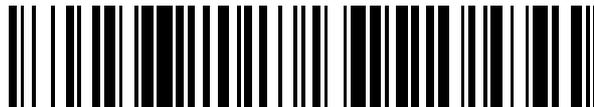


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 710**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2010 E 10828622 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2496718**

54 Título: **Procedimiento de genotipado**

30 Prioridad:

03.11.2009 SE 0950824

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

23.07.2015

73 Titular/es:

**SVA STATENS VETERINÄRMEDICINSKA
ANSTALT (100.0%)
751 89 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**LEIJON, MIKAEL y
BELÁK, SÁNDOR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 541 710 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

Procedimiento de genotipado

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento para genotipar uno o más loci en una molécula diana presente en una muestra. Adicionalmente, la invención se refiere a un kit para realizar dicho procedimiento. La invención también se refiere a un procedimiento para diseñar y producir cebadores de selección para su uso en dicho procedimiento de genotipado o en dicho kit. Asimismo, la invención se refiere a la selección de cebadores como tales.

Antecedentes

10 En investigación genética o en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, una tarea importante es la determinación y la clasificación de las secuencias de nucleótidos en una región concreta del genoma en la que entra en dos categorías, que gobiernan características importantes del fenotipo. El principal ejemplo de una situación de este tipo es el sitio de escisión de la proteína precursora de hemaglutinina (HAO) del virus de la gripe aviar (VGA), que es de un tipo característico de un virus poco o muy patógeno. Los sitios de escisión de HAP del VGA altamente patógeno contienen varias cadenas laterales de aminoácidos básicos con el motivo mínimo R/K-X-R/K-R↓G y hasta ahora solo se han encontrado para los subtipos H5 y H7¹. De hecho, se ha demostrado que un gran número de virus poseen proteínas de superficie para las que se requiere escisión postraduccional para la activación de la infectividad², incluyendo importantes patógenos tales como el virus de la inmunodeficiencia de tipo 1, los filovirus ébola y Marburg y flavivirus, tal como el virus de la fiebre amarilla. Muchos de estos virus poseen motivos del sitio de escisión similares a los de los virus de la gripe aviar y hay varios virus para los que se ha demostrado que existen correlaciones entre las propiedades de patogenicidad y de escisión^{1,2}.

20 En base a la representación de codones, el motivo del sitio de escisión del VGA altamente patógeno puede estar representado por más de 18.000 secuencias distintas a nivel del ARN. Varios cientos de estas posibles secuencias se han descubierto en diferentes virus de los subtipos H5 y H7 y constantemente están apareciendo nuevos virus con secuencias del sitio de escisión antes desconocidas. Por esta razón, los intentos para sondear el sitio de escisión en aplicaciones de PCR se han limitado a subpoblaciones de virus de la gripe³⁻⁶ y los procedimientos estándar actuales para el análisis molecular de la patogenicidad del VGA implican la secuenciación de los nucleótidos del sitio de escisión^{3,7}. Por tanto, los experimentos en un solo tubo para el patotipado del VGA, que eviten una secuenciación de nucleótidos engorrosa, que requiere tiempo y técnicamente exigente, para aplicaciones diagnósticas y de detección selectiva rápidas, deben poder investigar la muestra de un modo multiplexado.

30 Un problema importante de la diferenciación de grupos grandes de secuencias genómicas es la concepción de procedimientos de amplificación multiplexados⁸ para obtener una amplificación homogénea de todos los segmentos diana reconocidos y suprimir las interacciones entre los cebadores.

35 Se han realizado intentos para suprimir interacciones entre los cebadores, por ejemplo, usando la tecnología HANDS (sistema no dimérico asistido por marcadores Homo), en la que los cebadores quiméricos (cebadores de reconocimiento de secuencia marcados con una secuencia universal) están presentes a una concentración relativamente baja, mientras que los cebadores universales dirigidos al complemento de los marcadores universales presentes en los cebadores quiméricos, que en este esquema lleva eficazmente la amplificación a niveles detectables, están a concentraciones más altas⁹. Dado que las mismas secuencias de marcadores universales extienden el cebador directo e inverso de cada par de cebadores quiméricos, los extremos de los productos de amplificación serán autocomplementarios tras unos pocos ciclos de PCR. En resumen, apuntando a los productos de dimerización de cebadores independientes favorecerá la formación de estructuras de "trípode" intramoleculares, lo que protegerá el extremo 3' y evitará la amplificación posterior de los dímeros cebadores⁹. La supresión de los dímeros cebadores permitirá mayor multiplexación.

45 En un esquema relacionado¹⁰, que adapta el concepto de supresión en la PCR¹¹ para detección multiplexada, un cebador universal diana (adaptador) se une a los extremos del ADN genómico. La amplificación multiplexada se consigue usando un cebador, común a todas las reacciones multiplexadas, apuntando a la región del adaptador y un cebador específico diana para cada reacción de componentes multiplexada. Se han propuesto dos mecanismos para explicar la eficiencia de multiplexación archivada con este procedimiento¹⁰. En primer lugar, la reducción del número de cebadores usados en la reacción, dado que el cebador adaptador es idéntico para todas las reacciones, reducir las interacciones indeseadas del cebador. En segundo lugar, la falsa amplificación realizada por el cebador adaptador solo producirá amplicones con extremos autocomplementarios y, por tanto, formará estructuras en trípode cuya amplificación posterior se suprimirá del mismo modo que se ha propuesto para los dímeros cebadores en el procedimiento HANDS⁹.

55 Posteriormente, el uso de cebadores universales ha encontrado muchos usos en procedimientos multiplexados, tales como PCR potenciada¹², Templex PCR¹³, PCR de recorrido anidada¹⁴, pero también en procedimientos de amplificación multiplexada basados en unión, tales como amplificación con sondas dependiente de la unión¹⁵ y ensayos basados en sondas de inversión moleculares marcadas de secuencia¹⁶.

El procedimiento para PCR multiplex, que puede facilitar el genotipado de microsatélites basado en fluorescencia (SSR) y la preparación multiplex de moldes de ADN para ensayos de SNP, se describe en Hayden et al, "Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping", BMC Genomics, vol. 9, nº 1, 2008.

5 A pesar de los esfuerzos realizados en la técnica, todavía existe la necesidad de nuevos procedimientos que proporcionen una amplificación homogénea de todos los segmentos diana reconocidos en grupos grandes de secuencias genómicas.

Sumario de la invención

10 El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento nuevo que aborde el problema mencionado anteriormente de la diferenciación de grupos grandes de secuencias genómicas combinando varios de los temas descritos anteriormente de una forma nueva.

De acuerdo con la invención, la diferenciación de la invención de grupos grandes de secuencias genómicas se consigue mediante un procedimiento semianidado que comprende preamplificación y una reacción de amplificación de dos niveles, que desacopla los acontecimientos de reconocimiento y detección.

15 La invención se refiere, en un aspecto, a un procedimiento de genotipado de los N loci presentes en una muestra en una molécula de ácido nucleico diana, en el que cada locus se localiza en una región marcadora del genotipo de la molécula de ácido nucleico y corresponde a dos o más genotipos.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit para realizar dicho procedimiento de genotipado, que comprende cebadores y, opcionalmente, otros ingredientes de una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico.

20 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para diseñar y producir cebadores de selección para usar en el procedimiento de genotipado o en el kit para realizar el procedimiento de genotipado.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a cebadores de selección adaptados para el genotipado de loci en una molécula de ácido nucleico diana.

25 Otras ventajas y objetos de la presente invención se describirán con más detalle, entre otras cosas, con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el resumen de una realización de la etapa de preamplificación a) del procedimiento de genotipado, en el que algunos cebadores están marcados con una secuencia artificial.

30 La figura 2 muestra el resumen de una realización de la etapa b) del procedimiento de genotipado, en el que un locus se va a genotipar correspondiente a cuatro genotipos. Los cebadores de selección (cebadores directos) son bipartitos con una parte secuencia de reconocimiento del locus (1) y una parte de secuencia de marcaje de dos piezas artificial en la que una pieza es una secuencia específica de genotipo (2) compuesta por ADN libre de estructura para hibridación en matrices y la otra pieza es una secuencia no específica de genotipo (3) común a todos los cebadores de selección bipartitos. El cebador de detección (Cebador directo) es común a todos los genotipos y corresponde a la secuencia no específica de genotipo de los cebadores de selección. El cebador inverso es el mismo tanto para selección como para detección. La palabra ADN (secuencia de código de barras) corresponde a una secuencia en una matriz de lectura. Normalmente, la matriz porta las mismas secuencias que la palabra de ADN para evitar la unión directa de los cebadores bipartitos y la unión requerirá a una ronda de amplificación por PCR para crear el complementario de la palabra de ADN.

40 La figura 3 muestra el esquema de una realización de la etapa b) del procedimiento de genotipado, en el que un locus se va a genotipar correspondiente a dos genotipos del virus de la gripe (PA= alta patogenicidad, PB= patogenicidad baja). Los cebadores de selección (cebadores directos) son bipartitos con una parte de reconocimiento del locus (1) y una parte de secuencia de marcaje específica de genotipo de una pieza artificial (2). Se usan dos cebadores de detección (cebadores directos) y se marcan con el marcador 1 y el marcador 2, respectivamente, correspondiente al respectivo genotipo. El cebador inverso es el mismo tanto para selección como para detección.

50 La Figura 4 muestra el resumen del esquema para una realización del procedimiento de genotipado. En el presente procedimiento hay una preamplificación semianidada y un procedimiento de PCR en tiempo real de dos niveles usado para el patotipado del virus de la gripe aviar (VGA). Un triángulo marca el sitio de escisión, es decir el locus que se va a genotipar. Las flechas negras indican los cebadores de preamplificación. Los conjuntos de cebadores de selección bipartitos para el reconocimiento de sitios de escisión característicos de virus a alta y baja patogenicidad se representan como formas de trípode conectadas a una región rectangular que simboliza los conjuntos de las secuencias de reconocimiento diana. Los cebadores de detección se muestran como formas de trípode marcadas con un marcador. Las líneas sólidas y discontinuas significan si los cebadores

reconocen/detectan sitios de escisión típicos de virus de alta o baja patogenicidad, respectivamente. Las formas en trípode autocomplementarias sirve para minimizar las interacciones cebador-cebador.

La Figura 5 muestra las curvas de amplificación mostradas como la proporción normalizada de la señal de fluorescencia en dos canales ('JOE'/FAM') obtenidas con cebadores de detección Plexor® para el patotipado del VGC H5 (a) y H7 (b). Se indican los aislados del VGC investigados. La patogenicidad de todos los aislados se conocía previamente (Tabla 1 (H5) y Tabla 2 (H7)). Los aislados patogenicidad alta y baja se muestran con líneas continuas y discontinuas, respectivamente. El ensayo se construye para dar una señal positiva para patogenicidad alta y una señal negativa para patogenicidad baja y usa 380 cebadores de selección. Los dos aislados patotipados de forma incorrecta en (b) son: A/mallard/Sweden/123455/08 (H7N7) y A/mallard/Sweden/100993/08 (H7N7).

La Figura 6 muestra las curvas de amplificación mostradas como la proporción normalizada de la señal de fluorescencia en dos canales ('JOE'/FAM') obtenidas con cebadores de detección Plexor® para el patotipado del ensayo 2008 UE. En la figura se indican los aislados del VGC investigados. La patogenicidad de todos los aislados se determinó mediante secuenciación del sitio de escisión (Tabla 1 (H5) y Tabla 2 (H7)). Los aislados de patogenicidad alta y baja se muestran con líneas continuas y discontinuas, respectivamente. El ensayo se construye para dar una señal positiva para patogenicidad alta y una señal negativa para patogenicidad baja y usa 380 cebadores de selección.

La Figura 7 muestra las curvas de amplificación mostradas como la proporción normalizada de la señal de fluorescencia en dos canales ('JOE'/FAM') obtenidas con cebadores de detección Plexor® para el patotipado de los cuatro aislados de VGP indicados en la figura. Las curvas mostradas sin y con cruces se obtuvieron de los experimentos con un conjunto de cebadores de selección 380 y 382, respectivamente. La patogenicidad de todos los aislados se determinó mediante secuenciación del sitio de escisión (Tabla 1 (H5) y Tabla 2 (H7)). Los aislados patogenicidad alta y baja se muestran con líneas continuas y discontinuas, respectivamente. El ensayo se construye para dar una señal positiva para patogenicidad alta y una señal negativa para patogenicidad baja.

La Figura 8 muestra las curvas de amplificación mostradas como la proporción normalizada de la señal de fluorescencia en dos canales ('JOE'/FAM') obtenidas con cebadores de detección Plexor® para el patotipado usando los cebadores pan-HA²⁰ para preamplificación. Los experimentos para patotipado de los aislados indicados en la figura se realizaron usando el conjunto de cebadores de selección 382. La patogenicidad de todos los aislados se determinó mediante secuenciación del sitio de escisión (Tabla 1 (H5) y Tabla 2 (H7)). Los aislados de patogenicidad alta y baja se muestran con líneas continuas y discontinuas, respectivamente. El ensayo se construye para dar una señal positiva para patogenicidad alta y una señal negativa para patogenicidad baja.

La Figura 9 muestra la distribución de las temperaturas de fusión (a) y la longitud (b) entre los 382 cebadores de selección. PA y PB significan cebadores que detectan sitios de escisión de virus de patogenicidad alta y baja, respectivamente.

La Figura 10 muestra las curvas de amplificación obtenidas para aislados americanos mostrados como la proporción normalizada de la señal de fluorescencia en dos canales ('JOE'/FAM') obtenidas con cebadores de detección Plexor® para el patotipado usando un conjunto de cebadores de selección 468 extendido que cubre todos los sitios de escisión en el mundo derivados de la base de datos de la secuencia de ncbi en diciembre de 2009. La patogenicidad de todos los aislados se confirmó mediante procedimientos estándar. Los aislados de patogenicidad alta y baja se muestran con líneas continuas y discontinuas, respectivamente. Un aislado se muestra con una línea discontinua larga y tiene baja patogenicidad, pero es portador de un sitio de escisión típico para virus de patogenicidad alta. Asimismo, mediante el diseño del procedimiento se detecta que el aislado es altamente patogénico. El ensayo se construye para dar una señal positiva para patogenicidad alta y una señal negativa para patogenicidad baja. Las muestras con líneas finas son negativas y fueron de los tipos H7 americanos. Los cebadores para preamplificación diseñados son específicos de H7 y H5 y en esta Figura se usaron los cebadores específicos de H5.

La Figura 11 muestra las curvas de amplificación mostradas como la proporción normalizada de la señal de fluorescencia en dos canales ('JOE'/FAM') obtenidas con cebadores de detección Plexor® para el patotipado del virus de la enfermedad de Newcastle (VNC). Las cepas mesogénicas (discontinua larga) y velogénicas (línea continua) se consideran altamente patogénicas y los aislados lentogénicos (discontinua corta) son poco patogénicos. Los experimentos para patotipado de los aislados indicados en la figura se realizaron usando el conjunto de cebadores de selección 252. La patogenicidad de 25 aislados se conocía anteriormente en la literatura, los sitios de escisión de los otros 5 aislados (SD2C2, SA1C, LK2p, WARW y MX4) se secuenciaron. El ensayo se construye para dar una señal positiva para patogenicidad alta y una señal negativa para patogenicidad baja.

Definiciones

En el contexto de la presente solicitud e invención, se aplican las siguientes definiciones:

Como se usa en el presente documento, el término genotipado se refiere en un sentido amplio al procedimiento de determinar el o los nucleótidos (por ejemplo, la variación de secuencia) concretos presentes o ausentes en un locus polimórfico o localización genómica concretos. El término genotipo se refiere a la constitución genética de una célula, un individuo o un organismo.

5 Con el término locus se quiere decir la localización específica de un gen o secuencia de ácido nucleico, tal como ADN o ARN cromosómico de cualquier origen, derivado de eucariotas, procariotas etc. En una especie bacteriana, el locus se puede localizar, además de en el ADN cromosómico, en elementos móviles tales como plásmidos, transposones, casetes de resistencia y genes de virulencia, y el genotipado incluirá la determinación de la presencia y la naturaleza o ausencia de estos elementos, así como el genotipado de loci cromosómicos.

10 Como se usa en el presente documento, el término muestra se refiere a una composición que contiene un material que se va a detectar o analizar. Las muestras incluyen muestras biológicas que se refieren a cualquier material obtenido de una fuente viva, por ejemplo un animal tal como un ser humano u otro mamífero, una planta, una bacteria, un hongo, un protista o un virus o una forma procesada, tal como material amplificado o aislado.

15 En este contexto, con los términos diana y unión y palabras derivadas de los mismos se pretende ilustrar el acontecimiento en el cual, o el sitio al cual, un cebador puede hibridar en condiciones rigurosas.

Con la expresión región marcadora del genotipo se quiere decir una región genómica cuya secuencia o existencia significan una propiedad del organismo tal como; genotipo, virulencia/patogenicidad, presencia de elemento móvil, presencia de determinados genes, resistencia a antibióticos etc.

20 Como se usa en el presente documento, el término amplificar o amplificación se refiere a medios para aumentar la cantidad de biopolímero, especialmente ácidos nucleicos. En función de los cebadores 5' y 3' que se elijan, la amplificación también sirve para restringir y definir

una región diana o locus del genoma que es objeto de análisis. La amplificación se puede realizar por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica y, en particular, las realizaciones incluyen el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

25 Con el término preamplificación se quiere decir un sistema de amplificación, preferentemente un sistema de PCR, dirigido a un material genético ADN, que puede ser ARN de transcripción inversa, de un organismo para el cual se va a determinar el genotipo, por ejemplo el patotipo de la gripe aviar.

30 Con el término cebador se quiere decir un oligonucleótido que hibrida con una secuencia de ácido nucleico durante la amplificación. La expresión cebador directo se refiere a un cebador con la misma secuencia que la hebra de codificación de un gen o una secuencia artificial unida quiméricamente a la hebra de codificación, y la expresión cebador inverso hace referencia a un cebador con una secuencia complementaria a la hebra de codificación de un gen o complementaria a una secuencia artificial unida quiméricamente a la complementaria de la hebra de codificación.

35 Los cebadores de selección se usan en un sistema de amplificación de selección, preferentemente un sistema de PCR que debe interpretarse como un sistema de amplificación dirigido al molde proporcionado por el sistema de amplificación preamplificación. Los cebadores inversos y directos están dirigidos a la región, que determina la propiedad analizada, de un modo multiplex mediante los cebadores bipartitos cuyas regiones en el extremo 5' están constituidas por elementos de la secuencia artificial de diferentes tipos según la naturaleza del genotipo indicado por la secuencia que reconoce la porción del extremo 3' del cebador bipartito. El correspondiente cebador inverso/directo puede o no estar multiplexado.

40 Los cebadores de selección se usan en un sistema de amplificación de detección, preferentemente un sistema de PCR que debe interpretarse como un sistema de amplificación multiplex dirigido a los moldes proporcionados por el sistema de amplificación de selección. Los cebadores inversos o directos pueden estar marcados con marcadores o restos químicos para detección.

45 Con el término amplicón se quiere decir un segmento de ADN formado como los productos de acontecimientos de amplificación naturales o artificiales.

Los términos ácido nucleico y molécula de ácido nucleico se usan de forma intercambiable a lo largo de la divulgación. Los términos se refieren a un polímero de desoxirribonucleótido (ADN) ribonucleótido (ARN) y a híbridos de ARN/ADN en forma mono o bicatenaria.

50 La frase amplificación simultánea se refiere a la amplificación de 2 o más loci o regiones diana de ácido nucleico al mismo tiempo. La amplificación simultánea normalmente está dentro de la misma mezcla de amplificación. Aunque en el presente documento se contempla que la amplificación simultánea se puede producir en mezclas de reacción separadas, para los procedimientos proporcionados en el presente documento, las reacciones de amplificación simultánea normalmente se producen en la misma única reacción.

Como se usa en el presente documento, el término multiplexación se refiere a la amplificación simultánea o reacción de extensión de masa del cebador de más de un oligonucleótido o cebador (por ejemplo, en un único recipiente de reacción); o el análisis simultáneo de más de un oligonucleótido, por ejemplo en un dispositivo lector de matrices; o la investigación simultánea de la muestra con múltiples cebadores.

