condiciones de amplificación.
3. Una combinación de sonda y conjunto de cebadores del VIH-1, en la que la sonda consiste en la SEC. ID. N°. 55 y
15 el conjunto de cebadores consiste en la SEC. ID. N°. 37 y SEC. ID. N°. 32.

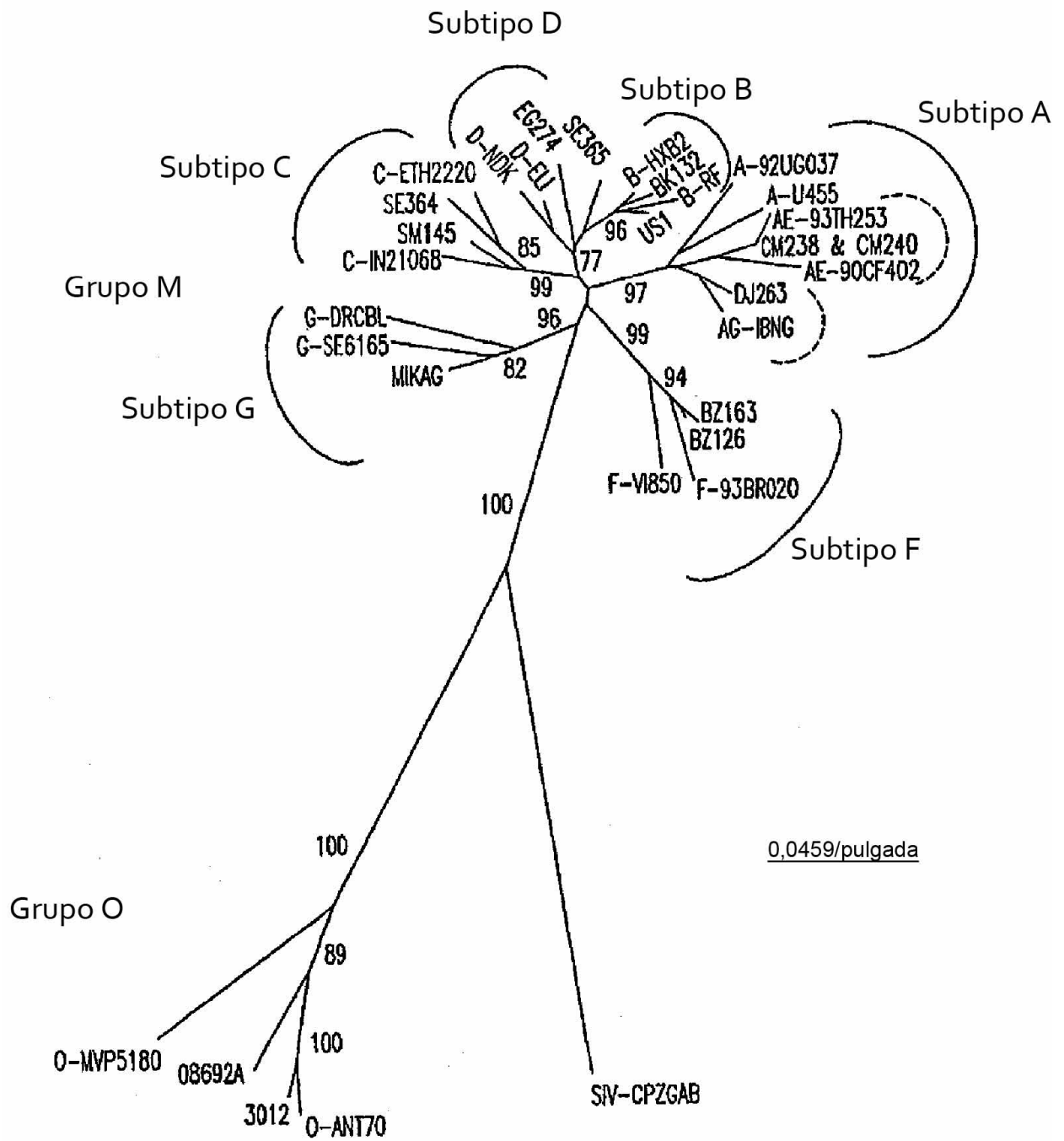


FIG. 1

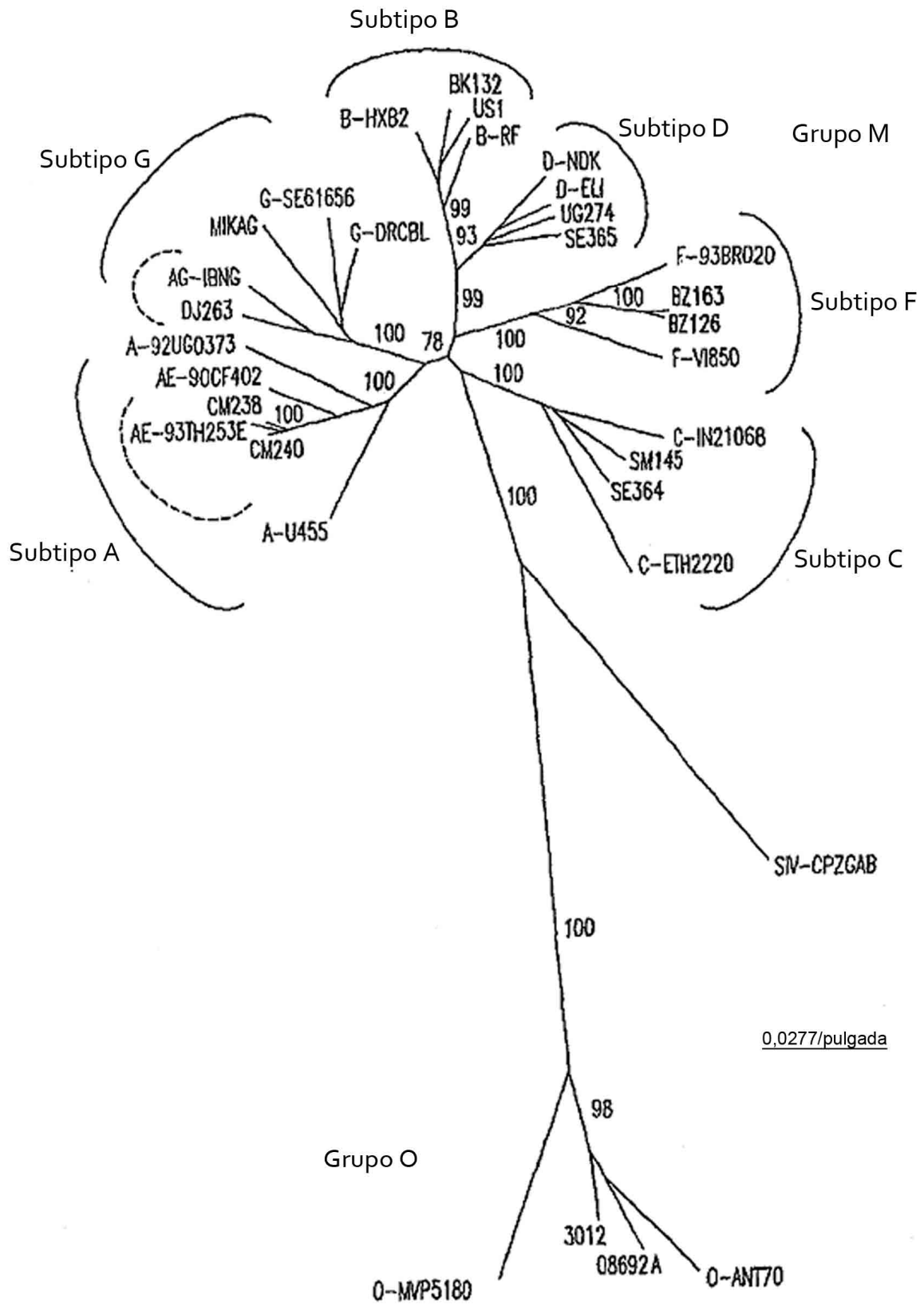


