

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 823**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12192087 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2730660**

54 Título: **Herramientas y método para la detección y cuantificación de virus VIH-1, SIVcpz y SIVgor genéticamente diversos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.09.2015**

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE  
DÉVELOPPEMENT (IRD) (100.0%)  
Immeuble le Sextant 44, Bd de Dunkerque CS  
90009  
13572 Marseille Cédex 02, FR**

72 Inventor/es:

**PEETERS, MARTINE y  
ETIENNE, LUCIE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 545 823 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**

Herramientas y método para la detección y cuantificación de virus VIH-1, SIVcpz y SIVgor genéticamente diversos

La invención se refiere a la detección y cuantificación de virus VIH-1, SIVcpz y SIVgor genéticamente diversos.

5 Se refiere particularmente a herramientas y a un método para ensayo de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en transcripción inversa) en tiempo real de sensibilidad elevada para detectar y cuantificar todas las cepas en circulación.

10 En el año 2009, alrededor de 5,2 millones de personas en países de rentas bajas y medias recibieron terapia antirretroviral (ART) (ONUSIDA, 2010) (1). Los programas para aumentar la ART en países con recursos limitados ha aumentado el número de personas que reciben tratamiento (es decir, +30% entre 2008 y 2009). No obstante, la monitorización de la carga viral (VL) para pacientes en ART, o para la detección viral temprana en niños, solamente está raramente disponible en escenarios de recursos limitados.

15 El aumento de la monitorización en laboratorio, tal como la medida de VL en países de rentas bajas, es una prioridad, y se ha definido como una recomendación por ONUSIDA en 2010 para mejorar la eficiencia y calidad del tratamiento y cuidado antirretrovirales contra el VIH. Actualmente, la necesidad de una monitorización eficaz de la carga viral se justifica por diferentes observaciones.

En primer lugar, si el fallo virológico se detecta de forma temprana, disminuirá la propagación de cepas resistentes a fármacos en la población general.

En segundo lugar, si se proporciona una mejor intervención y seguimiento sanitarios a los pacientes, aumentará su adhesión, y disminuirán los posibles cambios innecesarios a regímenes de segunda línea más caros.

20 En tercer lugar, los resultados de falsos negativos para cepas “inusuales” pueden conducir a diagnóstico inexacto, y tienen consecuencias adversas.

Finalmente, la medida de la carga viral es la mejor manera para el diagnóstico temprano de infección perinatal en niños (1) (ONUSIDA, 2010).

25 Hoy en día, existen diferentes ensayos para la carga viral, y usan diferentes técnicas de biología molecular, tales como RT-PCR en tiempo real, NASBA (amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos), o bDNA (amplificación de señal de ADN de cadena ramificada) (revisado en (2)).

30 Si los ensayos de cuantificación del VIH están raramente presentes o solamente en laboratorios de referencia de países con fuentes limitadas, es debido principalmente a su elevado coste entre 50 y 100 dólares (el coste de la monitorización es mayor que el coste de la ART), y a su necesidad de instrumentos específicos. Se han propuesto alternativas más baratas a los métodos clásicos moleculares, pero todavía existe la necesidad de una mejora y/o evaluación adicionales.

La elevada diversidad genética del VIH-1 es un reto importante para el desarrollo de ensayos nuevos, eficientes y sensibles.

35 Todas las pruebas cuantitativas comerciales se diseñaron principalmente en virus del subtipo B e, incluso si ahora están más y más adaptados a un amplio intervalo de variantes (algunas incluyen por ejemplo el grupo O de VIH-1), todavía no cuantifican correctamente todas las variantes en circulación.

Este inconveniente es particularmente un problema para África subsahariana, en la que no predominan cepas B, y en la que cocirculan muchas variantes de VIH-1 muy diversas.

40 Debido a la globalización, esta heterogeneidad se puede encontrar también en diferentes regiones geográficas en las que los ensayos habituales de la carga viral pueden no ser capaces de detectar estas cepas “inusuales”.

Además, los virus muy divergentes, tales como los grupos O, N y P del VIH-1, que también circulan y tienen una evolución clínica similar al grupo M del VIH-1, necesitan herramientas de monitorización apropiadas que a menudo no están disponibles.

45 De este modo, la diversidad del VIH y la epidemiología molecular todavía afectan al manejo y monitorización de pacientes infectados con VIH.

El límite principal de la mayoría de las pruebas “propias” o genéricas desarrolladas es que no se diseñaron para detectar todas las cepas en circulación.

50 Por ejemplo, el ensayo Generic de la carga viral del VIH-1 de Biocentric y el ensayo “propio” desarrollado por Drosten et al cuantifican efectivamente el grupo M del VIH-1 pero no el grupo O del VIH-1 ni el O y N del VIH-1, respectivamente (4, 5), debido a que sus cebadores y sonda no coinciden correctamente con estas cepas

divergentes. Por otro lado, un ensayo de PCR en tiempo real desarrollado por Gueudin et al cuantifica específicamente el grupo O del VIH-1, pero no detecta las cepas del grupo M del VIH-1 (6).

Esta observación es también cierta para nuevos virus VIS/VIH zoonóticos que surgen de los VISs que infectan de forma natural a chimpancés y gorilas (tales como el grupo P del VIH-1 identificado en 2001 que surge de SIVgor (3)).

5 Además, estudios recientes han mostrado que SIVcpz, ancestros de VIH-1, pueden ser patógenos para su hospedante natural, y estudios previos de los inventores han mostrado cuán difícil puede ser hacer un seguimiento de tal infección viral en muestras plasmáticas y fecales.