- 5 Como se usa en el presente documento, la frase ácido nucleico diana se refiere a uno o más ácidos nucleicos, tales como ADN genómico, a partir de los cuales se van a amplificar una o más regiones o loci.

Como se usa en el presente documento, el término polimorfismo se refiere a la coexistencia de más de una forma o alelo de un ácido nucleico, tal como un gen, o porción del mismo. Por ejemplo, una porción o locus de un gen para el cual existen al menos dos alelos diferentes, es decir dos secuencias de nucleótidos diferentes, se denomina loci, regiones o sitios polimórficos de un gen. Un locus polimórfico puede ser de un solo nucleótido (por ejemplo, SNP) o puede ser de varios nucleótidos de longitud (por ejemplo, el sitio de escisión de la gripe aviar, inserciones o deleciones). De acuerdo con lo anterior, polimorfismo incluye sustituciones, inserciones, duplicaciones y deleciones de nucleótidos. Un polimorfismo también puede hacer referencia a uno o más nucleótidos o secuencias de nucleótidos concretos que se producen en un sitio polimórfico concreto.

15 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un procedimiento de genotipado de los N loci presentes en una muestra en una molécula de ácido nucleico diana, en el que N es al menos 1 y cada locus se localiza en una región marcadora del genotipo de la molécula de ácido nucleico y corresponde a dos o más genotipos, preferentemente dos genotipos. El procedimiento comprende las siguientes etapas a) a c).

- 20 En la etapa a) se realiza una preamplificación de cada región marcadora del genotipo usando reacciones enzimáticas dependientes del cebador. La preamplificación se realiza con un primer grupo de pares de cebadores de amplificación que consisten en un primer conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un primer conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, que dan uno o más amplicones que abarcan la o las regiones marcadoras del genotipo. Cada amplicón contiene una región con al menos una secuencia de nucleótidos que puede actuar como una diana de unión al cebador distinta de la región marcadora del genotipo.

La preamplificación se puede lograr en N reacciones monoplex separadas o en una sola reacción N-plex o cualquier cosa entre estos extremos.

- 30 La secuencia de nucleótidos, preferentemente de una longitud de 10-40 nucleótidos, que puede actuar como diana de unión al cebador pertenece a un segundo conjunto de secuencias que tienen menos de 100 miembros, preferentemente menos de 20 miembros y, más preferido, de 1 a 5 miembros. Dicho conjunto de secuencias se puede conseguir mediante la existencia de regiones genómicas conservadas de los amplicones o usando secuencias artificiales conectadas enzimáticamente, por ejemplo mediante unión o usando cebadores para PCR bipartitos que contienen partes en el extremo 5' artificial o una combinación de estos mecanismos. Algunas realizaciones de la etapa a) de preamplificación se describen en la figura 1.

- 35 La muestra es una composición que contiene un material que se va a genotipar. Las muestras incluyen muestras biológicas que se refieren a cualquier material obtenido de una fuente viva, por ejemplo un animal tal como un ser humano u otro mamífero, una planta, una bacteria, un hongo, un protista o un virus o una forma procesada, tal como material amplificado o aislado.

- 40 El locus o loci de interés puede representar localización(es) específica(s) de un gen l secuencia de ADN o ARN que determinan una propiedad específica, tal como el grado de patogenicidad, la resistencia a antibióticos. El número de loci, N, que se va a genotipar está, preferentemente, entre 1 y 10 000, más preferido es de 1 a 100, lo más preferido es 1.

- 45 La magnitud de la preamplificación puede ser suficiente para la detección directa por medios tales como electroforesis en gel o PCR en tiempo real, pero también puede ser menor que lo que normalmente se necesita para la detección directa.

En la etapa b) se realiza una reacción de amplificación de ácido nucleico a dos niveles usando reacciones enzimáticas dependientes de cebador en el o los amplicones de la etapa a), comprendiendo la etapa b) las siguientes dos etapas b1 y b2).

- 50 El primer nivel, la etapas b1) es una amplificación de ácido nucleico usando un segundo grupo de pares de cebadores que se unen a cada amplicón producido en la etapa a). Dicho grupo de pares de cebadores consiste en un segundo conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un segundo conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, en el que cada variante de secuencia de cada locus es el objetivo de al menos un cebador de dichos segundos conjuntos de cebadores, formando dicho al menos un cebador un conjunto de cebadores de selección. En contraste con el diseño de cebador convencional, se debería seleccionar una región con una gran variación para la diana de unión del cebador de selección, en el que las diferencias entre genotipos aparecen claramente. Los cebadores de selección son bipartitos que tienen en el extremo 3' una parte de la secuencia de

reconocimiento del locus que se une a dichos N loci en la región marcadora del genotipo y en el extremo 5' una parte de la secuencia marcadora de una pieza artificial que es específica del genotipo o una parte de la secuencia marcadora de dos piezas artificial, en la que una pieza es específica del genotipo y la otra no es específica del genotipo. Cada cebador de selección que se une al locus diana de la región marcadora del genotipo forma un par de cebadores junto con otro cebador perteneciente a dichos segundos conjuntos de cebadores, pero apuntando a dicha secuencia de nucleótidos que pueden actuar como una diana de unión al cebador de la etapa a). Se prefiere que cada cebadores de selección está presente en una concentración de menos de 100 nM, preferentemente de 10-0.01 nM, y lo más preferido de aproximadamente 0,1 nM, y el otro cebador de dicho par de cebadores está presente en una concentración de al menos 100 veces, preferentemente entre 100 y 100.000 veces la de dicho cebadores de selección. Esta etapa b1) da amplicones, cada uno de los cuales contiene uno respectivo de dichos N loci.

La unión, u orientación, de un cebadores de selección bipartito a dichos N loci deberá producirse mediante hibridación de dicho cebador a la región marcadora del genotipo que contiene el locus, en condiciones rigurosas. El número de apareamientos erróneos entre la región marcadora del genotipo y el cebador de selección deberá ser inferior 5, preferentemente inferior a 4, más preferido no superior a 1 y, lo más preferido 0.

La concentración baja de los cebadores de selección permiten una multiplexación muy alta (al menos 10-1000). Un número elevado de diferentes cebadores de selección se puede usar de forma simultánea en el procedimiento, tal como 10 000 cebadores, más preferido de 1000 a 100 cebadores. Debido al carácter muy robusto del procedimiento para genotipar el número total de cebadores de selección diferentes que se pueden usar para la amplificación simultánea pueden usarse fácilmente, si se requiere, por ejemplo como una consecuencia de la mutaciones que conducen a secuencias no conocidas previamente que requieren nuevos cebadores para la detección.

Los cebadores de selección también pueden ser degenerados, lo que permite la detección de secuencias muy similares dentro del mismo genotipo por medio de variantes del mismo cebador. El concepto de cebadores degenerados es bien conocido en la técnica. En las secuencias de ácido nucleico de oligonucleótidos sintéticos degenerados (cebadores) R es A o G, Y es C o T, M es A o C, K es G o T, W es A o T, S es C o G, B es C, G o T, D es A, G o T, H es A, C o T, V es A, C o G, y N es A, C, G o T.

La concentración de ese otro cebador es al menos 100 veces la de dicho cebador de selección y puede estar en el intervalo de 100 a 0,01 μ M, preferentemente 10-0,01 μ M, y lo más preferido de aproximadamente 0,3 μ M.

El segundo nivel, la etapas b2) es una amplificación de ácido nucleico usando un tercer grupo de pares de cebadores que se unen a cada amplicón producido en la etapa b1). Este grupo de pares de cebadores, presente en una concentración de al menos 100 veces, preferentemente entre 100 y 100 000 veces la de dichos cebadores de selección en la etapa b1), consiste en un tercer conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un tercer conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes. Cada parte de la secuencia de marcaje de cada cebador de selección es objetivo de al menos un cebador de dicho tercer conjunto de cebadores, en el que dicho al menos un cebador forma un conjunto de cebadores de detección y en el que cada cebador de detección que se une a la secuencia de marcaje forma un par de cebadores junto con otro cebador perteneciente a dicho tercer conjunto de cebadores pero dirigidos a dicha secuencia de nucleótidos que puede actuar como una diana de unión al cebador de la etapa a). Los cebadores de detección tienen, preferentemente:

i) una secuencia específica de genotipo correspondiente a la parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial de los cebadores de selección, en el que cada cebador de detección está marcado con un marcador detectable específico de genotipo; o

ii) una secuencia no específica de genotipo que es común a todos los cebadores de detección y corresponde a la secuencia no específica de la parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial de los cebadores de selección, en el que cada cebador de detección está marcado opcionalmente en el extremo 5' con un marcador detectable o un resto químico.

La etapa b2) tiene como resultado amplicones detectables, cada uno de los cuales contiene uno respectivo de dichos N loci marcados con secuencias de marcaje específicas de genotipo y, opcionalmente, marcadores específicos de genotipo.

Dichos cebadores de detección pueden estar marcados con un marcador seleccionado del grupo que consiste en fluoróforos, marcadores luminiscentes, radiomarcadores, marcadores enzimáticos, cromóforos, tales como Biosearch Blue™, Acridina, Coumarina, FAM, Rodamina verde, TET Cal Fluor® Gold 540, JOE, VIC, HEX, CAL Fluor Orange 560, Quasar® 570, TAMRA, Rodamina Rojo, CAL Fluor 590, Cy3.5, ROX, CAL Fluor Red 610, CAL Fluor REd 635, Pulsar(R) 650, Quasar 670, y Quasar 705, y un miembro de un par de unión, tal como biotina y estreptavidina

La concentración de los cebadores pertenecientes a dicho tercer grupo de pares de cebadores puede estar en el intervalo de 100 a -0,01 μ M, preferentemente 10-0,01 μ M, y lo más preferido de aproximadamente 0,3 μ M.

En la etapa c), el genotipado de dichos N loci de la molécula de ácido nucleico diana se realiza mediante:

c1) durante, u opcionalmente después, la amplificación del mismo detectando cada marcador comprendido en cada amplicón producido en la etapa b2i), y relacionando la cantidad predominante del marcador detectado con un genotipo específico para cada locus; o

5 c2) tras la amplificación poniendo en contacto cada amplicón producido en la etapa b2ii) con una matriz de detección de secuencias específicas de genotipo, detectando la hibridación de cada amplicón con la matriz y relacionando la hibridación detectada con un genotipo específico para cada locus.

10 El genotipado de la etapa c1) puede realizarse de forma ventajosa por medio de PCR en tiempo real, pero también pueden ser concebibles otras técnicas de amplificación obvias para el experto en la materia. El genotipado de la etapa c2) puede realizarse de forma ventajosa por medio de una matriz de detección tal como un ensayo de micromatrices, pero también se pueden usar otras técnicas conocidas por los expertos.

15 Un modo de realizar el genotipado de la etapa c1) es mediante el uso de cebadores de detección que están adyacentes a un marcador en el extremo 5' tienen un iso-dC nucleótido. La amplificación se realiza en presencia de dabcil-iso-dGTP, y la detección en la etapa c1) se produce cuando dabcil-iso-dGTP inactiva las señales marcadoras cuando se incorporan enfrente de iso-dC. En el caso en el que el locus o loci que se van a genotipar corresponden a dos genotipos, se puede calcular la diferencia entre las señales marcadoras, con el fin de alcanzar un ensayo más sólido. Monitorizando la señal de diferencia o la proporción de la señal de cebadores marcados, un esquema de detección positiva o negativa directa permite un tipado rápido y simple.

20 Las condiciones adecuadas para la amplificación son bien conocidas en la técnica y dependen de, por ejemplo, la temperatura y el tiempo de hibridación, el tipo de tampón, los aditivos, las concentraciones del cebador, el número de ciclos etc. y son bien conocidos para un experto en la técnica. Las amplificaciones de acuerdo con el procedimiento de genotipado son, preferentemente, en condiciones rigurosas.

25 Los cebadores de selección y los cebadores de detección pueden tener secuencias seleccionadas para minimizar la interacción cebador-cebador. Esto se puede conseguir mediante, por ejemplo, cebadores parcialmente autocomplementarios. De forma ventajosa, la parte de la secuencia de marcaje artificial de dichos cebadores de selección tiene extremos autocomplementarios para formar menos de 10 pares de bases, preferentemente 3-7 pares de bases y, lo más preferido, 5 pares de bases. Un modo de minimizar la interacción cebador-cebador es mediante la formación de la estructura en trípode, véase la figura 4.

Se prefiere que todos los cebadores usados en el procedimiento anterior se construyan para tener temperaturas de fusión dentro de un intervalo de aproximadamente 10 °C, preferentemente 5 °C y, más preferido, 1 °C uno de otro.

30 En una realización del procedimiento para genotipar dicha al menos una secuencia que puede actuar como diana de unión al cebador de la etapa a) corresponde a una parte de marcaje de la secuencia artificial introducida en los amplicones formados en la etapa a) por medio de dicho primer conjunto de cebadores, en el que dichos cebadores son bipartitos y comprenden una secuencia de marcaje en 5' artificial y una región en 3' de unión a la molécula de ácido nucleico diana. En otra realización, dicha al menos una secuencia que puede actuar como diana de unión al cebador de la etapa a) corresponde a regiones genómicas.

35 En una realización preferida, dicho tercer conjunto de cebadores usado en la etapa b2) que se unen a al menos una secuencia que puede actuar como una diana de unión al cebador de la etapa a) es el mismo que dicho segundo conjunto de cebadores usados en la etapa b1) que se unen a la al menos una secuencia que puede actuar como una diana de unión al cebador de la etapa a). En otra realización preferida, dicho segundo conjunto de cebadores usado en la etapa b1) que se unen a al menos una secuencia que puede actuar como una diana de unión al cebador de la etapa a) es el mismo que el primer conjunto de cebadores usados en la etapa a).

Los cebadores de selección y los cebadores de detección pueden pertenecer a dichos conjuntos de cebadores directos o a dichos conjuntos de cebadores inversos.

45 Cada locus de dichos N loci corresponde a dos o más genotipos, preferentemente dos genotipos. Estos dos genotipos pueden indicar patogenicidad alta y patogenicidad baja, respectivamente, de un microorganismo cuyo genoma contiene dicho locus. Los dos genotipos pueden también corresponder a la presencia o ausencia de un locus, lo que indica, por ejemplo, resistencia antimicrobiana y no resistencia, respectivamente, de los microorganismos. La presencia o ausencia de un locus podría indicar, por ejemplo, resistencia a antibióticos. El microorganismo puede ser un virus, tal como un virus de la gripe, una bacteria etc.

50 Las etapas a), b1) y b2) pueden llevarse a cabo en el mismo tubo de reacción, pueden llevarse a cabo en tubos de reacción distintos o realizándose cualquiera de las etapas a), b1) y b2) en un tubo de reacción distinto pero las otras dos etapas en el mismo tubo de reacción. Al llevar a cabo dos etapas en el mismo tubo de reacción se puede usar un tubo de múltiples compartimentos, tal como el descrito en el documento WO200606245(A2).

55 Las Figuras 2 y 3 muestran las realizaciones de la etapa b), en la que los cebadores de selección bipartitos que tienen una secuencia de marcaje de dos piezas artificial se ilustran en la fig. 2 y los cebadores de selección bipartitos que tienen una secuencia de marcaje de una pieza artificial se ilustran en la fig. 3.

En una realización del procedimiento para el genotipado de un locus específico se genotipa un sitio de escisión en un virus de la gripe aviar. Dicho sitio de escisión, tras la escisión, conferirá patogenicidad alta y patogenicidad baja, respectivamente, al virus. Por tanto, la patogenicidad alta y baja corresponde a dos genotipos. Un par de cebadores se usa en la etapa a) que consiste en los cebadores que comprenden las secuencias de ácido nucleico de SEC ID N° 59 y 58 o de cebadores que comprenden las secuencias de ácido nucleico de SEC ID N°: 57 y 56. Los cebadores de selección de la etapa b1) se eligen de los oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 1 a 55, mientras que los cebadores de detección comprenden las secuencias de SEC ID N° 60 y 61. En una realización preferida del mismo, dichos cebadores de detección tienen un iso-dC nucleótido adyacente al marcador en el extremo 5' y la amplificación de la etapa b2) se realiza en presencia de dabcil-iso-dGTP, en el que el dabcil-iso-dGTP inactiva las señales marcadoras cuando se incorporan enfrente del iso-dC.

Considerando la seria amenaza epidemiológica que plantean los virus de la gripe muy patogénicos a nivel mundial, el procedimiento de la invención se ilustra mediante un ensayo de patotipado de la gripe aviar, en el que la muestra se investiga para casi 400 sitios de escisión diferentes en dos grandes conjuntos de secuencias genómicas. No obstante, el procedimiento también podría ser útil en todas las áreas de investigación genómica en las que se producen problemas similares.

Se ha construido un ensayo de patotipificación de la gripe aviar para todos los virus de la gripe aviar aislados hasta la fecha en el hemisferio oriental. El procedimiento depende de una construcción en PCR semianidada que, en el caso del ensayo de patotipado del VGA, permite una investigación de casi 400-plex de la muestra, que cubre todas las variantes de la secuencia relevantes que, de acuerdo con nuestros conocimientos, se han producido en el hemisferio oriental hasta la fecha. El alto nivel de multiplexado solo es eficaz durante el acontecimiento de reconocimiento y se reduce a una detección mediante PCR en tiempo real de dos colores mediante el uso de cebadores de trípode fluorogénicos universales. Se muestra que el procedimiento proporciona una alternativa rápida y simple a la secuenciación del ADN, que se puede implementar para detección selectiva de muestras grandes o en aparatos de PCR portátiles para el diagnóstico en campo.

La aparición de sitios de escisión característicos de virus de alta o baja patogenicidad está indicada por una señal de proporción de la fluorescencia positiva o negativa, respectivamente. Se muestra que el concepto del ensayo es extensible, versátil, sólido y muy eficiente. La escisión postraduccional proteolítica es un requisito habitual para la activación de virus y frecuentemente se acopla a la patogenicidad. Por tanto, la técnica de ensayo deberá encontrar una amplia aplicación en la investigación viral básica, así como en aplicaciones diagnósticas y, en general, en aplicaciones de tipado en todos los campos de la genómica. El patotipado del virus de la gripe aviar equivale al problema de la discriminación de todas las secuencias de ARN que conduce al motivo del aminoácido: R/K-X-R/K-R de todas las demás posibles secuencias de nucleótidos. Este es un enorme problema de sondaje considerando que en esta serie de aminoácidos pueden producirse más de 18.000 secuencias de aminoácidos. Por esta razón, el patotipado normalmente se realiza mediante secuenciación de ADN en lugar de ensayos con sondas⁷. Procedentes de todas las localizaciones geográficas, excluyendo las Américas, a principios de 2009 se descubrieron aislados de los subtipos H5 y H7 con aproximadamente 240 secuencias con sitios de escisión únicos, como pone de manifiesto su presencia en el banco de datos del NCBI²¹. No obstante, esta cifra aumenta de forma constante debido a la presión inmunológica del amplio espectro de especies de huéspedes que pueden alojar virus de la gripe, lo que conduce a alteraciones en las glucoproteínas expuestas en la superficie, sobre todo en la proteína hemaglutinina, que determina la patogenicidad.