FIG. 2

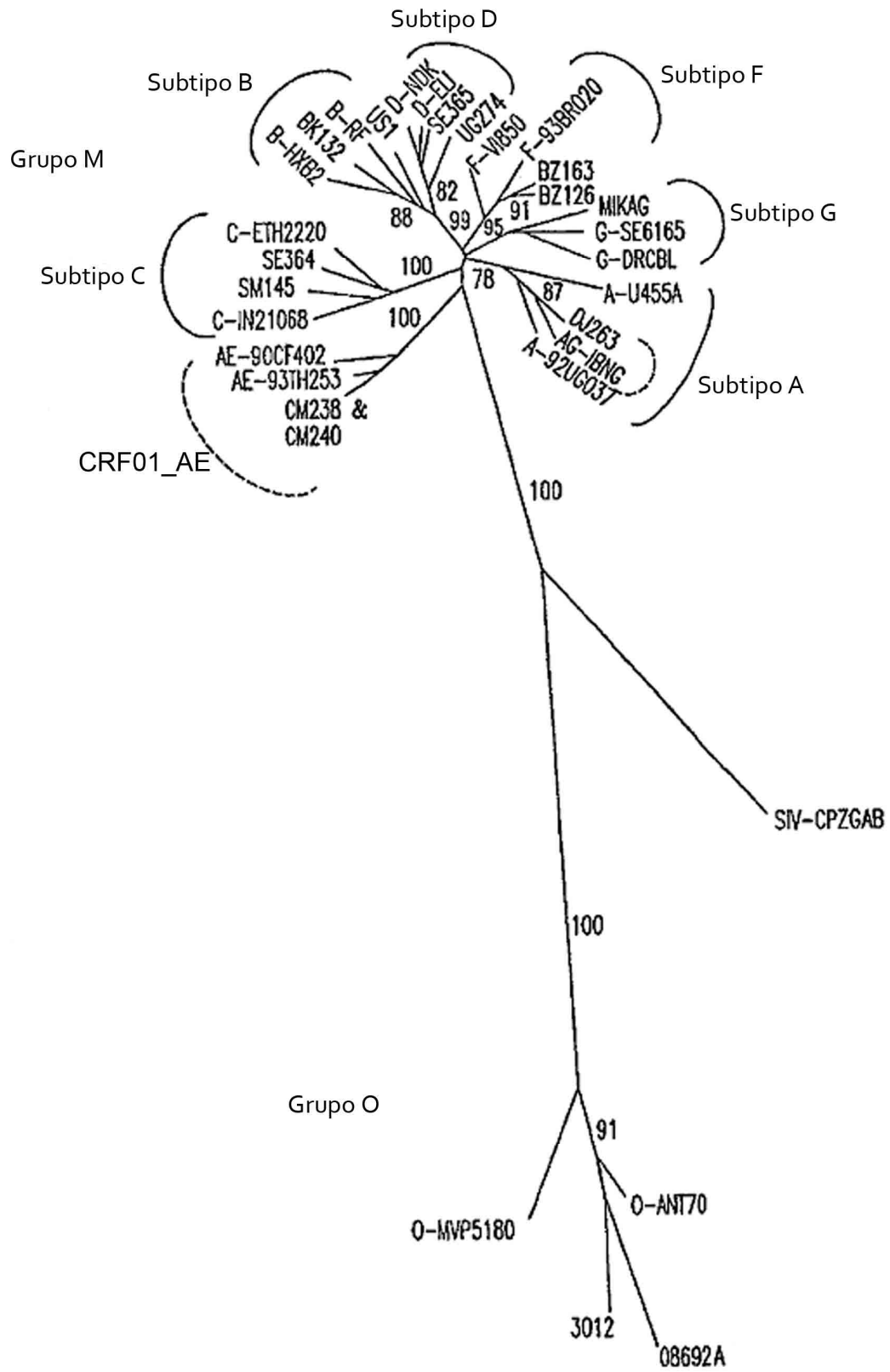


FIG. 3

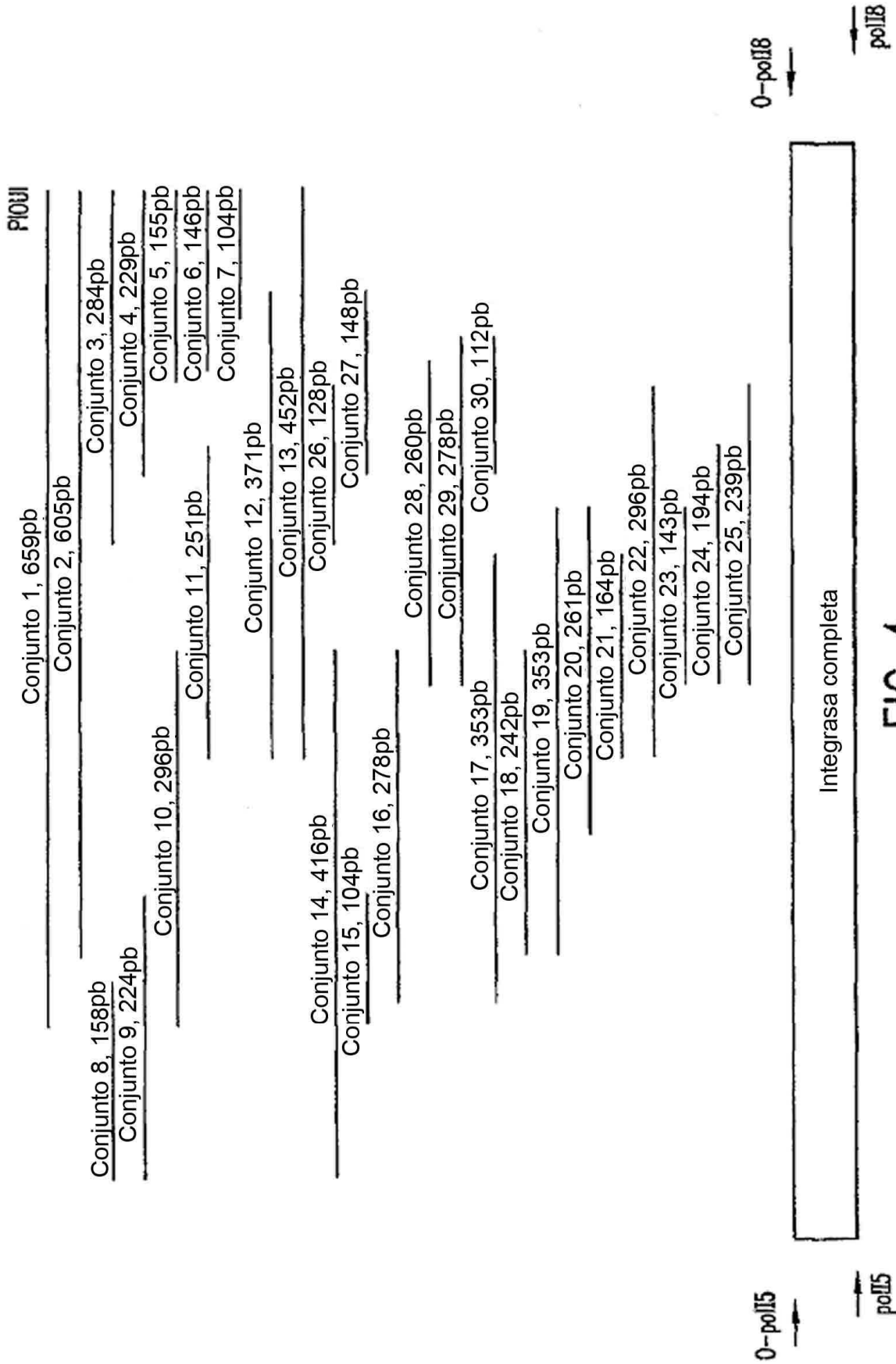