Para resolver este problema, los inventores explotaron una nueva estrategia para la investigación de secuencias de ADN altamente multiplexadas de una muestra mediante separación de los acontecimientos de reconocimiento y detección en una construcción del sistema de PCR de dos niveles. Reduciendo la concentración de los cebadores que reconocen la secuencia (los cebadores de selección) miles de veces, los inventores pudieron diseñar una mezcla de cebadores de 380-plex para el reconocimiento del conjunto completo de los sitios de escisión existentes (la obtención de un exceso de muestras se debe al uso de cebadores degenerados que producen alguna secuencia hasta ahora no descubierta en la naturaleza). La disminución de la concentración de los cebadores de selección se hace posible mediante preamplificación de la diana e inversión eficaz del acontecimiento de reconocimiento. La detección está relacionada con la patogenicidad del sitio de escisión mediante dos cebadores Plexor^{®17} con marcadores fluorescentes y secuencias diferentes, que se dirigen a las regiones artificiales en 5' de los dos conjuntos de cebadores de selección bipartitos que, a su vez, están dirigidos a los sitios de escisión de baja y alta patogenicidad. Usando un formato de PCR en tiempo real dúplex, la reacción de patotipado se puede llevar a cabo en un solo tubo y los inventores dejan que los dos conjuntos de cebadores de reconocimiento del sitio de escisión (los cebadores de selección) compitan por la unión a la diana (es decir, el sitio de escisión). De este modo, los inventores evitan requerir una especificidad absoluta del ensayo, es suficiente que un sitio de escisión de una muestra en investigación sea más similar a uno o el otro de los dos conjuntos de cebadores de selección para deducir la patogenicidad. Los inventores encuentran conveniente controlar la señal de proporción obtenida de los dos cebadores de detección para determinar la amplificación preferente de uno de los conjuntos de cebadores de selección por encima del otro. Adicionalmente, al dar a los cebadores de detección extremos autocomplementarios (cebadores trípode) se suprimió considerablemente el cebado falso y las señales inespecíficas. Aquí, el mecanismo es diferente del uso de investigadores previos del concepto de trípode, que usaron cebadores quiméricos con una región en el extremo 5' universal para suprimir los dímeros cebadores⁹ o las secuencias adaptadoras ligadas universales para suprimir el cebado falso sobre la diana¹⁰. En el presente caso, los propios cebadores forman

trípodes. Los fuertes apareamientos de bases intra e intermoleculares que se formarán mediante los cebadores trípode protegen el extremo 3' y compiten por esquemas de apareamiento alternativos que puedan proporcionar un sustrato para la ADN polimerasa. Además, los inventores especulan con que el extremo en 5' con forma de trípode de los cebadores de selección bipartitos podía funcionar como una carga de carga que repelen otros cebadores que conducen a la disminución de las interacciones entre cebadores. Los intentos de construir los cebadores de detección de los conjuntos de ADN sin estructura²² no han tenido éxito, ya que estos cebadores parecían iniciar fácilmente el cebado en el conjunto de cebadores de selección (datos no mostrados). Es interesante destacar que uno de los primeros estudios que usó marcadores de cebadores universales en PCR multiplex también usaron un cebador universal que podía formar una estructura en horquilla con cinco pares de bases GC²³.

La presente estrategia proporciona un ensayo notablemente eficaz y sólido para el patotipado del virus de la gripe aviar. Todos los aislados portadores de secuencias de sitios de escisión representados en los conjuntos de cebadores de selección se patotiparon correctamente. El ensayo falló únicamente cuando la preamplificación falló o cuando se encontraron nuevos sitios de escisión. El ensayo es muy flexible, ya que fácilmente se pueden añadir nuevos cebadores de selección cuando emerjan virus con nuevos sitios de escisión y se pueden usar cebadores de preamplificación siempre que abarquen el sitio de escisión. Cabe destacar que el ensayo de patotipado no es un ensayo de detección que requiere mediante optimización para una sensibilidad adecuado. Esto hace que el ensayo sea muy sólido e insensible al perfil de temperatura exacta de la PCR usada y la pureza y la concentración de los cebadores. Estos requisitos se cambian en su lugar al sistema de preamplificación. Aunque, los cebadores de detección son aproximadamente dos veces más largos que los cebadores normales y en el presente estudio se usó un conjunto de 55 cebadores de selección degenerados, el coste adicional del ensayo de patotipado es insignificante. Esto se debe a la dilución por un factor de mil en comparación con una concentración del cebador típica que reduce los costes por reacción para el conjunto completo de 55 cebadores a solo el diez por ciento de los costes de un solo cebador convencional. Dado que el ensayo se basa en un formato semianidado, las contaminaciones por arrastre podrían ser un problema. No obstante, la insensibilidad inherente del ensayo de patotipado con una concentración tres órdenes de magnitud menor de los cebadores de reconocimiento de la secuencia hace que el ensayo sea mucho menos propenso a sufrir este problema que los abordajes de PCR anidada convencionales.

Este ensayo de patotipado proporciona nuevas oportunidades para la investigación y diagnóstico de la gripe aviar, ya que tiene la capacidad de sustituir los caros y engorrosos procedimientos de secuenciación que requieren tiempo que se usan actualmente y de permitir un diagnóstico más rápido con la ventaja de transportar la muestra simplificada a los laboratorios en campo en las proximidades de los brotes. El procedimiento también sería ideal para implementar con aparatos de PCR portátiles, incluso sin la lectura en tiempo real, debido a la sencilla lectura de la señal positiva/negativa que se puede usar para diferenciar los patotipos. Otra aplicación es la detección selectiva de alto rendimiento mediante investigación multiplex para las secuencias de interés. Aunque en el presente estudio, los autores han ilustrado la estrategia del ensayo con el patotipado del virus de la gripe aviar, la escisión postraduccional proteolítica es un requisito habitual para la activación de virus y, por ejemplo, para el virus de Newcastle y el virus Sendai, la escisión ha tenido aplicabilidad en la virología básica y aplicada, en institutos diagnósticos centrales así como en laboratorios de campo con una equipación sencilla. Adicionalmente, el procedimiento proporciona nuevos medios para una amplia gama de aplicaciones de tipado generales en todos los campos de la biotecnología genómica.

También es concebible cualquier otro uso del procedimiento de la invención para el tipado de conjuntos grandes de secuencias genómicas tal como para la diferenciación entre bacterias que muestran resistencia y no resistencia a antibióticos respectivamente.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit para realizar el procesamiento anterior para genotipado, que comprende un primer grupo de pares de cebadores que consiste en un primer conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un primer conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes para la realización de la etapa de preamplificación a) del procedimiento, un segundo grupo de pares de cebadores que consiste en un segundo conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un segundo conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, un segundo conjunto de los cuales forma un conjunto de cebadores de selección, en el que los cebadores de selección son bipartitos y tienen en el extremo 3' una secuencia de reconocimiento del locus y en el extremo 5' una parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial que es específica del genotipo o una parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial, siendo una pieza de la misma específica del genotipo y siendo la otra no específica del genotipo, para la realización de la amplificación de primer nivel de la etapa b1) del procedimiento; un tercer grupo de pares de cebadores que consiste en un tercer conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un tercer conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, un tercer conjunto del cual forma un conjunto de cebadores de detección, en el que los cebadores de detección tienen una secuencia específica del genotipo correspondiente a la parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial de los cebadores de selección o una secuencia no específica del genotipo común a cada cebador de detección y correspondiente a la secuencia no específica de la parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial de los cebadores de selección, para la realización de la amplificación de segundo nivel de la etapa b2) del procedimiento en el que los cebadores de detección están marcados opcionalmente en el extremo 5' con un marcador o un resto químico y, opcionalmente, otros ingredientes de una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico.

Es ventajoso que dichos cebadores de selección o cebadores de detección tengan secuencias seleccionadas para minimizar la interacción cebador-cebador. Esto se puede conseguir proporcionando cebadores con extremos autocomplementarios que forman menos de 10, más preferentemente 3-7 y lo más preferido 5 pares de bases. Los extremos autocomplementarios pueden formar trípodas, como se ha descrito anteriormente.

5 Los cebadores de detección están marcados, preferentemente, con un marcador o resto químico seccionado del grupo que consiste en fluoróforos, marcadores luminiscentes, marcadores enzimáticos, radiomarcadores, cromóforos y un miembro de un par de unión, tal como biotina o estreptavidina. Ejemplos incluyen Biosearch Blue™, Acridina, Coumarina, FAM, Rodamina Verde, TET Cal Fluor® Gold 540, JOE, VIC, HEX, CAL Fluor Orange 560, Quasar® 570, TAMRA, Rodamina Roja, CAL Fluor 590, Cy3.5, ROX, CAL Fluor Red 610, CAL Fluor REd 635, Pulsar(R) 650, Quasar 670, y Quasar 705.

10 En una realización, dicho tercer conjunto de cebadores directos es el mismo que dicho segundo conjunto de cebadores directos o dicho tercer conjunto de cebadores inversos es el mismo que dicho segundo conjunto de cebadores inversos. En otra realización, dicho segundo conjunto de cebadores directos es el mismo que dicho primer conjunto de cebadores directos o dicho segundo conjunto de cebadores inversos es el mismo que dicho primer conjunto de cebadores inversos.

15 En una realización preferida para realizar el genotipado del virus de la gripe aviar, el kit comprende los primeros conjuntos de cebadores que comprenden las secuencias de SEC ID N° 59 y 58 o las secuencias de SEC ID N°: 57 y 56, los cebadores de selección elegidos de los oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 1 a 55, y los cebadores de selección elegidos de los oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 60 y 61.

20 El kit puede incluir los cebadores de detección que comprenden un iso-dC nucleótido adyacente al marcador en el extremo 5' y la mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico comprende dabcil-iso-dGTP.

25 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para diseñar y producir cebadores de selección para usar en el procedimiento para genotipado o en el kit para realizar el procedimiento de genotipado. El procedimiento comprende las siguientes etapas a) a g). Las etapas a) a e) se realiza, preferentemente, por medio de uno o varios programas informáticos.

30 En la etapa a), se alinea un gran número de secuencias de molécula de ácido nucleico de interés, que comprenden al menos un locus. En la etapa b) las secuencias de molécula de ácido nucleico alineadas se mezclan por medio de un programa informático con función de alineación del perfil. Las secuencias de molécula de ácido nucleico alineadas están en la etapa c) recortadas a oligonucleótidos que tienen entre 20 y 50 nucleótidos, preferentemente entre 30 y 40 nucleótidos, más preferido 35 oligonucleótidos, que cubren dicho locus, y en la etapa d) la longitud de dichos oligonucleótidos de la etapa c) se ajusta para alcanzar temperaturas de fusión similares para todos los oligonucleótidos citados. Las temperaturas de fusión de dichos oligonucleótidos están, preferentemente, en un intervalo de aproximadamente 10°C, preferentemente de 5°C, más preferido en 1°C. En la etapa e) se refiere al agrupamiento de dichos oligonucleótidos en cebadores degenerados y la etapa f) se refiere a la síntesis de dichos cebadores degenerados al tiempo que se añade al extremo 5' de los cebadores una parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial, en la que una pieza de la misma es específica del genotipo y la otra no es específica del genotipo. Por último, en la etapa g) se recupera el producto del cebador de selección de la etapa f).

40 La parte de la secuencia de marcaje artificial de los cebadores de selección puede tener una secuencia seleccionada para minimizar la interacción cebador-cebador, por ejemplo, siendo autocomplementaria para formar menos de 10, más preferentemente 3-7 y, lo más preferido, 5 pares de bases.

45 Las secuencias de la molécula de ácido nucleico de la etapa a) proceden, preferentemente, de un microorganismo tal como un virus, bacteria etc. Las secuencias de la molécula de ácido nucleico de la etapa a) pueden proceder, por ejemplo, del virus de la gripe y la secuencia de ácido nucleico diana de interés puede ser, por ejemplo, el sitio de escisión de la proteína precursora de la hemaglutinina. Este sitio de escisión corresponde a dos genotipos que representan patogenicidad elevada y patogenicidad baja de acuerdo con los criterios conocidos en la técnica. La patogenicidad se confiere al virus tras la escisión de dicho sitio de escisión.

50 Las secuencias de la molécula de ácido nucleico de la etapa a) que proceden de una especie bacteriana pueden incluir, además de ADN cromosómico, elementos móviles tales como plásmidos, transposones, casetes de resistencia y genes de virulencia, y el genotipado incluirá la determinación de la existencia y la naturaleza o de la no existencia de estos elementos, así como el genotipado de loci cromosómicos.

55 También se describe un procedimiento para producir cebadores de detección para usar en el procedimiento para genotipado o en el kit para realizar el procedimiento de genotipado. Este procedimiento comprende las etapas de sintetizar moléculas de ácidos nucleicos que tienen secuencias que corresponden a la parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial específica de genotipo de los cebadores de selección o corresponden a la secuencia no específica de genotipo común a cada cebador de detección y correspondiente a la secuencia no específica de la parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial de los cebadores de selección. Los cebadores de detección están marcados opcionalmente en el extremo 5' con un marcador o un resto químico seleccionado del grupo que

consiste en fluoróforos, marcadores luminiscentes, marcadores enzimáticos, cromóforos, radiomarcadores y un miembro de un par de unión, tal como biotina o estreptavidina. Ejemplos incluyen Biosearch Blue™, Acridina, Coumarina, FAM, Rodamina Verde, TET Cal Fluor® Gold 540, JOE, VIC, HEX, CAL Fluor Orange 560, Quasar® 570, TAMRA, Rodamina Roja, CAL Fluor 590, Cy3.5, ROX, CAL Fluor Red 610, CAL Fluor REd 635, Pulsar(R) 650, Quasar 670, y Quasar 705.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a cebadores de selección adaptados para el genotipado de loci en una molécula de ácido nucleico diana, en el que cada locus se localiza en una respectiva región marcadora del genotipo de la molécula de ácido nucleico y corresponde a dos o más genotipos. Los cebadores de selección comprenden en el extremo 3' una parte de la secuencia de reconocimiento del locus y en el extremo 5' una parte de la secuencia de marcaje específica de genotipo de una pieza artificial o una parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial, en la que una pieza es específica del genotipo y la otra no es específica del genotipo. Los cebadores de selección se eligen de los oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 1 a 55, o se eligen de los oligonucleótidos que comprenden las secuencias de la tabla 3 o la tabla 6. Se prefieren cebadores de selección que dan una temperatura de fusión promedio de aproximadamente 60°C.

También se describe un programa informático para diseñar cebadores de selección. El producto del programa informático comprende instrucciones legibles en ordenador que se pueden descargar directamente en la memoria interna de un ordenador. Estas instrucciones legibles se han adaptado para inducir al ordenador a diseñar los cebadores de selección de acuerdo con la invención.

Con los ejemplos siguientes se pretende ilustrar, pero no limitar, la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Expresión de ARN viral El ARN viral se extrajo de todos los aislados, a excepción del EU AI PCR Proficiency Panel 2008, usando el kit MagAttract Virus Mini M48 (Qiagen, Hilden, Alemania) en el robot de extracción Magnatrix 8000+ (NorDiag AB, Hägersten, Suecia) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usó un volumen de la muestra de 100 ml de cada aislado de virus y se eluyó en 70 µl de agua sin RNasa que contiene 0,04 % de azida sódica y se usó inmediatamente o, de otro modo, se almacenó a -70°C hasta su uso. El EU AI PCR Proficiency Panel 2008 se extrajo usando el kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras del Freidrich-Löffler-Institute (FLI) y del Epizone AI RNA Panel 2009 se obtuvieron como ARN extraído.

Transcripción inversa y preamplificación La transcripción inversa del ARN extraída y la preamplificación de ADN de todas las muestras de H5 y H7 utilizó los cebadores H5-kha-1/H5-kha-3 y GK7.3/GK7.4, respectivamente., como recomiendan los laboratorios de referencia de la UE⁷. Ambos sistemas de PCR se realizaron en volúmenes de reacción de 25 µl usando el kit OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Alemania) con los cebadores a concentraciones de 1 µM y añadiendo 2,5 µl del ARN viral extraído en cada reacción. Las condiciones de ciclado para el sistema H5-kha-1/H5-kha-3 PCR fueron: 30 minutos de transcripción inversa a 50 °C; 15 minutos de activación/desactivación enzimática a 96 °C; 40 ciclos de: 96 °C durante 10 s, 58 °C durante 30 s, 68 °C durante 30 s; y una etapa de extensión final a 68 °C durante 7 min. Las condiciones de ciclado para GK7.3/GK7.4 fueron: 30 minutos de transcripción inversa a 50 °C; 15 minutos de activación/desactivación enzimática a 95°C; 35 ciclos de: 94 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s, 72 °C durante 45 s; y una etapa de extensión final a 72 °C durante 4 min y 15 s. Todas las amplificaciones se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa usando E-gel al 2 % prevertido con bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se visualizaron con luz UV. Los tamaños previstos de los amplicones fueron 300-320 y 200-220 para las amplificaciones de H5 y H7, respectivamente. Un subconjunto de muestras se sometió a transcripción inversa y se preamplificó con reacciones de una etapa usando cebadores universales diseñados para amplificar todos los subtipos del VGA como se ha descrito previamente²⁰, con la excepción de que las secuencias sobresalientes en el extremo 5' de los cebadores inversos usados para la secuenciación en el estudio original se eliminaron.

Diseño del cebador Todas las secuencias génicas de la hemaglutinina H5 y H7 derivadas de aislados fuera de las Américas y disponibles en los recursos del virus de la gripe del NCBI²¹ se recolectaron en febrero de 2009 con un total de 2305 secuencias. Las secuencias se dividieron en cuatro conjuntos: H5N1; todos los demás H5; H7N1+H7N3+H7N7; todos los demás H7, que se alinearon por separado con Muscle 3.6²⁴ usando por parámetros por defecto. Debido al gran número de secuencias de H5N1, estas secuencias se dividieron en dos conjuntos que se alinearon por separado para reducir los requisitos de memoria. Estos dos conjuntos alineados se mezclaron después con la función de alineación de perfil de Muscle²⁴. Las alineaciones se recortaron a 35 unidades que finalizan en cuatro bases aguas abajo del codón de la glicina del sitio de escisión (R↓G) de HAO y las secuencias redundantes se eliminaron usando Jalview 2.42⁵. En base a estas secuencias se diseñaron los cebadores. Los cebadores se ajustaron manualmente hasta tener una temperatura de fusión cerca de 60 °C, como se calcula mediante el procedimiento de Rychlik et al.²⁶, eliminando las bases de los extremos 3' y 5' de las 35 unidades según se requiera, al tiempo que se intentó que los cebadores cubrieran al menos algunos de los nucleótidos de los codones R↓G. Este objetivo se consiguió en la mayoría de los casos. Después de estos ajustes se eliminó de nuevo la aparición de redundancia y, finalmente, quedaron 235 secuencias. Para reducir los requisitos de la síntesis, las

secuencias se agruparon manualmente en cebadores degenerados. La degeneración se limitó a 32 y no se realizaron ajustes de las concentraciones para los cebadores degenerados. Tras la introducción de degeneración, el número total de secuencias aumentó a 382 resultantes de 55 cebadores (SEC ID N° 1-55). Los cebadores dirigidos a los sitios de escisión de genotipo de alta (32 cebadores) y baja (23 cebadores) patogenicidad portaban CGGGAACTATCACCAACAACACCCCG y un saliente CGGGACAACAACCCTATCAACCCCG 5', respectivamente. Los cuatro pares de bases GC terminales en cada extremo de estos salientes son idénticos en las dos secuencias y son autocomplementarios, al tiempo que la porción interna restante difiere en una que es la secuencia inversa de la otra. Este grupo de 55 cebadores bipartitos parcialmente degenerados constituye el conjunto de cebadores de selección, que investigan la muestra para 382 secuencias del sitio de escisión distintas. Los cebadores Plexor[®] 17 para la detección de sitios de escisión de patogenicidad alta y baja tienen la misma secuencia que la parte sobresaliente de los cebadores de selección bipartitos correspondientes pero están marcados en el extremo 5' con FAM y CAL Orange-560, respectivamente. Los cebadores inversos usados en el ensayo de patotipado de dos niveles son comunes para ambos niveles e idénticos a los cebadores inversos de los sistemas de preamplificación usados. No obstante, aunque los sistemas de preamplificación son distintos para H5 (H5-kha-1/H5-kha-3) y H7 (GK7.3/GK7.4) los cebadores inversos se añaden conjuntamente en el ensayo de patotipado en una mezcla de una sola reacción.

Experimentos de PCR en tiempo real Todas las concentraciones de los cebadores de selección fueron 0,3 nM y concentraciones de cebadores de detección e inversos fueron 0,3 µM. Los cebadores de selección se obtuvieron desalados y disueltos en agua a 100µM de Sigma- Aldrich y se usaron sin purificación adicional. Los cebadores Plexor[®] se obtuvieron en Biosearch Technologies (Novato, CA) y los reactivos del sistema Plexor[®] qPCRde Promega (Madison, WI). Todos los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron en instrumentos RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Los canales de FAM y JOE se usaron para excitar y adquirir la señal de los cebadores marcados con FAM y CAL Orange-560, respectivamente. Usando las herramientas para análisis de software RotorGene 3000 convencionales, las señales en el canal JOE en bruto se normalizaron contra las señales del canal FAM en bruto y se realizó una corrección basal. La amplificación se consiguió mediante 30 ciclos de: 10 s a 95 °C, 15 s a 50 °C y 20 s a 72 °C, siguiendo un tiempo de retención inicial de 3 minutos a 95 °C.

Secuenciación de ADN Los productos de la PCR de la preamplificación se trataron con exonucleasa/fosfatasa alcalina de gamba (ExoSAP-IT) (USB Corporation, Staufen, Alemania) a 37 °C durante 15 minutos para degradar los cebadores y los nucleótidos restantes y antes de usar en la secuenciación del ciclo con el kit de secuenciación del ciclo Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los volúmenes de reacción fueron 5 µl con 7,5 pmol de cada cebador H5-kha-1/H5-kha-3 y GK7.3/GK7.4 para las muestras de los subtipos H5 y H7, respectivamente. Las condiciones del ciclado fueron: 25 ciclos de 96 °C durante 15 s, 50 °C durante 10 s y 60 °C durante 2 min. Los productos se purificaron usando el kit Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA) y después se analizaron en un secuenciador capilar ABI Prism 3130x1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos de la secuencia se analizaron y editaron con el paquete de software DNASTar (DNASTAR, Madison, WI)

Resultados

Con el objetivo para alcanzar una investigación altamente multiplexada de una muestra para la detección de distintas secuencias que entran dentro de dos categorías se concibió una construcción de ensayo de PCR semianidada a tres niveles (Fig. 4). El ensayo exhibe cuatro características destacadas. En primer lugar, una región genómica más grande que abarca la región en investigación se preamplifica mediante PCR. En consecuencia, el ensayo requiere que existan regiones cebadoras conservadas en cualquier sitio del segmento de la secuencia en investigación. Para el posterior ensayo de PCR para patotipado real, el gran incremento de la cantidad del molde mediante PCR, permite disminuir la concentración del cebador, que permitirá un grado elevado de multiplexación debido a que se suprimirán las interacciones entre cebadores. De hecho, en las condiciones del ensayo, la concentración del molde puede ser superior que la de los cebadores de reconocimiento de dianas y existe un acontecimiento de reconocimiento inverso. En contraste con la mayoría de los ensayos de PCR, los cebadores de reconocimiento de diana se unen directamente a la región de interés mediante el diseño, es decir al sitio de escisión, y "sonda" de la naturaleza de la región de unión. No obstante, la concentración baja de los cebadores de reconocimiento de la diana prohíbe la detección del producto de amplificación de estos cebadores directamente. Por esta razón, estos cebadores son bipartitos con una región en 5' que es independiente de la diana pero de dos tipos diferentes en función de la naturaleza de la parte de reconocimiento de la secuencia de los cebadores (en este caso, los sitios de escisión de patogenicidad alta o baja). Correspondiente a cada una de las porciones de la secuencia artificial de los cebadores bipartitos de reconocimiento de la diana, es decir que comparten la misma secuencia, es un cebador adicional que, en contraste con los cebadores bipartitos, está en una concentración elevada y también porta un marcador fluorescente. Por tanto, la segunda característica sobresaliente del ensayo es un sistema de PCR de dos niveles con cebadores de reconocimiento de la secuencia bipartitos, que tras el reconocimiento del ADN diana se extenderá y formará la diana para el segundo conjunto de cebadores artificiales independientes de la diana a concentración elevada. Los inventores destacan los cebadores de selección anteriores, ya que la diana seleccionará qué conjunto de cebadores están extendidos, y los cebadores de detección últimos. Obsérvese que los tres sistemas de PCR, el sistema de preamplificación y el sistema de patotipado de dos niveles usan el mismo cebador inverso y que, en total, junto con la PCR de preamplificación, existe un sistema de PCR de tres niveles.

Para reducir las autointeracciones y el cebado falso, se dio a los cebadores de detección y, por tanto, las regiones en 5' de los cebadores de selección una estructura de "trípode". Las extensas estructuras secundarias formadas dentro de los cebadores constituyen la tercera característica nueva del ensayo y está en gran contraste con el diseño convencional de cebadores, ya que se pueden formar estructuras tanto intramoleculares como intermoleculares. No obstante, todas estas estructuras sirven para la protección del extremo 3' y, en el caso de los cebadores de selección, constituyen una "carga de carga" que repelerá a los demás cebadores y minimizan las autointeracciones del cebador. Por último, la cuarta propiedad característica del ensayo se refiere a los medios de detección y análisis del producto de amplificación. El principio de detección depende de la amplificación preferente de uno de los conjuntos de productos de PCR que surgen de los cebadores de selección por encima del otro. Esto se evalúa marcando los dos cebadores de detección con un fluoróforo distinto (FAM y CAL orange-560 en el ensayo de patotipado) y midiendo la diferencia o la proporción de las señales en tiempo real. Dado que el ensayo no contiene sondas, se usó la tecnología de cebadores fluorogénicos Plexor® para la detección¹⁷. En contraste con la mayoría de las tecnologías de PCR en tiempo real, la fluorescencia disminuye tras la extensión de los cebadores en la tecnología Plexor®¹⁷. En el ensayo de patotipado del VGA, la señal del cebador de detección para patogenicidad baja se divide por la señal del cebador de detección para patogenicidad alta. En consecuencia, una muestra que contiene un virus de la gripe aviar que exhibe patogenicidad alta dará una señal positiva, mientras que los virus patogénicos bajos darán señales negativas.

En febrero de 2009, se recopilaron todas las secuencias de los sitios de escisión del hemisferio oriental (o, en su lugar, de todo el mundo a excepción de las Américas) disponibles en la base de datos del NCBI. Se encontró que 31 y 22 cebadores de selección degenerados que detectan sitios de escisión de patogenicidad alta y baja, respectivamente, podían representar todos los sitios de escisión existentes en la región geográfica a la que el estudio se había limitado. Este conjunto de 53 cebadores degenerados cubrió un total de 380 secuencias. Después, se añadieron dos cebadores más (véase más adelante). Todos los cebadores se diseñaron para, al menos en cierta medida, cubrir los codones R↓G con su extremo 3' y tienen una temperatura de fusión cercana a 60 °C. Los parámetros ajustables fueron la longitud de los cebadores y pequeños cambios con respecto al sitio de escisión. La temperatura de fusión promedio de los conjuntos de cebadores de alta y baja patogenicidad fueron 59,7 °C (SD = 1,7 °C; N = 152) y 60,1 °C (SD = 1,9°C; N = 230). La distribución de las temperaturas de fusión y las longitudes de los cebadores se proporcionan en la Figura 9. Las concentraciones de los cebadores de selección y de detección fueron 0,3 nM y 0,3 μM, respectivamente.

Para que la estrategia de patotipado ideada en la presente investigación sea compatible con los procedimientos actuales para el diagnóstico de la gripe aviar en la UE, los cebadores usados para la detección del VGA H5 y H7 y la secuenciación del sitio de escisión en los laboratorios de referencia central de la UE (LRC)^{7,18} se usaron para preamplificación. Aunque los cebadores de PCR para el LRC para la detección de los subtipos H5 y H7 son diferentes, se usó una única mezcla maestra para todas las reacciones de patotipado, ya que se añadieron en conjunto los cebadores inversos de los dos sistemas. El patotipo de todos los aislados investigados se determinó previamente mediante secuenciación de nucleótidos o se secuenció en el presente estudio (Tabla 1). En la Figura 5, las curvas de amplificación para aislados de patogenicidad alta y baja se muestran con líneas continuas y discontinuas, respectivamente. A partir de la Figura 5a, queda claro que los 23 aislados H5 se han patotipado correctamente con el presente ensayo, mientras que en la Figura 5b se ve que dos de los 19 aislados H7 se han patotipado incorrectamente como de patogenicidad alta (A/mallard/123455/08 (H7N7) y A/mallard/ 100993/08 (H7N7)). No obstante, estos recientes aislados con un nuevo sitio de escisión no se incluyeron en el diseño inicial del ensayo de patotipado. Los inventores mostrarán más adelante que un punto fuerte concreto de la estrategia del presente ensayo es una extensión simple y directa para explicar la aparición de nuevos aislados con sitios de escisión previamente inadvertidos. Para un reto adicional del ensayo de patotipado, se analizó el ensayo de anillo distribuido por el LRC durante 2008 (Fig. 6). Todos los resultados de patotipado obtenidos de las muestras del panel fueron consistentes con las secuencias de los sitios de escisión (Tabla 1 y Tabla 2). Obsérvese que el virus A/chicken/Italy/99 (H7N1) existe en una variante de patogenicidad alta y baja. Esto corresponde a una conversión de patogenicidad de este virus mediante mutaciones en la región del sitio de escisión¹⁹.

Los genomas del virus de la gripe aviar son extremadamente variables, en particular, los genes expuestos en la superficie, por ejemplo el gen de la hemaglutinina, que explica en gran medida la patogenicidad. Por esta razón, es importante que un procedimiento para la determinación de la patogenicidad es capaz de, de un modo sencillo, representar nuevas variantes de virus emergentes. Para la determinación de la patogenicidad del VGA no ha existido dicho procedimiento y la práctica diagnóstica se ha conformado con la secuenciación de ADN. En la Figura 7, cuatro aislados diferentes, incluidos A/mallard/123455/08 (H7N7) y A/mallard/100993/08 (H7N7) patotipados incorrectamente en la Figura 5, se muestran amplificados con el conjunto original de los cebadores de selección y un conjunto ampliado que incluye un cebador de selección responsable del sitio de escisión nuevo portado por los aislados a2008 H7N7 (curvas con cruces). Se puede ver que los dos aislados H7N7 (gris, curvas con flechas) se ven afectados de forma selectiva por los nuevos cebadores y pasan de la señal positiva (patogenicidad alta) a la señal negativa (patogenicidad baja), mientras que los otros dos aislados permanecen prácticamente sin afectar por los cebadores añadidos. Por tanto, el ensayo puede extenderse muy fácilmente simplemente añadiendo nuevos cebadores de selección según se requiera.

El ensayo de patotipado depende del éxito de la preamplificación. No obstante, recientemente se ha notificado²⁰ que los cebadores recomendados por el LRC⁷ eran incapaces de amplificar, por ejemplo, A/duck/Alberta/48/76 (H7N3) y

los inventores observaron que estos cebadores también eran incapaces de amplificar A/equine/Prague/1/56 (H7N7). Gall et al. diseñaron nuevos cebadores (pan-HA) para proporcionar una amplificación universal para el patotipado posterior mediante secuenciación²⁰. Una ilustración adicional de la flexibilidad de la construcción del presente ensayo se proporciona en la Figura 8, en la que, en lugar de usar los cebadores del LRC, han llevado a cabo la preamplificación con los cebadores de pan-HA y, después, en consecuencia, también usaron los cebadores inversos pan-HA como cebadores inversos en la reacción de patotipado, pero, por otro lado, todos los componentes del patotipado permanecen intactos. En la Figura 8 se ve que todos los aislados están patotipados correctamente, incluyendo los aislados A/duck/Alberta/48/76 (H7N3) y A/equine/Prague/1/56 (H7N7). La señal de A/duck/Alberta/48/76 (H7N3) aparece bastante débil, ya que la equivalencia más cercana entre los cebadores de selección contiene tres emparejamientos erróneos. Dado que A/duck/Alberta/48/76 (H7N3) es un aislado de Norteamérica, la secuencia no se tuvo específicamente en cuenta en el diseño de los cebadores de selección.

Ejemplo 2 Conjunto extendido de cebadores del VGA que cubren todos los aislados del mundo

Expresión de ARN viral El ARN viral se obtuvo extraído del National Veterinary Service Laboratory en Ames, Iowa, EE.UU.

Transcripción inversa y preamplificación La transcripción inversa del ARN extraído y la preamplificación del ADN de las muestras de H5 americanas usó el cebador directo prfH5WH y el cebador inverso prrH5WH, respectivamente (Tabla 4). Los sistemas de PCR se realizaron en volúmenes de reacción de 25 µl usando el kit OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Alemania) con los cebadores a concentraciones de 1 µM y añadiendo 2,5 µl del ARN viral extraído en cada reacción. Las condiciones del ciclado fueron: 30 minutos de transcripción inversa a 50 °C; 15 minutos de activación/desactivación enzimática a 96°C; 40 ciclos de: 96°C durante 10 s, 58°C durante 30 s, 68°C durante 30 s; y una etapa de extensión final a 68°C durante 7 min y 15 s. Todas las amplificaciones se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa usando E-gel al 2 % prevertido con bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se visualizaron con luz UV. Los tamaños previstos de los amplicones fueron 300-320.

Diseño del cebador Los cebadores se diseñaron como se ha descrito anteriormente. El conjunto de cebadores de selección se extendió para incluir también sitios de escisión de aislados del hemisferio oriental (todos los sitios de escisión de todo el mundo hallados en la base de datos del NCBI a finales de diciembre de 2009). El número de cebadores de selección degenerados fue 80 (Tabla 3) hasta un total de 468 cebadores únicos. Los cebadores de detección fueron los mismos usados en el conjunto de cebadores original (véase anteriormente) y los cebadores inversos fueron prrH5EH, prrH5WH prrH7EH y prrH7WH. (Tabla 4)

Experimentos de PCR en tiempo real Todas las concentraciones de los cebadores de selección fueron 0,3 nM y concentraciones de cebadores de detección e inversos fueron 0,25 µM. Los cebadores de selección se obtuvieron desalados y disueltos en agua a 100µM de Sigma- Aldrich y se usaron sin purificación adicional. Los cebadores Plexor[®] se obtuvieron en Biosearch Technologies (Novato, CA) y los react'ivos del sistema Plexor[®] qPCR de Promega (Madison, WI). Todos los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron en instrumentos RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Los canales de FAM y JOE se usaron para excitar y adquirir la señal de los cebadores marcados con FAM y CAL Orange-560, respectivamente. Usando las herramientas de análisis de software estándar RotorGene 3000, las señales del canal JOE en bruto se dividieron mediante las correspondientes señales de los canales FAM en bruto y las señales resultantes se corrigieron basalmente mediante resta del valor promedio de los primeros cinco ciclos de PCR de todos los valores de la diferencia en la fluorescencia. La amplificación se consiguió mediante 30 ciclos de: 10 s a 95 °C, 15 s a 52°C y 20 s a 72 °C, siguiendo un tiempo de retención inicial de 3 minutos a 95 °C.

Resultados

A partir de la Figura 10 se puede ver que los aislados H7 (líneas finas en la Figura 10) no dieron señales significativas y se comportaron como el control negativo (línea fina con cruz). Los aislados H5 americanos altamente patogénicos (líneas gruesas; continuas) y un aislado de patogenicidad baja con un sitio de escisión que significa aislados altamente patogénicos (línea gruesa; discontinua larga) fueron señales positivas en F(JOE)/F(FAM), mientras que los aislados H5 americanos de patogenicidad baja dieron señales negativas (línea gruesa; corta discontinua).

Ejemplo 3 Patotipado del VNC

50 Extracción de ARN y preamplificación

El ARN se extrajo de los fluidos alantoideos de huevos embrionados infectados por el VNC usando el kit MagAttract Virus Mini M48 (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante con el robot de extracción Magnatrix 8000 (Magnetic Biosolutions, Suecia). El ARN se recuperó en 70 µl de agua sin nucleasa y se usó inmediatamente o se almacenó a 80 °C.

55 Se usó el kit OneStep RT-PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) para la transcripción del ARN y la preamplificación para todas las cepas del VNC usando los cebadores de secuenciación NDV P1F y P2R (Tabla 7). La RT-PCR se realizó en un volumen de reacción de 25 µl que contiene 0,6 µM de cada cebador y 2,5 µl del ARN extraído. El perfil de

ciclado fue 60 °C, 30 min; 95 °C, 15 min; y 40 ciclos de (94 °C, 20s; 60 °C, 15 s; 72 °C, 15 s) y una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos de la PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % tras tinción con bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se visualizaron con luz UV. El tamaño previsto del producto amplificado fue de 362 pb.

5 Diseño del cebador

La búsqueda en NCBI de secuencias nucleótidos de los genes de fusión del VNC (F) de marzo de 2010 dio un resultado de 2757 secuencias usando un programa informático bCLC Main Workbench 5 (CLC bio A/S, Aarhus, Dinamarca). Debido al elevado número de secuencias del VNC, se dividieron en 5 grupos de acuerdo con los años de registro en el NCBI GenBank, las secuencias se alinearon por separado mediante el CLC Main Workbench 5. El tamaño de las secuencias se redujo a 30 unidades que cubren el sitio de escisión del gen F que incluye el residuo 117 del extremo N de la proteína F1 que es fenilalanina (F) como marcador de virulencia para las cepas mesogénicas y velogénicas (R▼F) y leucina (L) como marcador de virulencia baja para las cepas lenogénicas (R▼L). Las secuencias redundantes se eliminaron usando Jalview 2.6. Permanecieron 251 sitios de escisión únicos. Representados por 68 cebadores (Tabla 6). Los cebadores Plexor® 17 para la detección de sitios de escisión de patogenicidad alta y baja tienen la misma secuencia que la parte sobresaliente de los cebadores de selección bipartitos correspondientes pero están marcados en el extremo 5' con FAM y CAL Orange-560, respectivamente. Los cebadores inversos usados en el ensayo de patotipado de dos niveles son el mismo cebador inverso de los sistemas de preamplificación usados.

Experimentos de PCR en tiempo real

Los cebadores de selección se obtuvieron desalados y disueltos en agua a 100mM (Sigma-Aldrich, Haverhill, Reino Unido). Todas las concentraciones de los cebadores de selección fueron 0,3 nM y concentraciones de cebadores de detección e inversos fueron 0,3 µM. Los cebadores Plexor® se obtuvieron en Biosearch Technologies (Novato, CA) y los reactivos del sistema Plexor® qPCR de Promega (Madison, WI). Todos los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron en instrumentos RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Los canales de FAM y JOE se usaron para excitar y adquirir la señal de los cebadores marcados con FAM y CAL Orange-560, respectivamente. La amplificación se consiguió mediante 30 ciclos de: 10 s a 95 °C, 15 s a 55°C y 20 s a 72 °C, siguiendo un tiempo de retención inicial de 3 minutos a 95 °C en un volumen de reacción de 25 µl.

Secuenciación de ADN

Muchas muestras que se han usado en el patotipado carecen de identidad, por esta razón se secuenciaron los productos de PCR de la preamplificación. Se usó el kit de secuenciación Big Dye Terminator v3.1 cycle (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los volúmenes de reacción fueron de 20 µl con 1,8 µl de la gran mezcla de pigmentos y 2 µl del producto de PCR. Las condiciones del ciclo fueron: 25 ciclos de 96 °C durante 15 s, 50 °C durante 10 s y 60 °C durante 2 min. Los productos se purificaron usando el kit Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA) y después se analizaron en un secuenciador capilar ABI Prism 3130x1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos de la secuencia se analizaron mediante CLC Main Workbench 5.

Resultados

En la figura 11 se muestran las curvas de amplificación como la proporción normalizada de la señal de fluorescencia en dos canales ('JOE'/FAM') obtenidas con cebadores de detección Plexor® para el patotipado del virus de la enfermedad de Newcastle (VNC). Las cepas mesogénicas (discontinua larga) y velogénicas (línea continua) se consideran altamente patogénicas y los aislados lentogénicos (discontinua corta) son poco patogénicos. Los experimentos para patotipado de los aislados indicados en la figura se realizaron usando el conjunto de cebadores de selección 252. La patogenicidad de 25 aislados se conocía anteriormente en la literatura, los sitios de escisión de los otros 5 aislados (SD2C2, SA1C, LK2p, WARW y MX4) se secuenciaron. El ensayo se construye para dar una señal positiva para patogenicidad alta y una señal negativa para patogenicidad baja. Los 30 aislados se patotiparon correctamente.