FIG. 4

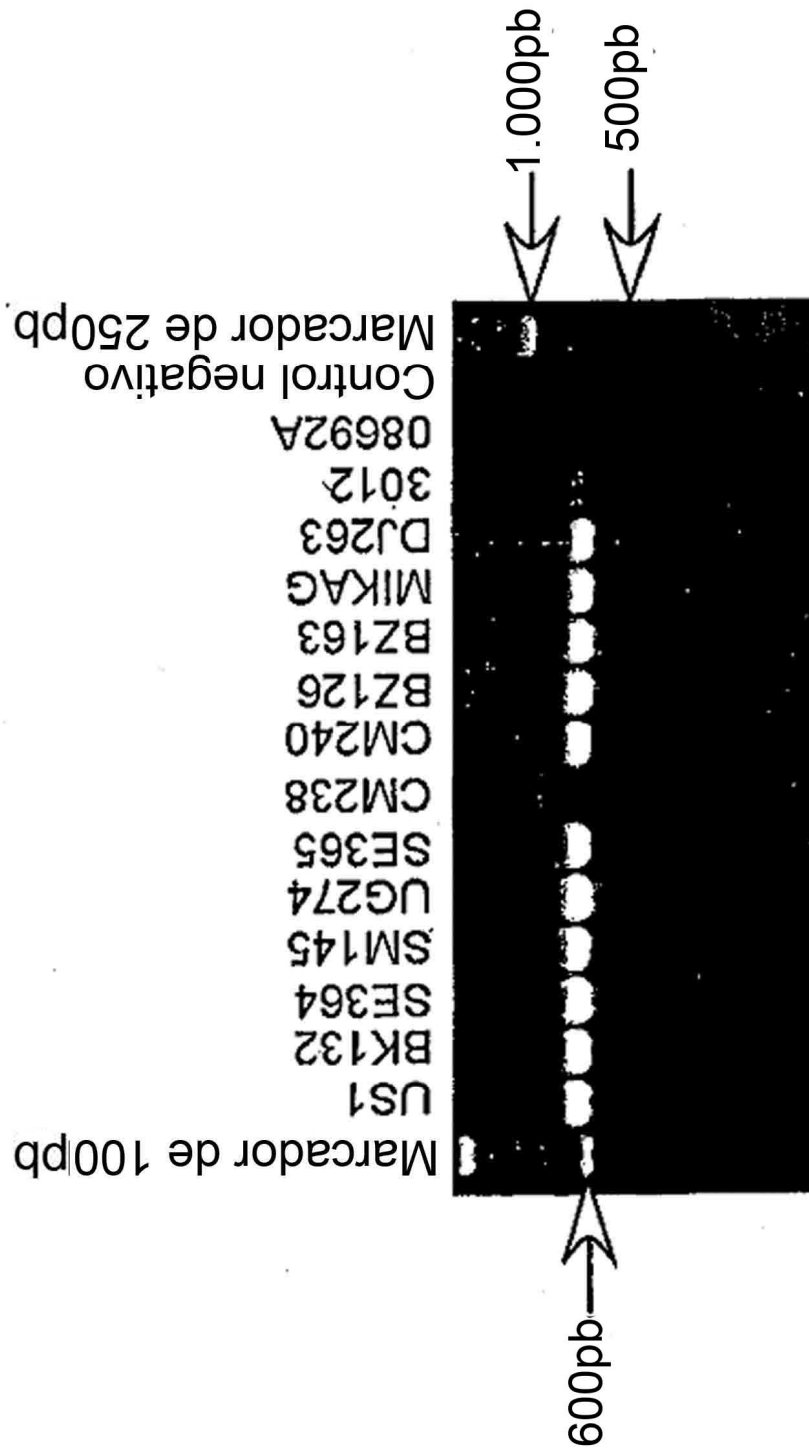


FIG.5A

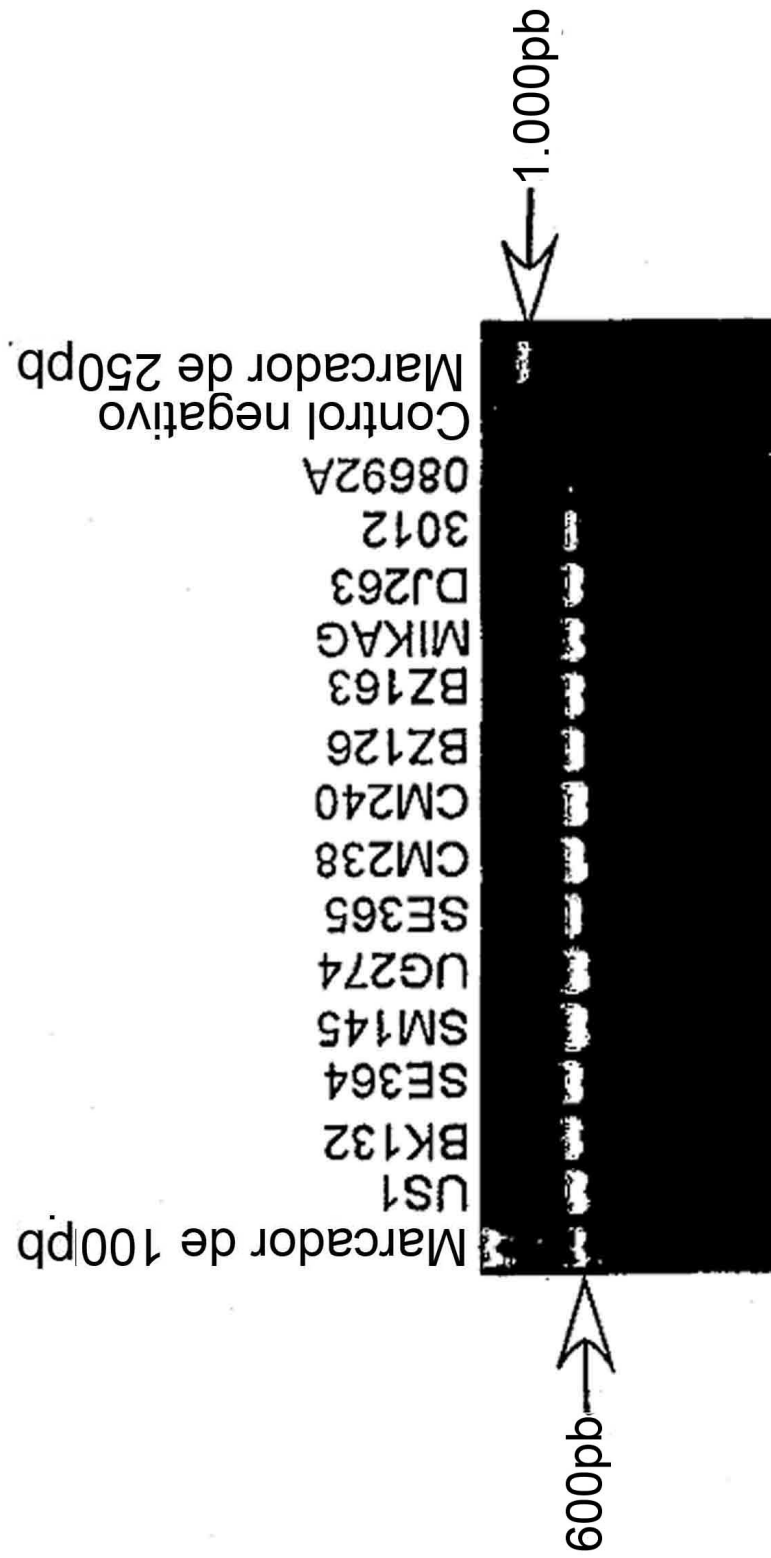