Tabla 1 Sitios de escisión de los aislados del VGA H5

Nombre	Secuencia del sitio de escisión ^a	ST ^b	PT ^b	Origen
A/pavo/Inglaterra/250/07	agccctcaaggagagagaagaagaaaaagaga ↓gga	H5N1	PA	VLA ^c
A/pavo/Pavo/1/05	agccctcaaggagagagaagaagaaaaagaga ↓gga	H5N1	PA	VLA
A/ánade real/Italia/3401/05	ggactcaggaatgttctcaaagagaacaaga ↓ggg	H5N1	PB	VLA
A/búho real/Suecia/V618/06	agccctcaaggagagagaagaagaaaaagaga ↓gga	H5N1	PA	SVA ^c
A/Cygnus cygnus/Alemania/R65/06	agccctcaaggagagagaagaagaaaaagaga ↓gga	H5N1	PA	FLI ^c
A/gato/Alemania/R606/06	agccctcaaggagagagaagaagaaaaagaga ↓gga	H5N1	PA	FLI
A/pollo/Indonesia/R 134/03	agccctcaagagagagaagaagaaaaagaga ↓gga	H5N1	PA	FLI
A/cerceta/Alemania/Wv632/05	ggaccaggaatgtcctcaaaaagaacaaga ↓gga	H5N1	PB	FLI

ES 2 541 710 T3

A/pato/Vietnam/TG24-01/05	aatagccctcaaagagagagaagaaaaagaga↓gga	H5N1	PA	FLI
A/pato/Vietnam/AG40-02/05	aatagccctcaaagagagagaagaaaaagaga↓gga	H5N1	PA	FLI
A/pollo/Vietnam/P78/05	aatagccctcaaagagagagaagaagaagaga↓gga	H5N1	PA	FLI
A/avestruz/Dinamarca/72420/96	Desconocido	H5N2	PB	SVA
A/pollo/Italia/Matrico/L7/04/97	ggactcaggaatgtccctcagagagagacgaga↓gga	H5N2	PB	IZS-Ve ^c
A/ánade real/Dinamarca/53-130/06 ^d	Desconocido	H5N2	PB	VLA
A/pollo/Italia/8/98	aggaatgtccctcaaagaagaagaaaaaaga↓gga	H5N2	PA	FLI
A/ánade real/Alemania/Wv1310-13K/03	cagagagaacaaga↓gga ^d	H5N2	PB	FLI
A/cerceta/Alemania/Wv1378-79K/03	Desconocido	H5N2	PB	FLI
A/cerceta/Inglaterra/7394-2805/06	Desconocido	H5N3	PB	SVA
A/ánade real/Suecia/S90-436/05	Desconocido	H5N3	PB	SVA
A/ánade real/Suecia/1174/05	ggactcaggaatgtccctcagagagagacgaga↓gga	H5N3	PB	SVA
A/ánade real/Alemania/r2557/06 ^e	Desconocido	H5N3	PB	VLA
A/pato/Potsdam/2216/84	ggccttaggaatgtccctcaaagagagacaaga↓ggt	H5N6	PB	FLI
A/pato/Dinamarca/64650/03	ggactcaggaatgtccctcaaagaacaaga↓gga	H5N7	PB	SVA
Prueba del anillo de la UE de 2008 ^f				
A/cerceta/Inglaterra/06	ggactcaggaatgtccctcaaagaacaaga↓gga	H5N3	PB	VLA
A/pavo/Inglaterra/2614/07	agccctcaagggagagaagaagaaaaagaga↓gga	H5N1	PA	VLA
A/Q-meesia/Inglaterra/05	aatagtcctcaaagagaagaagaagaaaaaga↓gga	H5N1	PA	VLA

^aDel NCBI. ^bST, subtipo; PT, patotipo. ^cVLA, Veterinary Laboratory Agency, Reino Unido; SVA, National Veterinary Institute, Suecia; FLI, Freidrich-Löffler Institute, Alemania; IZS-Ve, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venecia, Italia. ^dDe Fereidouni, S. R. et al. J. Virol. Methods 154, 14-19 (2008). ^eDel 2009 AIV Epizone panel. ^fSecuenciado en SVA, Suecia.

5

Tabla 2 | Sitios de escisión de los aislados del VGA H7 investigados

Nombre	Secuencia del sitio de escisión ^a	ST ^b	PT ^b	Origen
A/african estornino/Inglaterra/983/79	atgaagaacgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N1	PB	VLA ^c
A/pavo/Italia/Matrico/L5/04/95	atgaagaatgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N1	PB	IZS-Ve ^c
A/loro/Irlanda del Norte/VF-73-67/73	atgaagaacgttctcgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N1	PB	AHS ^c
A/avestruz/Italia/984/00 ^d	cccgaattccaaaggatcgcgtgtgaggaga↓ggc	H7N1	PA	VLA
A/pollo/Brescia/19/02	gttcccgaactcccaaaaaagaagaaaaaga↓ggc	H7N1	PA	FLI ^c
A/FPV/Rostock/45/34	gttcccgaactcccaaaaaaggaaaaaaga↓ggc	H7N1	PA	FLI
A/pollo/Inglaterra/1306/07 ^d	atgaagaatgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N2	PB	VLA
A/pollo/Inglaterra/4054/06	atgaagaatgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N3	PB	VLA
A/ánade real/Föhr/Wv190/05 (H7N3)	Desconocido	H7N3	PB	FLI
A/pato/Alberta/48/76 (H7N3)	atgagaaatgtcccagaaaatccaaagaccaga↓gga	H7N3	PB	FLI
A/pavo/Inglaterra/647/77	atgaagaacgttctcgaattccaaagggaga↓ggc	H7N7	PB	VLA
A/ánade real/Suecia/S90-514/05	atgaagaatgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N7	PB	SVA ^c
A/ánade real/Suecia/S90-599/05	atgaagaatgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N7	PB	SVA
A/ánade real/Suecia/S90-735/03	atgaagaatgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N7	PB	SVA
A/ánade real/Suecia/123455/08	Desconocido	H7N7	PB	SVA
A/ánade real/Suecia/10093/08	atgaagaatgttctcgaattccaaagaaaaga↓ggc	H7N7	PB	SVA
A/pato/Potsdam/13/80	Desconocido	H7N7	PB	FLI
A/FPV/holandés/27	gttcccgaactcccaaaaaagaagaaaaaga↓ggc	H7N7	PA	FLI
A/pollo/Taucha/79	Desconocido	H7N7	PA	FLI

A/equino/Praga/1/56 Prueba del anillo de la UE de 2008 ^e	aaacaactaactcatcatgegcaaaaaaaga↓ggt	H7N7	PA	FLI
A/pollo/Pakistán/03	aacgttctgaaactccaaaaagaagaaaaaga↓ggc	H7N3	PA	VLA
A/pollo/Italia/99 (H7N1)	atgaagaatgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N1	PB	VLA
A/pollo/Inglaterra/07 (H7N2)	atgaagaatgttcccgaattccaaaggaaga↓ggc	H7N2	PB	VLA
A/pollo/Italia/99 (H7N1)	cccgaattccaaaggatcgctgtgaggaga↓ggc	H7N1	PA	VLA

^aDel NCBI. ^bST, subtipo; PT, patotipo. ^cVLA, Veterinary Laboratory Agency, Reino Unido; SVA, National Veterinary Institute, Suecia; FLI, Freidrich-Löffler Institute, Alemania; IZS-Ve, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie, Italia; ^ddel 2009 AIV Epizone panel. ^eSecuenciado en SVA, Suecia.

5 Tabla 3: Cebadores de selección del virus de la gripe aviar

Designación	Secuencia
fdHP01	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCAAGGAGARAGAARAAGAAAAAGAG
fsHP02	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAGGGGAGAGAAGAAGAAAAAGAG
fsHP03	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCCCTCAAAGAAAAAGAAAAACAAGAG
fsHP28	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCAAAGAGARAGAAGAARRAAAGARG
fsHP29	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAGAGARAGAAGAARRAAGCGARG
fsHP06	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGTCCCTCAAAGGAAGAAAAAGAG
fsHP30	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAGAKARAAGAAGAAAAAGMGAGG
fsHP31	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAGAKARAAGAAGAAAAAGAGRGG
fsHP32	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRGAGAKARAAGAAGAAARAARAGAGG
fsHP33	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRGAGAKARAAGAAGAAAAARGARAGG
fsHP37	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGG
fsHP38	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCCCTCAAAGAAGAAAAAAAGAGG
fsHP08	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCTCAAAGAARAAGAAAAAARAGAGG
fsHP09	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGATCGCGTGTGAGGAG
fdHP10	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCAAAAAAAGGAAAAAAGAGG
fsHP11	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGATCGCGSGTGAGGAG
fdHP13	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCAAAAGAGGAGGAGGAGAGG
fsHP14	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCAAAAAAGAGGAAAAAGAGAGG
fsHP15	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGTTCCAAAAAGGAAAAAGAGAGG
fsHP34	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAACTCCAAAAAGAAGAARMAGAGG
fdHP17	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAGG
fsHP35	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCCAAAAAAGAAGAAARAGAGG
fdHP19	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAAATTCCAAAAAGAAAAAGAGAGG
fsHP21	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGAGAGGGAGGAAGAAGAAAAAGAGG
fsHP22	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAAGAGAGAGAAGGAAAAAGAGAGG
fsHP23	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAGGCC
fsHP26	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCCCGAGAARGAGAAGAGAGG
fsHP39	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGTTCCAAAAAGAGAACAAGAGAGG
fsHP40	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAATCCCAAAGAGAAGAAAAAGAGG
fsHP41	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCCRAAGAAGAGAGAGAAGAGAG
fsHP42	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGCGCAGGCAGAAAAGAGG
fsHP43	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGACATGCGCAAAAAAGAGG
fsHP44	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGTTCCCAAAGAGAAGAAAAAGAGG
fsHP45	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCCCAAAGGAAAAAAGAGG
fsHP46	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGRRGAAGAAGRAGAAAAAGAGG
fsHP47	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGCCCGACCCAGAAGAGG
fsHP48	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGCCCGAGAAGAAAAAGAGAGG
fsHP49	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGTGCMTCAGARGAARAAGAGAGG
fsHP50	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGTACCCCAAAGGAAAAAAGAGG
fsHP51	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGAAAAAGAAAAAGAAAAACAAGAGG
fsHP52	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGMAKAAACGGATGACCAGAGG
fsHP53	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAAACGRATGACCAGAGG
fsHP54	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGTGCAGARAAAACAGAGG
fsHP55	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAATTCCAAAAAGAAGAAGGGG
fsLP14	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGATYCCTCARARAGRAACAARAGG
fsLP18	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGTYCCTCARARAGRAACAARAGG
fsLP19	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGTYCCTCARARAGAGACAARAGG

	fsLP21	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGGTYCCTCARARAGRTACAARAGG
	fsLP26	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCCCTCAGAGAGAGACGAGAGG
	fsLP02	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCCCTCAACGAGAAACAAGAGG
5	fsLP03	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGYCCTCAAARGGAGACAAGAGG
	fsLP22	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCCTGAAAYTCCAAAAGRAAGG
	fsLP23	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCCTGAAAYTCCAAAAGGAAAAGG
	fsLP05	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGYGAATTCCAAARGGAAGAGG
	fsLP07	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGGAARTYCCAAARGGRAGAG
10	fsLP08	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGGAAAYCCCAAAGGAAAGAGG
	fsLP10	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCYGAARTCCRAAKGGAAR
	fsLP24	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCCTGARAYTCCAAAAGGRAGAG
	fsLP25	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCTGARAYTCCAAAAGGRAGAG
	fsLP12	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCTGAAATTCAAAAGGAAAGAGG
15	fsLP13	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAATGTTCCTCAAAGACACAAGAGG
	fsLP27	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGTTCTCAAAGACACAAGAGG
	fsLP29	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGTCTCAAAGGGAACAAGAGG
	fsLP30	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGTGGAGTCCCAAGAAAAGAGG
	fsLP31	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCGGAAATCCRAAGAMKAGAGG
20	fsLP32	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCTGAAATCCCAAAGAAAAGAGG
	fsLP33	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAGAGAACCCAAAGACCAGAGG
	fsLP34	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGTACCAGAAACAGATGACCAGAGG
	fsLP35	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCAGAGAAWCCAAAGACCAGAGG
	fsLP36	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAGAGAAWCCMAAGACCAGRGG
25	fsLP37	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGGARARCCMAARACCAGAGG
	fsLP38	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCAGAAAATCCAAAACCAGAGG
	fsLP39	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGARAAWCCAAAGCCCAGAGG
	fsLP40	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAGAGAAACCAAARCCMAGAGG
	fsLP41	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAGAAAACCAAAGACAAGGGG
30	fsLP42	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCCAGAAAACCAAAGACAAGAGG
	fsLP43	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCAGAGAAATCCAAAGACTAGGGG
	fsLP44	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCCCARARAGRAACAARAGG
	fsLP45	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCCCARARAGRAACAARAGG
	fsLP46	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGTACCCCAAAGAAAACAAGAGG

Tabla 4: Cebadores de preamplificación del virus de la gripe aviar (específicos de H5 y H7)

35	Designación	Secuencia
	prfH5EH	RAAYTTYATTGCTCCAGAAWATGCATAC
	prH5EH/H5-kha-3	TACCAACCGTCTACCATKCCYTG
	prfH5WH	TTTATAGCTCCYGAATATGCRACAA
	prH5WH	TACCAYCRTCHACCATTCCTT
40	prfH7EH	ATGYCCGAGATATGTWAARCA
	prH7EH	TTTGTAACTGCHGCAGTYC
	GK7.4	TTTGTAACTGCAGCAGTTC
	prfH7WH.1	GCCCTCGRTATGTCARACA
	prfH7WH.2	CCCTCGRTATGTCARGCA
45	prH7WH	TTTGTARTCAGCTGCAGTYC

Sistema de designación: pr=preamplificación; f= directo; r= inverso; H5/H7= especificidad;

EH=Hemisferio oriental; WH= hemisferio occidental

GK7.4 es una alternativa a prH7EH

Tabla 5: Cebadores de detección del virus de la gripe aviar

50	Designación	Secuencia
	fdPA	Fam-isoC-CGGGA ACTATCACCAAACAACACCCCG
	fdPB	CAL orange 560-isoC-CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCG

Tabla 6: Cebadores de selección para el virus de la enfermedad de Newcastle

Nombre del cebador para cepas del VNC mesogénicas y velogénicas

55	Designación	Secuencia
	FSM04.5	CGGGA ACTATCACCAAACAACACCCCGGAAAGGAGACAGAAACGCTTTATA
	FSM04.16	CGGGA ACTATCACCAAACAACACCCCGGAAAGGAGGCAGAGACGCTTTATA

	FSV01	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAGGAGACAGAAACGCTTCGTA
	FSV02.3	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAGAAGACGGAAACGCTTTATA
	FSV02.8	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAGGAGACGGAAACGCTTTATA
	FSV03.2	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAGGAGACAGAGACGCTTTGTA
5	FSV04.5	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAGGAGACGAAAACGCTTTATA
	FSV05.5	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGGAGGAGACAGAAACGATTTATA

Nombre del cebador para cepas del VNC mesogénicas y velogénicas

	Designación	Secuencia
	FSV05.6	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGGAGGAGACAGAAACGCTTTATA
10	FSV05.8	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGGAGGAGACAGAGACGCTTTATA
	FSV06.4	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGAAAGAGACAGAGACGTTTTATA
	FSSV01	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAACGGCAGAAGCGTTTTGTA
	FSSV02	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGTAAGGAGGAAAAAGCGCTTTATA
	FSM01D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGGAGGCARAAACGYTTYATA
15	FSM02.1D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGATGGAGGMAGAARCGCTTTATA
	FSM02.2D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRRGGAGGCAGAAACGCTTYATA
	FSM04.3D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAAAAGAGGCARAAACGSTTYATA
	FSM04.7D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAAAGGAGGCAGAAACGSTTTATA
	FSM04.11D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGAAAGAGGCAGAARCGSTTTATA
20	FSM04.151D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGAAGGAGGCAGAARCGCTTYRTA
	FSM04.15 2D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGAAGGAGGMARAARCGCTTTATA
	FSV02.2D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRAGAAGRCAGAAGCGCTTTATA
	FSV02.6D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAGGAGACARAAGCGCTTTATA
25	FSV03.1D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAAGGAGACAGAARCGCTTTGTA
	FSV04.1.1D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGARGRAGRCAAAAACGCTTTATA
	FSV04.1.2D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRAGGAGACAAAARCGCTTTATA
	FSV04.2D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAAGRAGACAAAACGCTTYDTA
	FSV05.3D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGAAGGAGACAGARCGATTTATA
30	FSV06.1D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGRAAGAGACAGAARCGCTTTATA
	FSV06.5.1D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRGAAGGAGACAGAAACGCTTKATA
	FSV06.5.2D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGAVGGAGACAGAARCGCTTTATA
	FSV06.61D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGAMGGAGRCAGAARCGTTTTATA
	FSV06.6 2D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGAAGGAGAMARAACGTTTTRTA
	FSV06.63D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRGAAGGAGACAGAAACGTTTTYATW
35	FSV06.7D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGAAGGAGACARAGACGCTTYRTA
	FSV06.81D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRRGRAGGAGACAGAGACGTTTTATA
	FSV06.82D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGAAGGAGACAGRRCGTTTTATA
	FSV06.8 3D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGAAGGAGACAGAGACGYTYTTRTA
40	FSSV03D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAGGAAGGAGAAAAAACGHHTTTATA
	OFSM03	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGAGGAGACAGAAACGCTTTATA
	OFSM04D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGRAARGAGRCAGARACGCTTTATA
	OFSV02D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGAGRAGACRGAARCGCTTTATA
	OFSV03D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGRAGGAGACGARACGCTTTGTA
	OFSV04D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAAGGAGACRRAACGCTTTWTA
45	OFSV05D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGGGRAGGAGACGARACGMTTTTATA
	OFSV06D	CGGGAAGTATCACCAAACAACACCCCGAGGAARGAGACAGARACGYTTTTATA

Nombre del cebador para cepas del VNC lentogénicas

	FSL01.3	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGGAAACAGGGGCGCCTCATA
	FSL01.4	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGGAAACAGGGGCGCCTTATA
50	FSL01.8.1D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGGAVRCAGGGGCGCCTTATA
	FSL01.8.2D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGGAGACAGGSGCGYCTTWTA
	FSL02.1D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGGAAACARGGACGCCTTATA
	FSL02.2D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGGAAARCAGGGACGCSTKATA
	FSL03.1D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGAGRGARRCAGGACGCCTTATA
55	FSL03.2 D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGRGGAAACAGGRACGTCTTATA
	FSL03.3 D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGAGGGAAACAGGGRCGTCTTMTA
	FSSL01D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGGGCAGGRGCGTTTTGTA
	FSSL02D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGAGAACGACAGGARCGTTTTGKTA
	FSSL03D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGGGCAGGAGCGTCTGGTR
60	FSSL04D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGAACGKCAGGAGCGYTTGGTA
	FSSL05D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGCGGCARGAGCGTTTTGTA
	FSSL06D	CGGGACAACAACCCTATCAACCCCGAGWACGTCARGAGCGTTTTGGTA

	FSSL07D	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGACGRCAGGAGCGKTTGGTA
	FSSL08D	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAACRGCAGGAGCGGTTGRTA
	FSSL09	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAGCAGGGGCGTTTGGTA
5	FSSL010D	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAACRGCAGGAGCGDTTGATA
	FSSL011	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCGGCAGGATCGTTTGGTA
	FSSL012	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGCAGACAAGCACGCCTGATA
	FSSL013	CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCGAGCAGGGGCGGTTGATA

Tabla 7: Cebadores de preamplificación para el virus de la enfermedad de Newcastle

	Designación	Secuencia
10	P1F	TTGATGGCAGGCCTCTTGC
	P2R	GGAGGATGTTGGCAGCATT

Tabla 8: Cebadores de detección para el virus de la enfermedad de Newcastle

	Designación	Secuencia
	fdHP	Fam-isoC-CGGGA ACTATCACCAAACAACACCCCG
15	fdLP	CAL orange 560-isoC-CGGGACAACAAACCACTATCAACCCCG

Referencias

- Steinhauer, D. A. Papel de la escisión de la hemaglutinina en la patogenicidad del virus de la gripe. *Virology* 258, 1-20 (1999).
- Klenk, H.-D. y Garten, W. Activación de la escisión de las proteínas spike virales por las proteasas de los huéspedes en los receptores celulares de virus animales (ed., Wimmer, E.) pp. 241-280. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y., 1994).
- Gall, A. et al. Diseño y validación de una micromatriz para la detección, subtipado de hemaglutinina y patotipado de virus de la gripe aviar. *J. Clin. Microbiol.* 47, 327-334 (2009).
- Heine, H. G., Trinidad, L., Selleck, P. y Lowther, S. Detección rápida del virus de la gripe aviar H5N1 altamente patogénico mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa TaqMan. *Avian Dis.* 51, 370-372 (2007).
- Hoffmann, B. et al. Patotipado rápido y altamente sensible del virus A de la gripe aviar H5N1 usando PCR con transcripción inversa en tiempo real. *J. Clin. Microbiol.* 45, 600-603 (2007).
- Yacoub, A. et al. Subtipado y patotipado rápidos de virus de la gripe aviar. *J. Virol. Methods* 156, 157-161 (2009).
- Slomka, M. J. et al. Identificación de métodos de reacción en cadena de la polimerasa específicos y sensibles para la gripe aviar mediante ensayos de anillo enmascarados organizados en la Unión Europea. *Avian Dis.* 51, 227-234 (2007).
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. y Caskey, C. T. Cribado por delección del locus de la distrofia muscular de Duchenne mediante amplificación multiplex del ADN. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141-11156 (1988).
- Brownie, J. et al. Eliminación de la acumulación cebador-dímero en la PCR. *Nucleic Acids Res.* 25, 3235-3241 (1997).
- Broude, N. E., Zhang, L., Woodward, K., Englert, D. y Cantor, C. R. Amplificación multiplex de la diana específica de alelo en base a la supresión en PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98, 206-211 (2001).
- Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. y Lukyanov, S. A. Método de PCR mejorado para caminar en el ADN genómico sin clonar. *Nucleic Acids Res.* 23, 1087-1088 (1995).
- Pemov, A., Modi, H., Chandler, D. P. y Bavykin, S. Análisis de ADN con PCR potenciada con micromatriz multiplex. *Nucleic Acids Res.* 33, e11 (2005).
- Han, J. et al. Amplificación e identificación simultáneas de 25 tipos de virus del papiloma humano con tecnología Templex. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4157-4162 (2006).

14. Varley, K. E. y Mitra, R. D. PCR de recorrido anidada permite el descubrimiento de mutaciones altamente multiplexadas en genes candidatos. *Genome Res.* 18, 1844-1850 (2008).
15. Schouten, J. P. et al. Cuantificación relativa de 40 secuencias de ácido nucleico mediante amplificación con sonda dependiente de unión multiplex. *Nucleic Acids Res.* 30, e57 (2002).
- 5 16. Hardenbol, P. et al. Genotipado multiplexado con sondas de inversión molecular marcadas de secuencia. *Nat. Biotechnol.* 21, 673-678 (2003).
17. Sherrill, C. B. et al. Análisis de ácido nucleico usando un alfabeto genético expandido para inactivar la fluorescencia. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 4550-4556 (2004).
- 10 18. Belák, S., Kiss, I. y Viljoen, G. J. Nuevos desarrollos en el diagnóstico de la gripe aviar. *Rev. Sci. Tech.* 28, 233-243 (2009).
19. Zanella, A., Dall'Ara, P. y Martino, P. A. Epidemia de gripe aviar en Italia causada por la serovariedad H7N1. *Avian Dis.* 45, 257-261 (2001).
- 15 20. Gall, A., Hoffmann, B., Harder, T., Grund, C. y Beer, M. Conjunto universal de cebadores para amplificación y secuenciación de sitios de escisión en la HAO de todos los virus de la gripe A. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2561-2567 (2008).
21. Bao, Y. et al. El recurso del virus de la gripe en el Centro Nacional para información biotecnológica. *J. Virol.* 82, 596-601 (2008).
22. Shortreed, M. R. et al. Abordaje termodinámico al diseño de pruebas de palabra de ADN combinatorias sin estructura. *Nucleic Acids Res.* 33, 4965-4977 (2005).
- 20 23. Shuber, A. P., Grondin, V. J. y Klinger, K. W. Procedimiento simplificado para desarrollar PCR multiplex. *Genome Res.* 5, 488-493 (1995).
24. Edgar, R. C. MUSCLE: alineación de secuencia múltiple con precisión y rendimiento elevados. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797 (2004).
- 25 25. Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. y Barton, G. J. Editor de alineación Jalview Java. *Bioinformatics* 20, 426-427 (2004).
26. Rychlik, W., Spencer, W. J. y Rhoads, R. E. Optimización de la temperatura de hibridación para amplificación de ADN in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18, 6409-6412 (1990).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> SVA - Swedish National Veterinary Institute
- 30 <120> Tipado genómico
- <130> P8716PC00
- <150> SE 0950824-3
- <151> 2009-11-03
- <160> 61
- 35 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 53
- <212> ADN
- <213> Virus de la gripe aviar
- 40 <400> 1
- cgggaaactat caccaaaca caccgca ggaragaa raagaaaaa gag 53
- <210> 2
- <211> 52

ES 2 541 710 T3

<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 2
cgggaactat caccaaaca caccgcgaag gggagagaag aagaaaaag ag 52
5 <210> 3
<211> 53
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 3
10 cgggaactat caccaaaca caccgcgcc tcaaagaaa agaaaaaca gag 53
<210> 4
<211> 53
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
15 <400> 4
cgggaactat caccaaaca caccgcgca agagaraga gaarraaag arg 53
<210> 5
<211> 51
<212> ADN
20 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 5
cgggaactat caccaaaca caccgcgaag agaragaaga arraagcgar g 51
<210> 6
<211> 49
25 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 6
cgggaactat caccaaaca caccgcggtc cctcaaagga agaaaagag 49
<210> 7
30 <211> 52
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 7
cgggaactat caccaaaca caccgcggag akaraagaag aaaaaagmga gg 52
35 <210> 8
<211> 52
<212> ADN

ES 2 541 710 T3

<213> Virus de la gripe aviar
<400> 8
cgggaactat caccaaaca caccocggag akaraagaag aaaaaagmgg gg 52
<210> 9
5 <211> 53
<212> **ADN**
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 9
cgggaactat caccaaaca caccocgrga gakaraagaa gaaaraarag agg 53
10 <210> 10
<211> 53
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 10
15 cgggaactat caccaaaca caccocgrga gakaraagaa gaaaaargar agg 53
<210> 11
<211> 53
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
20 <400> 11
cgggaactat caccaaaca caccocggga gagagaagaa gaaaaagag agg 53
<210> 12
<211> 51
<212> ADN
25 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 12
cgggaactat caccaaaca caccocgccc taaagaaga aaaaaagag g 51
<210> 13
<211> 53
30 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 13
cgggaactat caccaaaca caccocgcct caaagaaraa gaaaaarag agg 53
<210> 14
35 <211> 44
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar

ES 2 541 710 T3

<400> 14
cgggaaactat caccaaaca caccocggga tcgcgtgtga ggag 44
<210> 15
<211> 49
5 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 15
cgggaaactat caccaaaca caccocgcca aaaaaaggaa aaaaagagg 49
<210> 16
10 <211> 43
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 16
cgggaaactat caccaaaca caccocggat cgcgsgtgag gag 43
15 <210> 17
<211> 47
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 17
20 cgggaaactat caccaaaca caccocgcca aagaggagga ggagagg 47
<210> 18
<211> 50
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
25 <400> 18
cgggaaactat caccaaaca caccocgcca aaaaagagga aaaagagagg 50
<210> 19
<211> 49
<212> ADN
30 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 19
cgggaaactat caccaaaca caccocgttc caaaaaggaa aaagagagg 49
<210> 20
<211> 52
35 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 20

ES 2 541 710 T3

cggaactat caccaacaa cccccgaaa ctcaaaaag aagaarmaga gg 52
<210> 21
<211> 53
<212> ADN
5 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 21
cggaactat caccaacaa cccccgcca aaaaagaaa agaaaagag agg 53
<210> 22
<211> 50
10 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 22
cggaactat caccaacaa cccccgcc aaaaaagaa gaaaragagg 50
<210> 23
15 <211> 53
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 23
cggaactat caccaacaa cccccgaa attcaaaa agaaaagag agg 53
20 <210> 24
<211> 53
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 24
25 cggaactat caccaacaa cccccgaga gaggaggaa gaagaaaag agg 53
<210> 25
<211> 52
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
30 <400> 25
cggaactat caccaacaa cccccgaaa gagagagaag gaaaagaga gg 52
<210> 26
<211> 51
<212> ADN
35 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 26
cggaactat caccaacaa cccccgaaa aaagaaaag aaaagaggc c 51

ES 2 541 710 T3

<210> 27
<211> 48
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
5 <400> 27
cggaactat caccaaaca caccgccc gagaargaga aagagagg 48
<210> 28
<211> 51
<212> ADN
10 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 28
cggaactat caccaaaca caccgctc caaaaagaga aaaaaagag g 51
<210> 29
<211> 52
15 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 29
cggaactat caccaaaca caccgcaa tccaaagag aaagaaaaga gg 52
<210> 30
20 <211> 50
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 30
cggaactat caccaaaca caccgccc raagaagaga gagaagagag 50
<210> 31
<211> 45
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 31
30 cggaactat caccaaaca caccgcg caggcagaaa agagg 45
<210> 32
<211> 46
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
35 <400> 32
cggaactat caccaaaca caccgaca tgcgcaaaaa aagagg 46
<210> 33

ES 2 541 710 T3

<211> 50
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 33

5 cgggacaaca aaccactatc aaccccgaty cctcararag raacaaragg 50
<210> 34
<211> 49
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar

10 <400> 34
cgggacaaca aaccactatc aaccccgytc ctcararagr aacaaragg 49
<210> 35
<211> 50
<212> ADN

15 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 35
cgggacaaca aaccactatc aaccccggyt cctcararag agacaaragg 50
<210> 36
<211> 50

20 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 36
cgggacaaca aaccactatc aaccccggyt cctcararag agacaaragg 50
<210> 37

25 <211> 48
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 37
cgggacaaca aaccactatc aaccccgccc tcagagagag acgagagg 48

30 <210> 38
<211> 48
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 38

35 cgggacaaca aaccactatc aaccccgccc tcaacgagaa acaagagg 48
<210> 39
<211> 48

ES 2 541 710 T3

<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 39
cgggacaaca aaccactatc aaccccgycc tcaaarggag acaagagg 48
5 <210> 40
<211> 48
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 40
10 cgggacaaca aaccactatc aaccccgcct gaaaytcaa aagraagg 48
<210> 41
<211> 50
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
15 <400> 41
cgggacaaca aaccactatc aaccccgcct gaaaytcaa aaggaaaagg 50
<210> 42
<211> 48
<212> ADN
20 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 42
cgggacaaca aaccactatc aaccccgyga aattccaaar ggaagagg 48
<210> 43
<211> 47
25 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 43
cgggacaaca aaccactatc aaccccgcga artyccaaar ggragag 47
<210> 44
30 <211> 47
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 44
cgggacaaca aaccactatc aaccccggaa aycccaaakg gaagagg 47
35 <210> 45
<211> 46
<212> ADN

ES 2 541 710 T3

<213> Virus de la gripe aviar
<400> 45
cgggacaaca aaccactatc aaccccgcyg aartccraa kggaar 46
<210> 46
5 <211> 49
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 46
cgggacaaca aaccactatc aaccccgctt garaytcaa aaggragag 49
10 <210> 47
<211> 48
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 47
15 cgggacaaca aaccactatc aaccccgctg araytcaaaa gggragag 48
<210> 48
<211> 49
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
20 <400> 48
cgggacaaca aaccactatc aaccccgctg aaattcaaaa aggaagagg 49
<210> 49
<211> 52
<212> ADN
25 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 49
cgggacaaca aaccactatc aaccccggaat gtycctcaaa ragaacaag ag 52
<210> 50
<211> 49
30 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 50
cgggacaaca aaccactatc aaccccggtt cctcaaagag acacaaggg 49
<210> 51
35 <211> 49
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar

ES 2 541 710 T3

<400> 51
cgggacaaca aaccactatc aaccccgttc cccaagaga aaaaagagg 49
<210> 52
<211> 48
5 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 52
cgggacaaca aaccactatc aaccccgttc tcaaaggaa acaagagg 48
<210> 53
10 <211> 48
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 53
cgggacaaca aaccactatc aaccccgttg agtccaaga aaaagagg 48
15 <210> 54
<211> 49
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 54
20 cgggacaaca aaccactatc aaccccgcgg aaaatccraa gamkagagg 49
<210> 55
<211> 49
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
25 <400> 55
cgggacaaca aaccactatc aaccccgctg aaatccaaa gaaaagagg 49
<210> 56
<211> 21
<212> ADN
30 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 56
atgtccgaga tatgtaagc a 21
<210> 57
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 57

ES 2 541 710 T3

ttgtaatct gcagcagttc 20
<210> 58
<211> 27
<212> ADN
5 <213> Virus de la gripe aviar
<400> 58
cctccagart atgcmtayaa aattgtc 27
<210> 59
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 59
taccaaccgt ctacatkcc ytg 23
<210> 60
15 <211> 27
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 60
cgggaactat caccaaaca caccocg 27
20 <210> 61
<211> 27
<212> ADN
<213> Virus de la gripe aviar
<400> 61
25 cgggacaaca aaccactatc aaccocg27

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de genotipado de N loci en una molécula de ácido nucleico diana presente en una muestra, en el que N es al menos 1 y cada locus se localiza en una región marcadora del genotipo correspondiente de la molécula de ácido nucleico y corresponde a dos o más genotipos, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) realizar una preamplificación de cada región marcadora del genotipo usando reacciones enzimáticas dependientes del cebador, en el que la amplificación se realiza con un primer grupo de pares de cebadores de amplificación que consiste en un primer conjunto de uno o más cebadores directos y un primer conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, dando uno o más amplicones que abarcan la o las regiones marcadoras del genotipo, y en el que cada amplicón contiene una región con al menos una secuencia de nucleótidos que puede actuar como una diana de unión al cebador distinta de la región marcadora del genotipo;

b) realizar el o los amplicones de la etapa a) una reacción de amplificación de ácido nucleico a dos niveles usando reacciones enzimáticas dependientes del cebador, en el que

b1) el primer nivel es la amplificación de ácido nucleico usando un segundo grupo de pares de cebadores que se unen a cada amplicón producido en la etapa a), en el que dicho grupo de pares de cebadores ES consiste en un segundo conjunto de uno más cebadores directos diferentes y un segundo conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, en el que cada variante de secuencia de cada locus está dirigido por al menos un cebador de dichos segundos conjuntos de cebadores; formando dicho al menos un cebador un conjunto de cebadores de selección, siendo los cebadores de selección bipartitos que tienen en el extremo 3' una parte de secuencia de reconocimiento del que se une a dichos N loci en la región marcadora del genotipo, y en el extremo 5' una parte de la secuencia marcadora de una pieza artificial que es específica de genotipo o una parte de la secuencia marcadora de dos piezas artificial específica, una pieza de las cuales es específica del genotipo y la otra no es específica del genotipo, y en el que cada cebador de selección que se une al locus diana de la región marcadora de genotipo forma un par de cebadores junto con otro cebador perteneciente a dichos segundos conjuntos de cebadores pero apuntando hacia dicha secuencia de nucleótidos que puede actuar como diana de unión al cebador de la etapa a), y en el que cada cebador de selección está presente en una concentración de menos de 100 nM, preferentemente 10-0,01 nM, y lo más preferido de aproximadamente 0,3 nM, y el otro cebador de dicho par de cebadores está presente a una concentración al menos 100 veces, preferentemente entre 100 y 100 000 veces la de dicho cebador de selección, dando amplicones cada uno de los cuales contiene uno correspondiente de dichos N loci; b2) el segundo nivel es amplificación de ácido nucleico usando un tercer grupo de pares de cebadores que se unen a cada amplicón producido en la etapa b1), en el que dicho grupo de pares de cebadores, presentes en una concentración de al menos 100 veces, preferentemente entre 100 y 100 000 veces la de dichos cebadores de selección en la etapa b1), consiste en un tercer conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un tercer conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, en el que cada parte de la secuencia de marcaje de cada cebador de selección está marcado por el menos un cebador de dicho tercer conjunto de cebadores, formando dicho al menos un conjunto de cebadores de detección, y en el que cada cebador de detección que se une a la parte de la secuencia de marcaje forma un par de cebadores junto con otro cebador que pertenece a dicho tercer conjunto de cebadores pero dirigido a dicha secuencia de nucleótidos que puede actuar como diana de unión del cebador de la etapa a), teniendo los cebadores de detección:

i) una secuencia específica de genotipo correspondiente a la parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial de los cebadores de selección, en el que cada cebador de detección está marcado con un marcador detectable específico de genotipo; o

ii) una secuencia no específica de genotipo que es común a todos los cebadores de detección y corresponde a la secuencia no específica de la parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial de los cebadores de selección, en el que cada cebador de detección está marcado opcionalmente en el extremo 5' con un marcador detectable o un resto químico;

que tiene como resultado amplicones detectables, cada uno de los cuales contiene uno respectivo de dichos N loci marcados con secuencias de marcaje específicas de genotipo y, opcionalmente, marcadores específicos de genotipo;

c), el genotipado de dichos N loci de la molécula de ácido nucleico diana mediante:

c1) detección durante, o después de, la amplificación de la misma cada marcador comprendido en cada amplicón producido en la etapa b2i), y relacionando la cantidad predominante de marcador detectado con un genotipo específico para cada locus; o c2) después de la amplificación poner en contacto cada amplicón producido en la etapa b2ii) con una matriz de detección de secuencias específicas de

ES 2 541 710 T3

genotipo, detectar la hibridación de cada amplicón a la matriz y relacionar la hibridación detectada con un genotipo específico para cada locus.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos que puede actuar como diana de unión al cebador de la etapa a) pertenece a un conjunto de secuencias que tienen menos de 100 miembros, preferentemente menos de 20 miembros y más preferido 1-5 miembros, y/o corresponde a una parte de marcaje de secuencia artificial introducida en los amplicones formados en la etapa a) por medio de dicho primer conjunto de cebadores, en el que dichos cebadores son bipartitos y comprenden una secuencia de marcaje en 5' artificial y una región en 3' de unión a la molécula de ácido nucleico diana y/o corresponde a una región o regiones genómicas.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los cebadores de selección y de detección tienen secuencias seleccionadas para minimizar la interacción cebador-cebador, preferentemente en el que la parte de la secuencia de marcaje artificial de dichos cebadores tiene extremos autocomplementarios para formar menos de 10 pares de bases, preferentemente de 3-7 pares de bases y lo más preferido 5 pares de bases.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho tercer conjunto de cebadores usado en la etapa b2) que se unen a al menos una secuencia que puede actuar como una diana de unión al cebador de la etapa a) es el mismo que dicho segundo conjunto de cebadores usados en la etapa b1) que se unen a la al menos una secuencia que puede actuar como una diana de unión al cebador de la etapa a).
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho segundo conjunto de cebadores usado en la etapa b1) que se unen a al menos una secuencia que puede actuar como una diana de unión al cebador de la etapa a) es el mismo que el primer conjunto de cebadores usados en la etapa a).
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada locus corresponde a dos genotipos, opcionalmente en el que la presencia o ausencia de un locus determinado indica resistencia y no resistencia antimicrobiana, respectivamente, de un microorganismo.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los dos genotipos para cada locus indican patogenicidad alta y baja, respectivamente., de un microorganismo cuyo genoma contiene el locus, preferentemente en el que el microorganismo es un virus de la gripe.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los dos genotipos corresponden a la presencia o ausencia de un locus, opcionalmente en el que la presencia o ausencia de un locus determinado indica resistencia y no resistencia antimicrobiana, respectivamente, de un microorganismo.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el par de cebadores de la etapa a) consiste en cebadores que comprenden las secuencias de ácido nucleico de SEC ID N° 59 y 58 o de cebadores que comprenden las secuencias de ácido nucleico de SEC ID N° 57 y 56, o de cebadores que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la tabla 7 o seleccionadas de las secuencias de ácido nucleico de la tabla 4 y/o en el que dichos cebadores de selección se eligen de oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 1 a 55, o se eligen de oligonucleótidos que comprenden las secuencias de la tabla 3 o la tabla 6 y/o en el que dichos cebadores de detección se eligen de oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 60 y 61.
10. Unkit para realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un primer grupo de pares de cebadores que consiste en un primer conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un primer conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes para la realización de la etapa de preamplificación a) de la reivindicación 1 un segundo grupo de pares de cebadores que consiste en un segundo conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un segundo conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, un segundo conjunto de los cuales forma un conjunto de cebadores de selección, en el que los cebadores de selección son bipartitos y tienen en el extremo 3' una secuencia de reconocimiento del locus y en el extremo 5' una parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial que es específica del genotipo o una parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial, siendo una pieza de las mismas específica del genotipo y siendo la otra no específica del genotipo, para la realización de la amplificación de primer nivel de la etapa b1) de la reivindicación 1; un tercer grupo de pares de cebadores que consiste en un tercer conjunto de uno o más cebadores directos diferentes y un tercer conjunto de uno o más cebadores inversos diferentes, un tercer conjunto del cual forma un conjunto de cebadores de detección, en el que los cebadores de detección tienen una secuencia específica del genotipo correspondiente a la parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial de los cebadores de selección o una secuencia no específica del genotipo común a cada cebador de detección y correspondiente a la secuencia no específica de la parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial de los cebadores de selección, para la realización de la amplificación de segundo nivel de la etapa b2) de la reivindicación 1, en el que los cebadores de detección

están marcados opcionalmente en el extremo 5' con un marcador o un resto químico y, opcionalmente, otros ingredientes de una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico.