FIG.5B

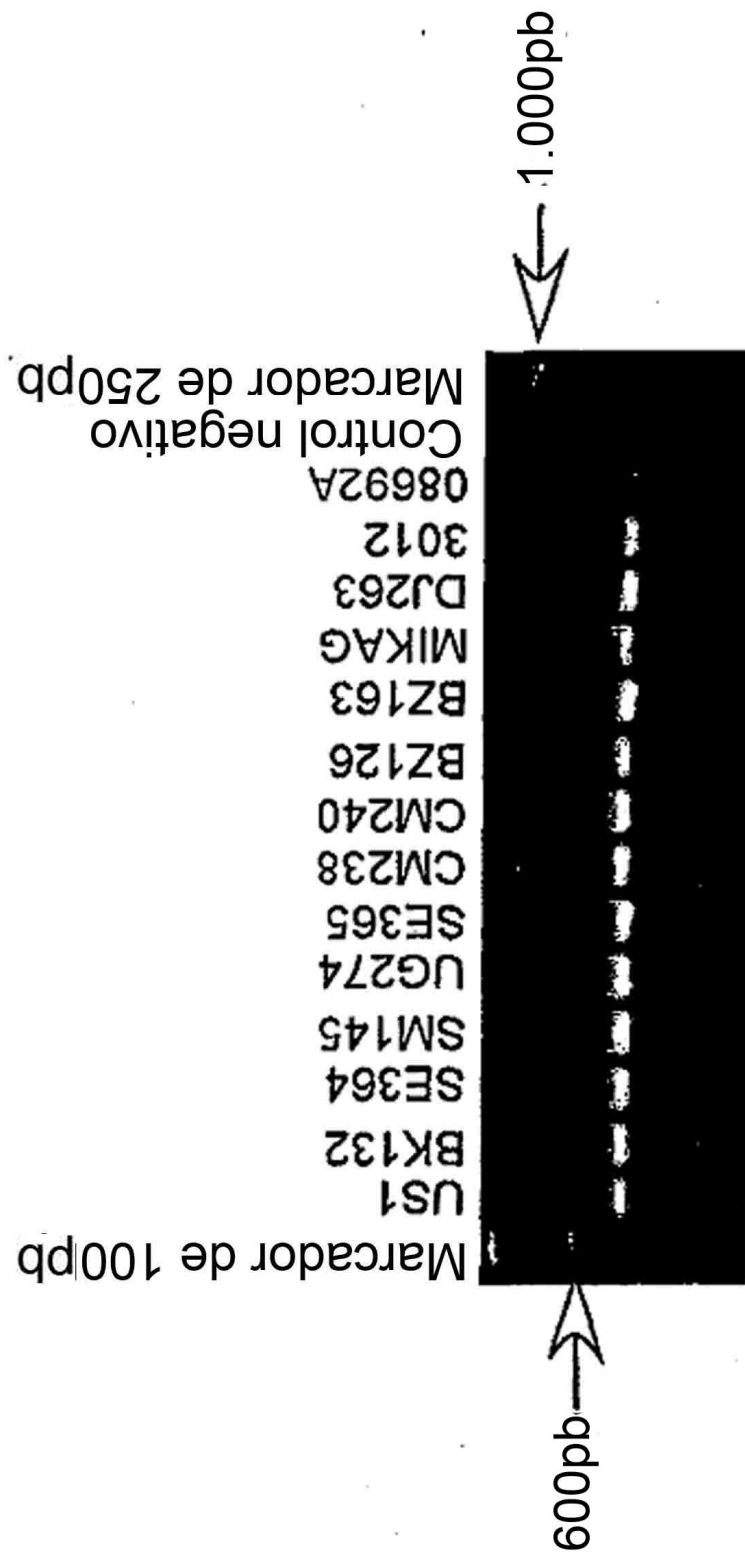
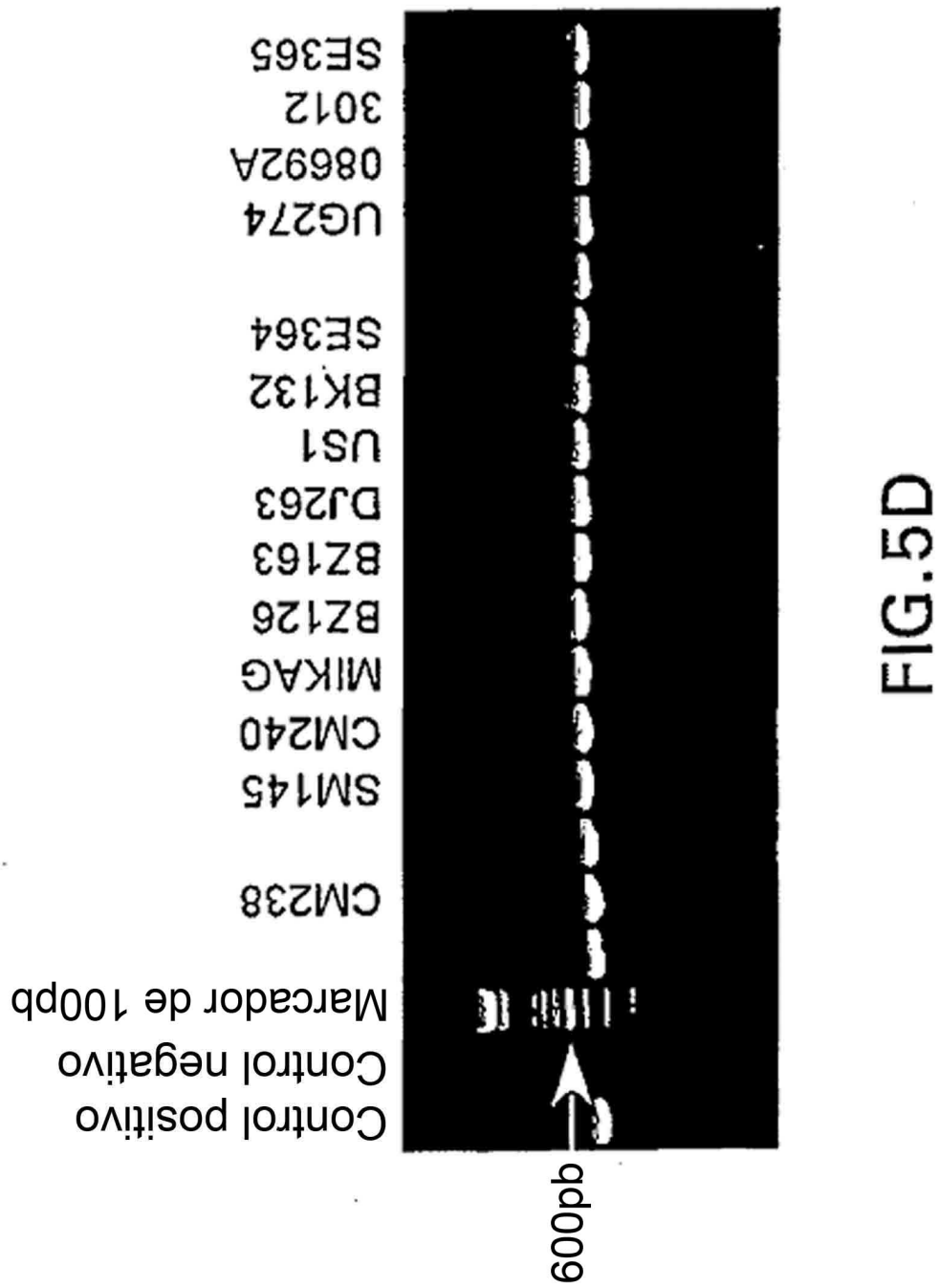