- 5 11. El kit de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los cebadores de selección y de detección tienen secuencias seleccionadas para minimizar la interacción cebador-cebador, preferentemente en el que los extremos de dichos cebadores son autocomplementarios para formar menos de 10, más preferentemente 3-7 pares de bases y lo más preferido 5 pares de bases.
12. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que dicho tercer conjunto de cebadores directos es el mismo que dicho segundo conjunto de cebadores directos o dicho tercer conjunto de cebadores inversos es el mismo que dicho segundo conjunto de cebadores inversos.
- 10 13. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicho segundo conjunto de cebadores directos es el mismo que primer conjunto de cebadores directos o dicho segundo conjunto de cebadores inversos es el mismo que dicho primer conjunto de cebadores inversos.
- 15 14. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el primer conjunto de cebadores comprende las SEC ID N° 59 y 58 o las secuencias de SEC ID N°: 57 y 56, o de cebadores que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la tabla 7 o seleccionadas de las secuencias de ácido nucleico de la tabla 4 y/o en el que dichos cebadores de selección se eligen de oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 1 a 55, o se eligen de oligonucleótidos que comprenden las secuencias de la tabla 3 o la tabla 6 y/o en el que dichos cebadores de detección se eligen de oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 60 y 61.
- 20 15. Un procedimiento para diseñar y producir cebadores de selección que se van a usar en el procedimiento para el genotipado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o en el kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, comprendiendo las etapas de:
- a) seleccionar una región altamente variable en la que las secuencias son tan diferentes como sea posible entre diferentes genotipos;
- 25 b) alinear un gran número de secuencias de molécula de ácido nucleico de interés, que comprenden al menos un locus;
- c) combinar las moléculas de ácido nucleico alineadas por medio de un programa informático con función de alineación del perfil;
- 30 d) recortar las moléculas de ácido nucleico alineadas a los oligonucleótidos que tienen entre 20 y 50 nucleótidos, preferentemente entre 30 y 40 nucleótidos, más preferido 35 oligonucleótidos, que cubren dicho locus;
- 35 e) ajustar la longitud de dichos oligonucleótidos de la etapa d), mientras que todavía cubre dicho locus, para alcanzar temperaturas de fusión similares para todos los oligonucleótidos citados, estando las temperaturas de fusión en un intervalo de aproximadamente 10 °C preferentemente en 5 °C, más preferido en 1 °C;
- f) agrupar dichos oligonucleótidos en cebadores degenerados;
- g) sintetizar dichos cebadores degenerados al tiempo que se añaden al extremo 5' de los cebadores una parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial que es específica de genotipo o una parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial, siendo una pieza de las mismas específica del genotipo y
- 40 siendo la otra no específica del genotipo;
- h) recuperar el producto del cebador de selección de la etapa g);
- en el que dicha parte de la secuencia de marcaje artificial tiene una secuencia seleccionada para minimizar la interacción cebador-cebador, en la que los extremos de dichos cebadores son autocomplementarios para formar menos de 10, preferentemente 3-7 y lo más preferido 5 pares de bases.
- 45 16. Un conjunto de pares de cebadores adecuados para llevar a cabo las etapas del procedimiento de la reivindicación 1, que comprende los cebadores de selección adaptados para el genotipado de loci en una molécula de ácido nucleico diana, en el que cada locus se localiza en una región marcadora del genotipo de la molécula de ácido nucleico y corresponde a dos o más genotipos, en el que dichos cebadores de selección comprenden en el extremo 3' una parte de la secuencia de reconocimiento del locus y en el extremo 5' una
- 50 parte de la secuencia de marcaje de una pieza artificial o una parte de la secuencia de marcaje de dos piezas artificial, una pieza de las cuales es específica del genotipo y la otra es no específica del genotipo, elegidas de los oligonucleótidos que comprenden las secuencias de SEC ID N° 1 a 55, o se eligen de los oligonucleótidos que comprenden las secuencias de la tabla 3 o la tabla 6.

Fig. 1

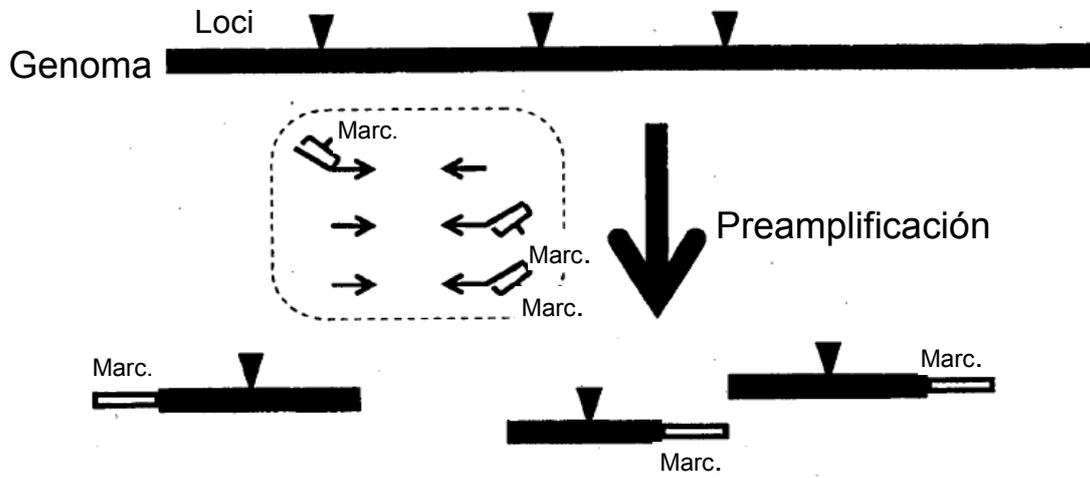


Fig. 2

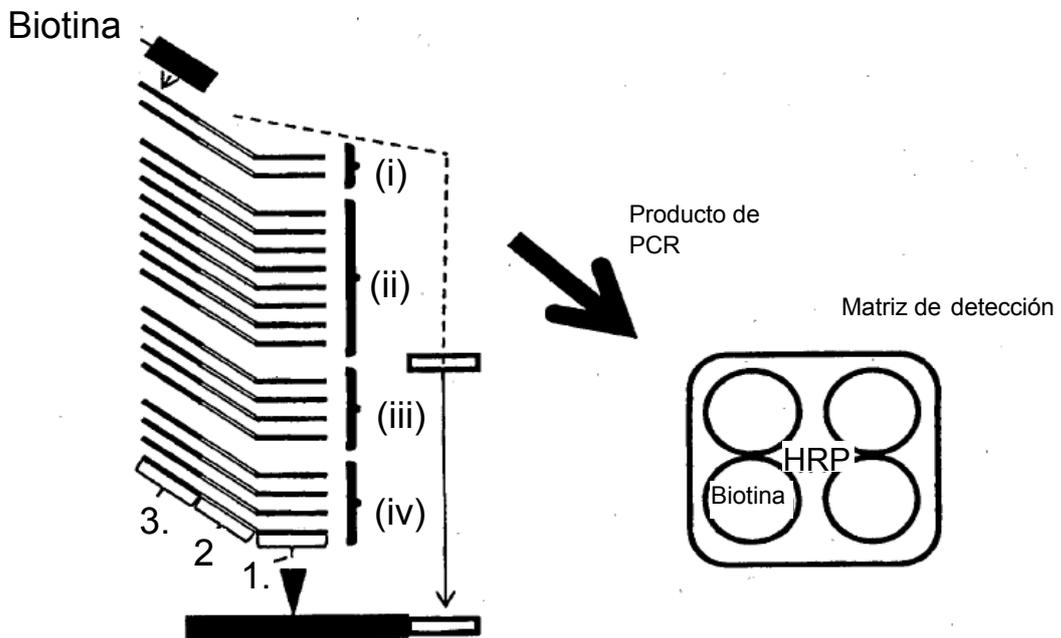


Fig. 3

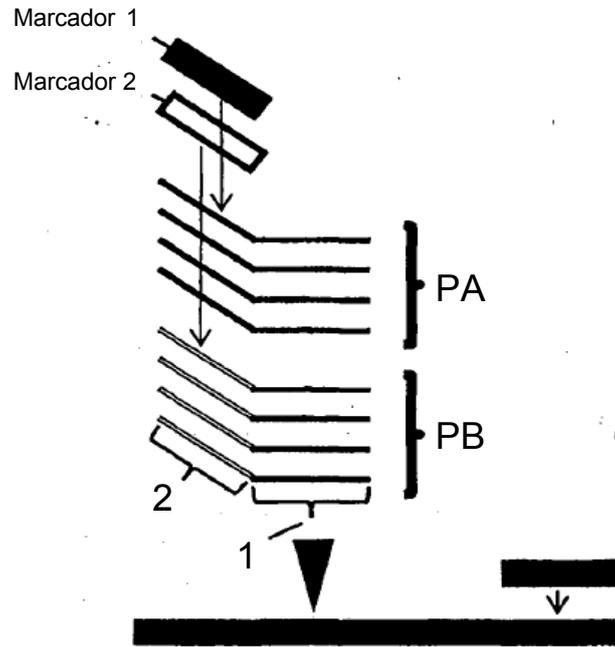


Fig. 4

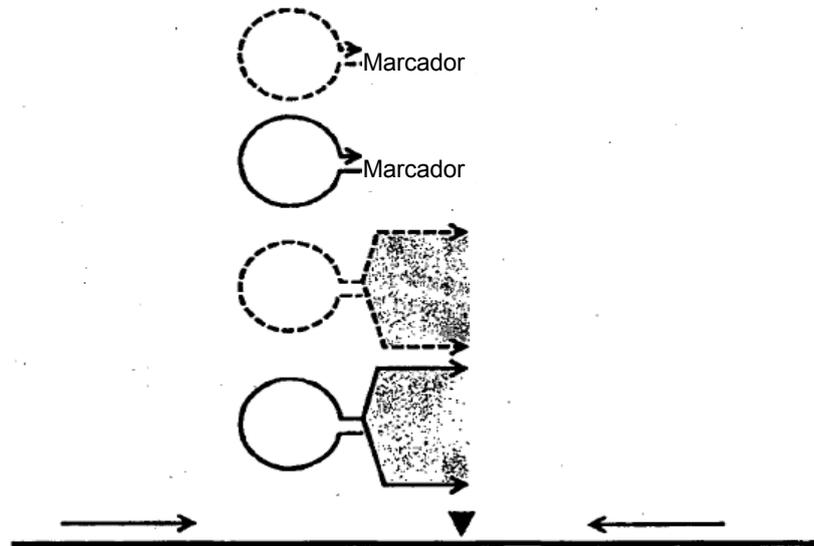


Fig. 5

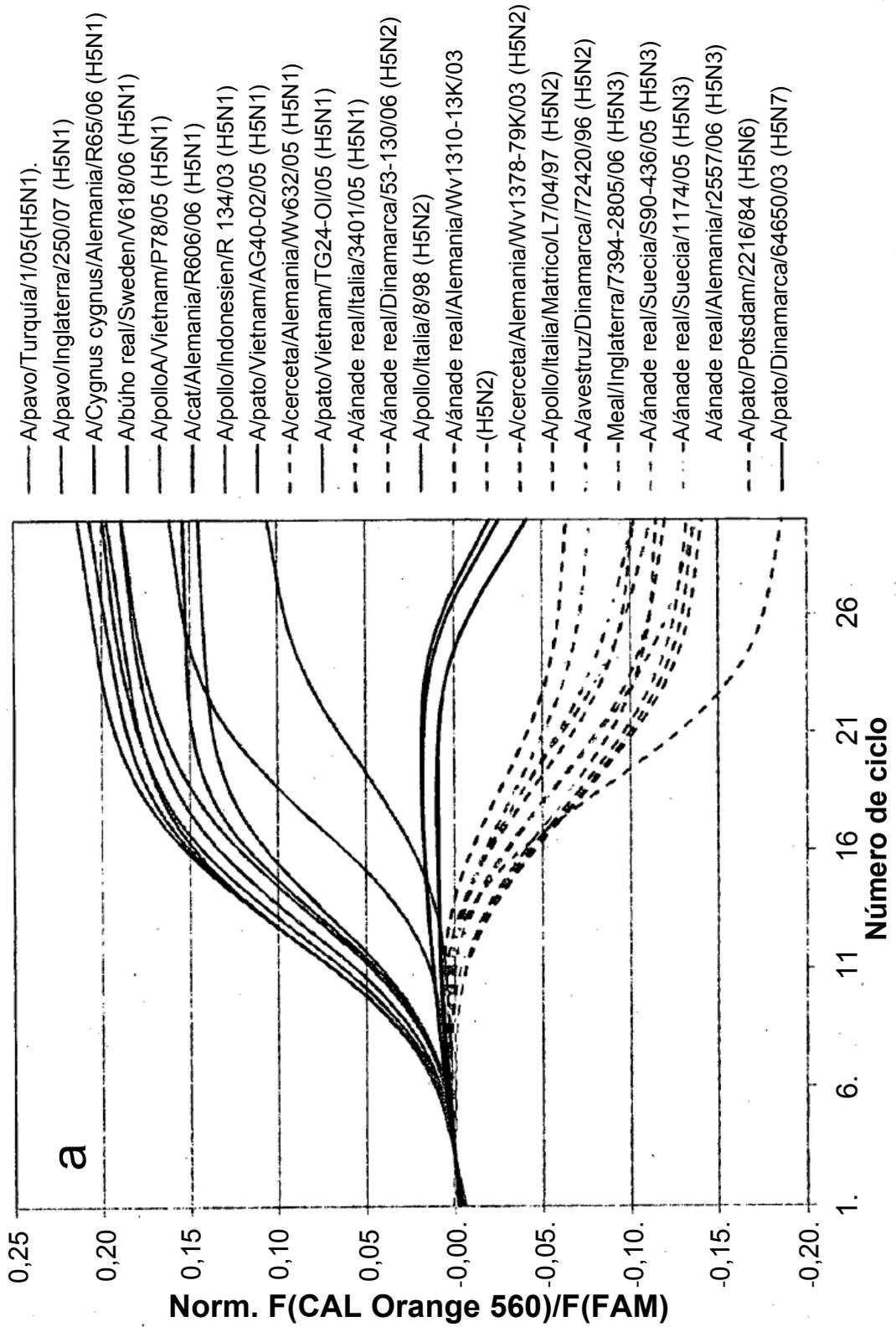


Fig. 5

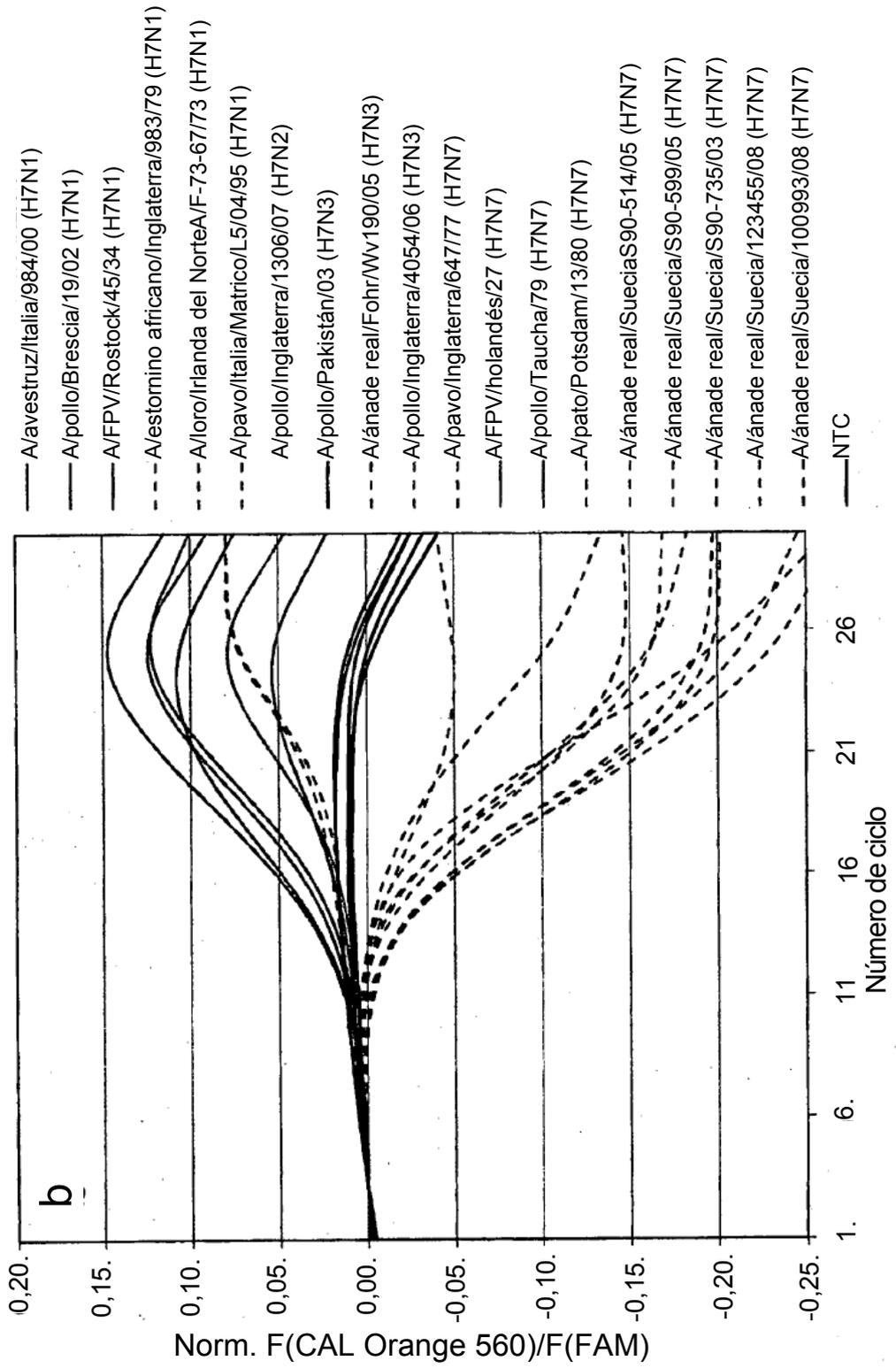


Fig. 6

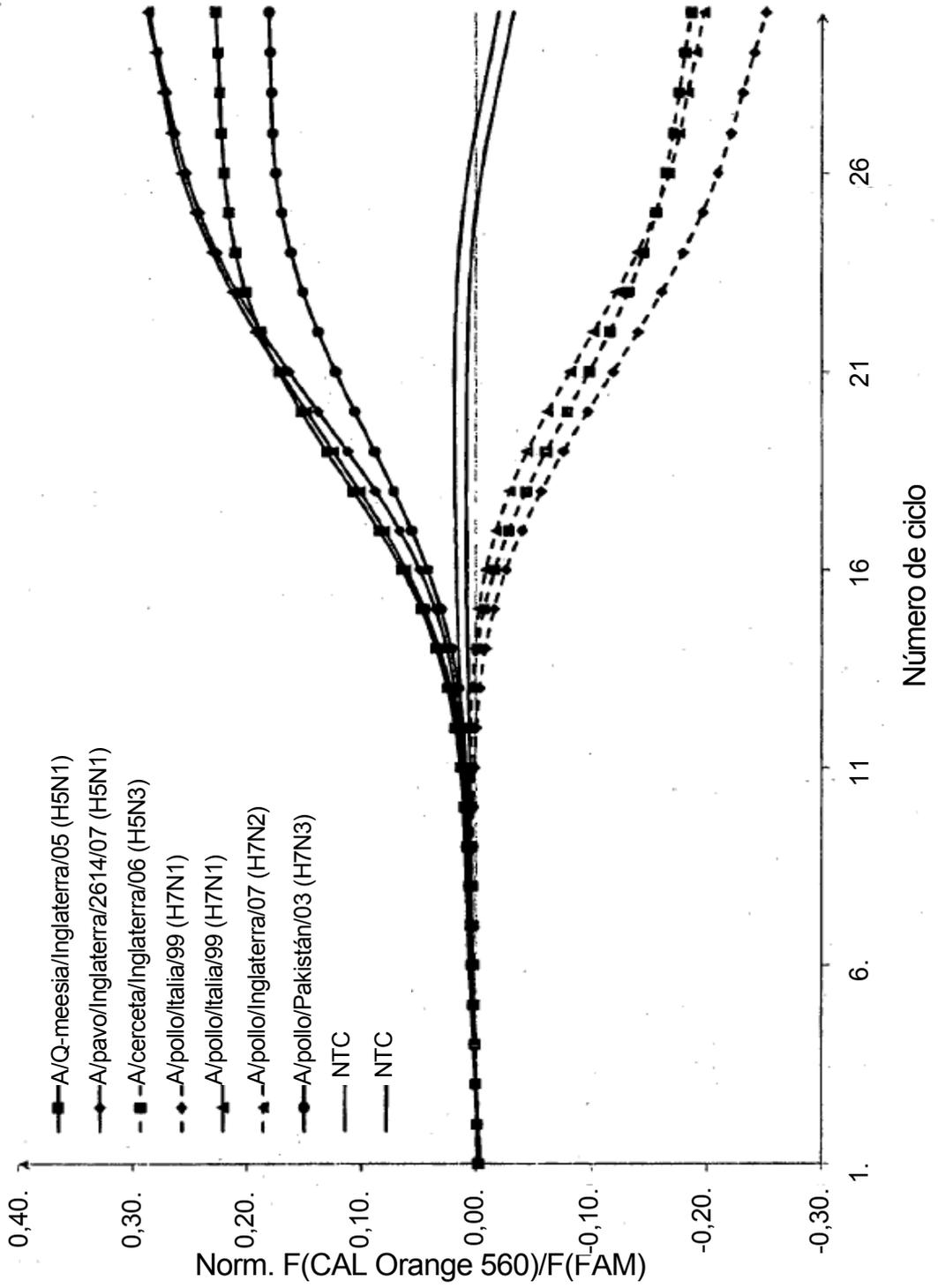


Fig. 7

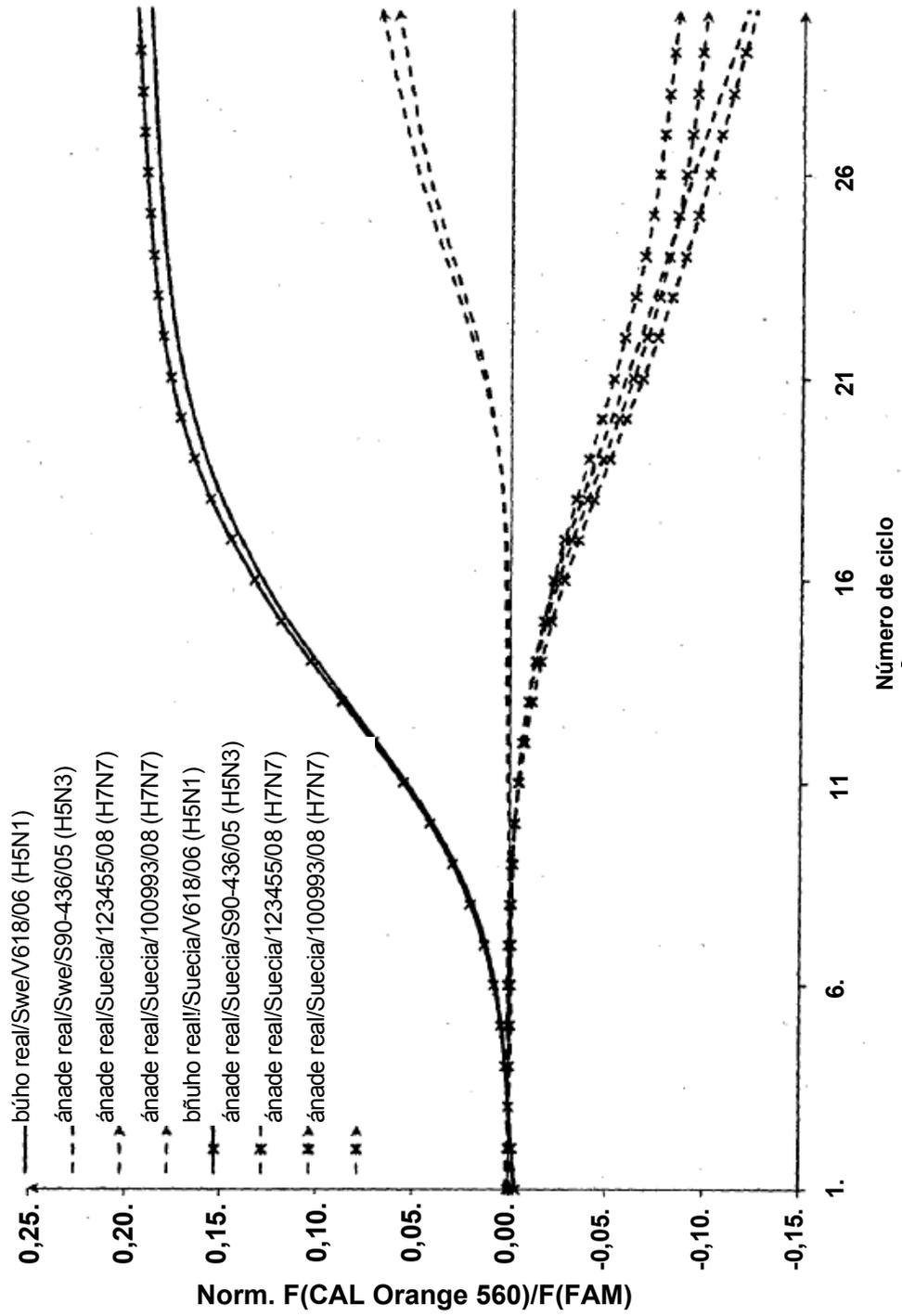


Fig.8

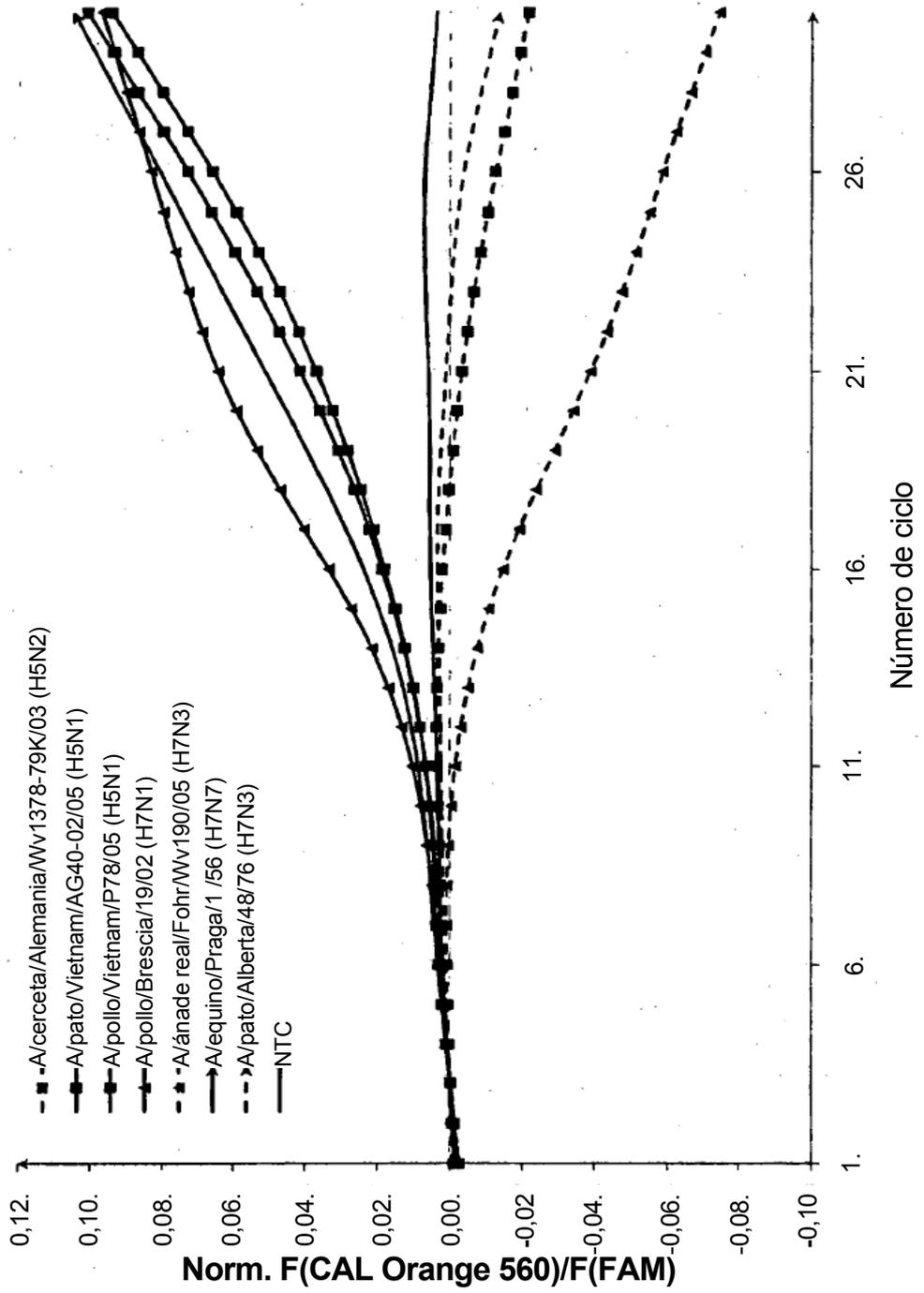


Fig. 9

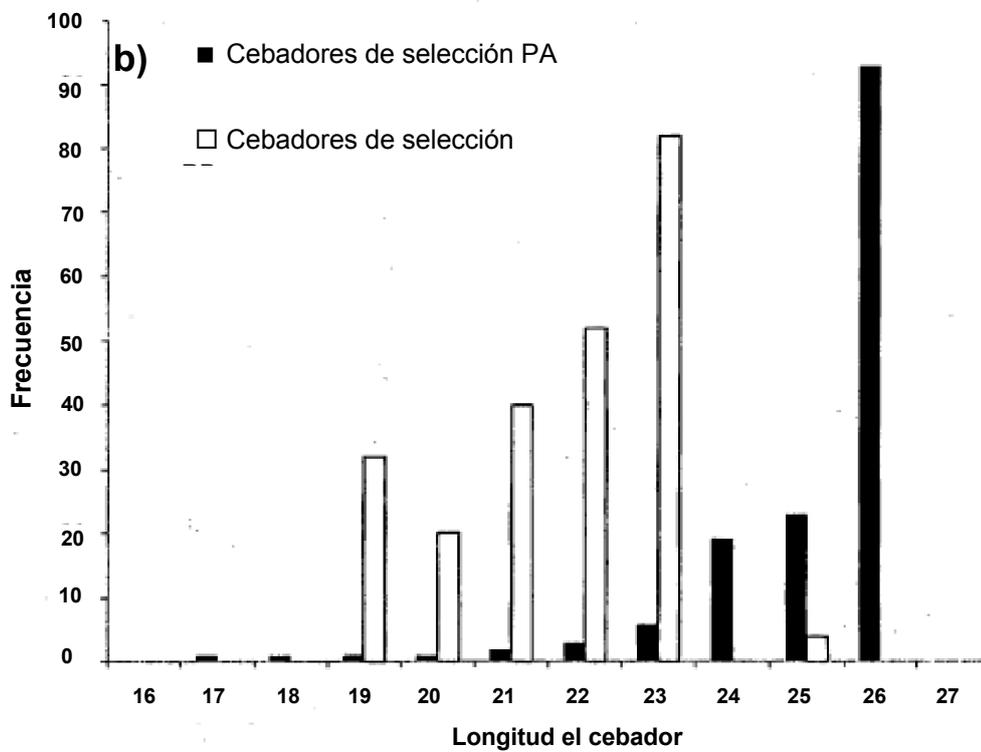
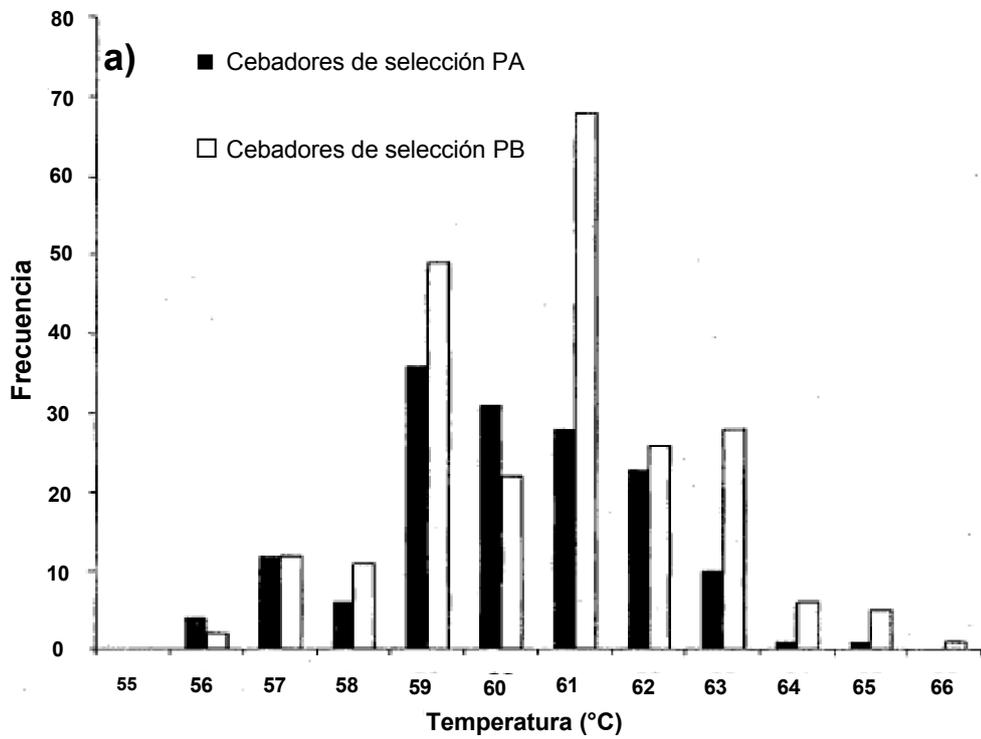


Fig. 10

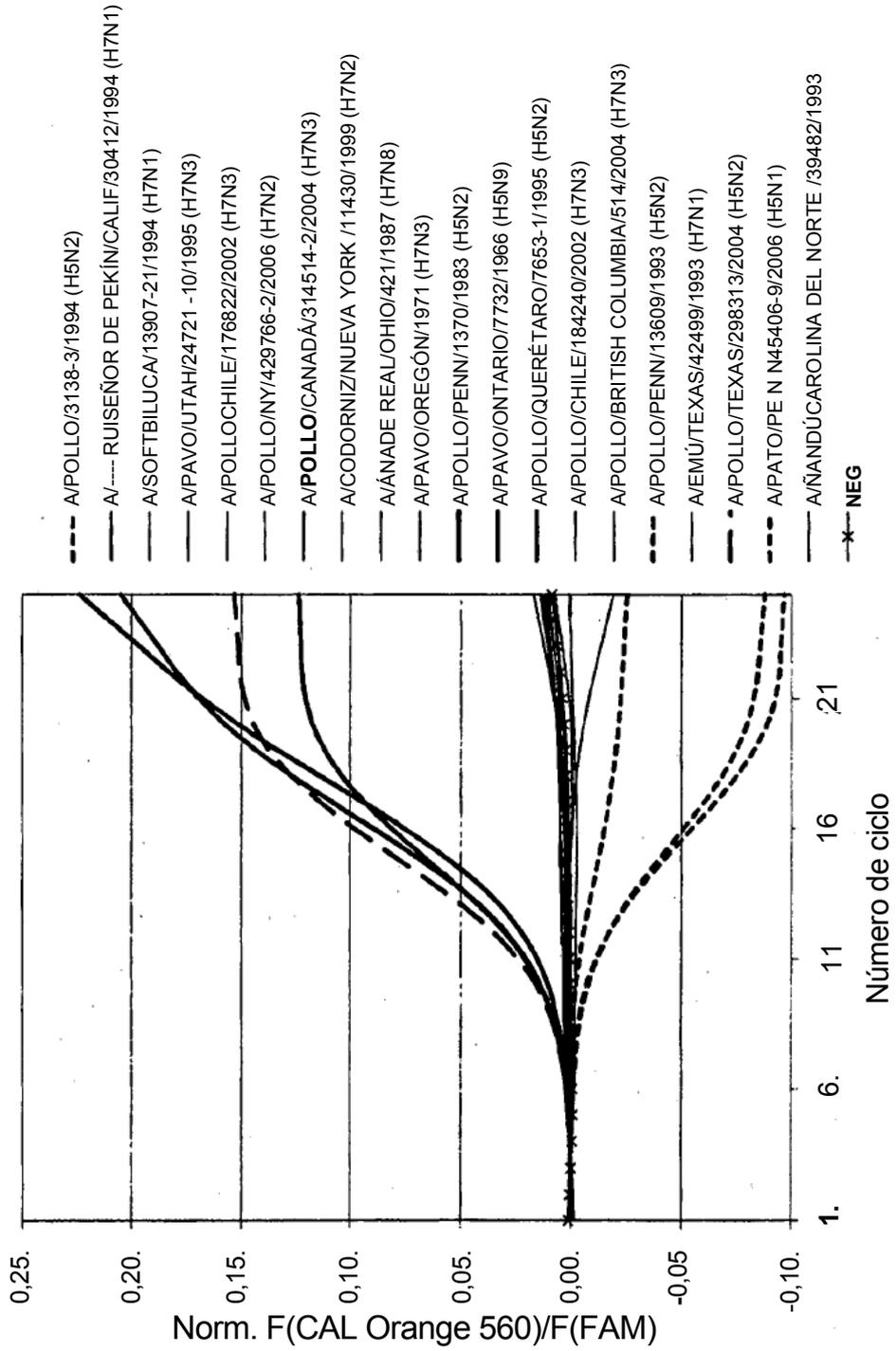


Fig.11