FIG.5C



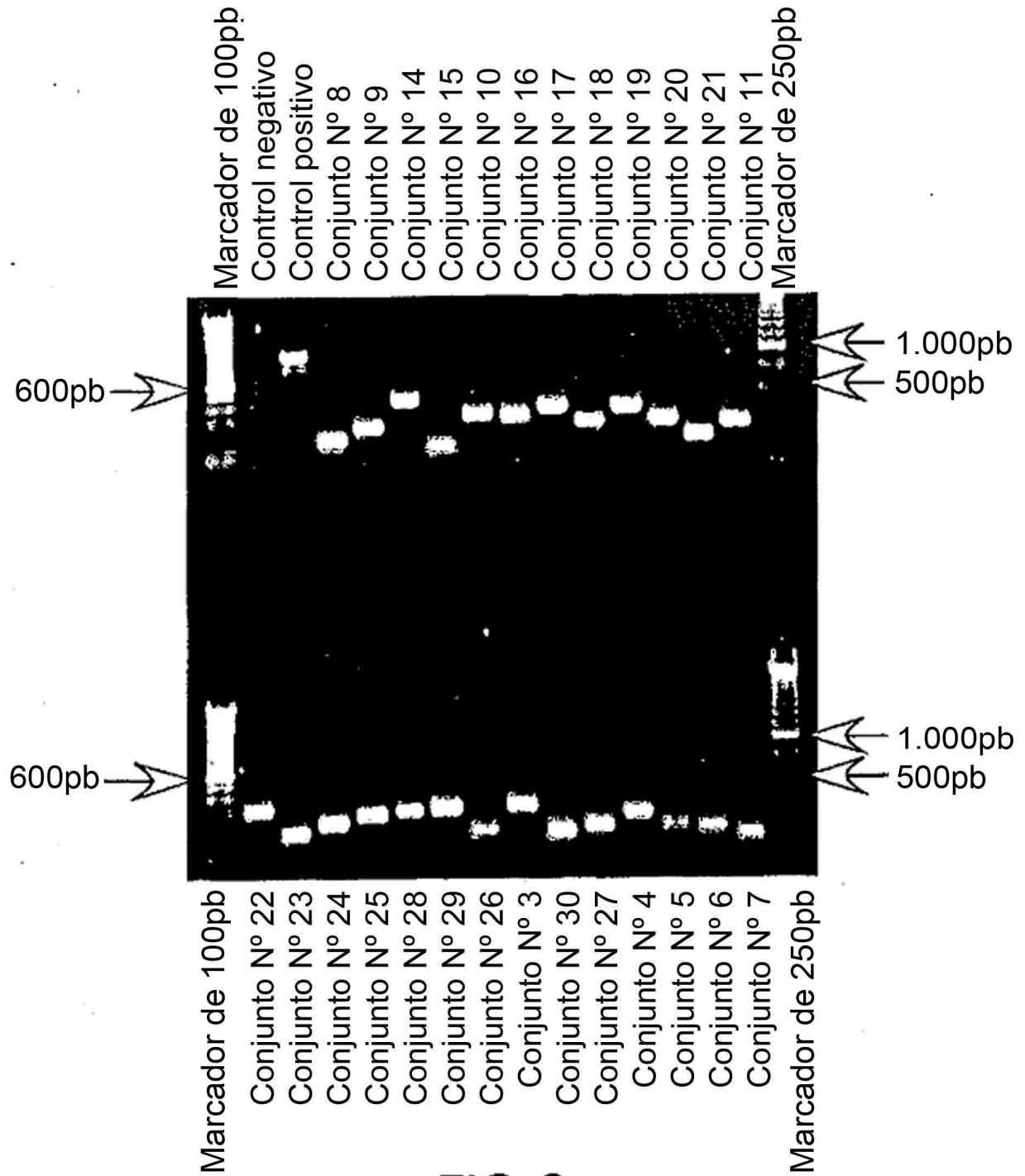


FIG.6

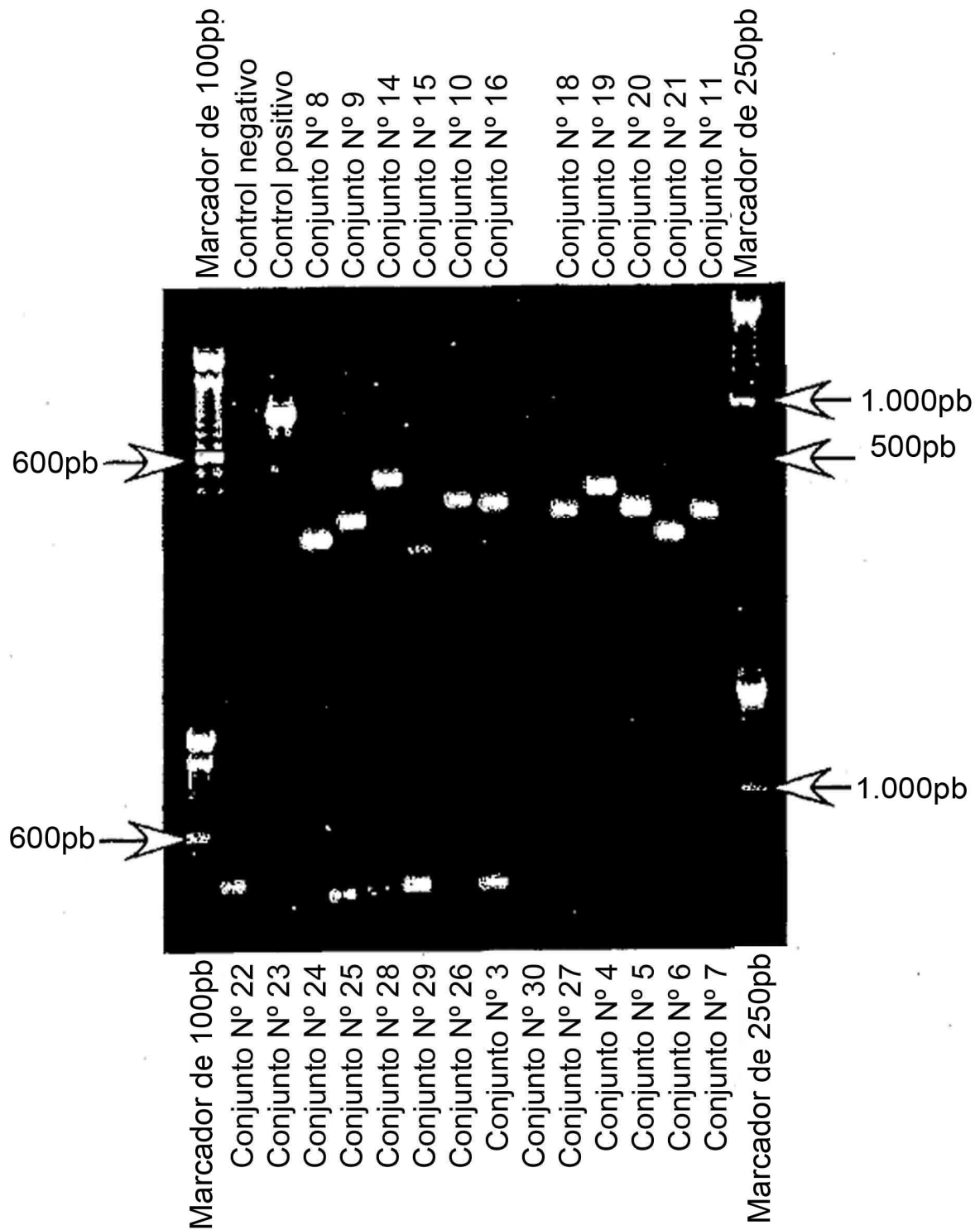


FIG.7A

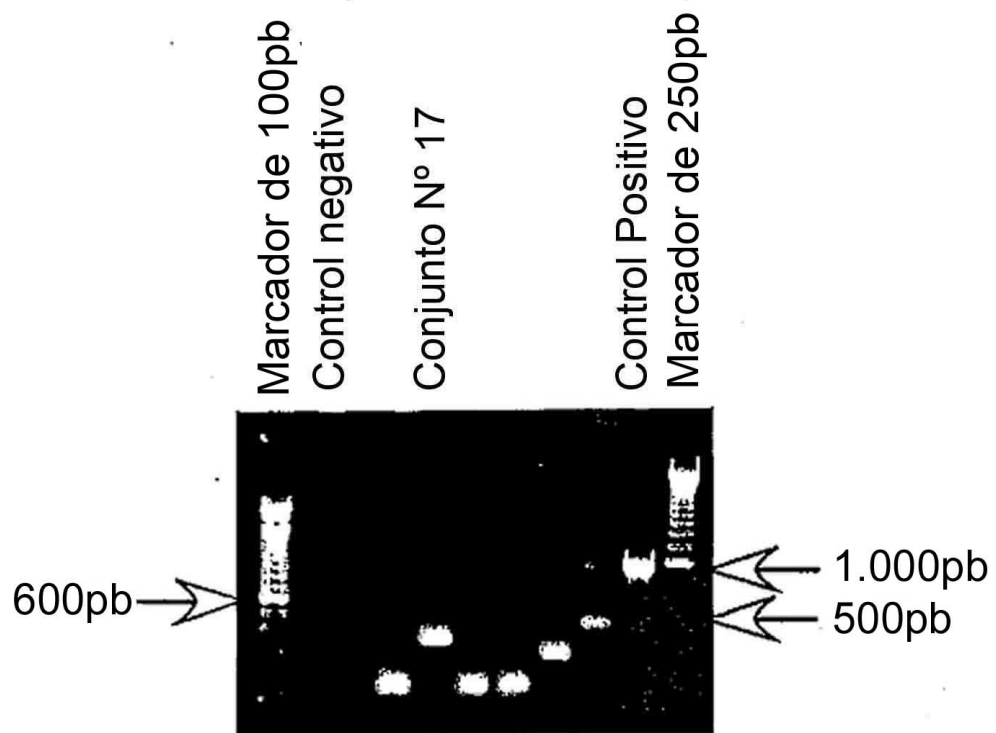


FIG.7B