10 Para monitorizar la infección por VIS en monos infectados de forma natural, debería de estar disponible una nueva herramienta para detectar ARN de VIS en muestras fecales, y para cuantificar la carga viral del VIS en plasma durante la evolución de la infección.

Además, todavía existe riesgo de aparición del VIS desde los monos infectados hacia los seres humanos. Entonces será importante ser capaces de detectar con esta misma prueba cualesquiera nuevos virus SIVcpz o SIVgor emergentes hipotéticos en la población humana.

15 Finalmente, una prueba de detección y cuantificación sería útil para monitorizar la infección por VIS en grandes monos de muestras tanto fecales como plasmáticas, para comprender mejor la evolución de las infecciones por SIVcpz y SIVgor en sus hospedantes naturales, depósitos de los ancestros del VIH-1.

20 Los inventores han buscado un nuevo medio para superar los inconvenientes anteriores y se han centrado en el diseño de nuevas herramientas y un nuevo ensayo de RT-qPCR, relativamente barato y al menos igual a las pruebas genéricas o "propias" con respecto a las características técnicas y comportamiento, pero con la capacidad para detectar y cuantificar virtualmente todas las cepas circulantes del VIH-1 y sus precursores SIVcpz/SIVgor.

El objeto de la invención es entonces proporcionar herramientas y un método para detectar y cuantificar virus VIH-1, SIVcpz y SIVgor genéticamente diversos en una muestra de ensayo con una sensibilidad elevada.

Según otro objeto, la invención proporciona un único ensayo cuantitativo de la carga viral basado en la tecnología de RT-PCR en tiempo real, que satisface las diferentes metas mencionadas anteriormente.

25 De este modo, la invención se refiere a un oligonucleótido de secuencia

SEC ID N°1: 5'-CTAGAGATCCCTCAGA-3',

o su secuencia complementaria, de secuencia SEC ID N°2:

5'- TCTGAGGGATCTCTAG – 3'

útil como sonda para detectar y cuantificar todas las formas circulantes del VIH-1 y sus precursores SIVcpz/SIVgor.

30 Preferiblemente, dicha sonda es una sonda Taqman que porta un colorante informador en 5' y un desactivador no fluorescente que se une al surco menor en 3'. El colorante fluorescente es por ejemplo un colorante fluorocrómico tal como FAM (6-carboxifluoresceína). El desactivador es por ejemplo MGB (ligante tripeptídico dihidrociclopirroindólico del surco menor).

35 Particularmente, la invención se refiere a un conjunto de cebadores/sonda en el que la sonda es como se define anteriormente y los cebadores comprenden dos oligonucleótidos capaces de amplificar una secuencia diana de formas circulantes del VIH-1 y sus precursores SIVcpz/SIVgor en una muestra de ensayo.

Más particularmente, el cebador directo tiene la secuencia

SEC ID N°3: 5'- SSCTCAATAAAGCTTGCC-3'

en la que S representa G o C,

40 y el cebador inverso tiene la secuencia

SEC ID N°4: 5'-AAAATCTCTAGCAGTGGCGCC-3'

o su secuencia complementaria de la secuencia SEC ID N°5:

3' - GGCGCCACTGCTAGAGATTTT - 5'

45 La secuencia diana a amplificar mediante dichos cebadores está contenida en una muestra de ensayo que no es sospechosa de contener una secuencia diana tal como se define anteriormente.

Puede ser o puede derivar de cualquier fuente biológica, tal como por ejemplo sangre, fluidos biológicos, plasma, heces, y tejidos. La muestra de ensayo se puede usar directamente o después de un pretratamiento.

El diseño específico de la sonda, particularmente del conjunto de cebadores y sonda, permite detectar prácticamente todas las variantes de la línea VIH-1/SIVcpz/SIVgor con una especificidad muy elevada de prácticamente 100%.

5 La invención también se refiere a un método para detectar y cuantificar en una muestra de ensayo formas circulantes del VIH-1 y sus precursores SIVcpz/SIVgor, comprendiendo dicho método las etapas de

- formar una mezcla de reacción que comprende un conjunto de cebadores/sonda como se define en las reivindicaciones anejas y una muestra de ensayo que contiene una secuencia diana del VIH-1, o sus precursores SIVcpz/SIVgor,

10 - colocar la mezcla de reacción en condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación, y

- detectar el híbrido de producto/sonda como una indicación de la presencia de dichos virus en la muestra.

La mezcla de reacción comprende ventajosamente reactivos que son bien conocidos para uso en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos.

15 Tal ensayo de RT-PCR en tiempo real es relativamente barato, y es capaz de detectar y cuantificar cepas de la línea VIH-1/SIVcpz/SIVgor, incluyendo una amplia diversidad de cepas del grupo M y VIH-1 O.

Como se ilustra mediante los Ejemplos, la eficiencia media de la PCR en plasma, CRF y URF de VIH-1 M ensayados fue 99%.

20 Por lo tanto, tal ensayo puede ser útil en áreas geográficas de elevada diversidad del VIH y en riesgo de aparición de nuevas variantes del VIH. La monitorización de la carga viral para pacientes que reciben terapia antirretroviral, o la detección viral temprana en niños, se puede llevar a cabo usando la invención.

La invención también se refiere a kits que comprenden un conjunto de cebadores/sonda como se define en las reivindicaciones anejas, en los que el conjunto de cebadores/sonda se empaqueta en recipientes adecuados y se proporciona con reactivos adicionales, tales como reactivos de amplificación.

25 Otras características y ventajas de la invención se dan en los siguientes Ejemplos. En dichos Ejemplos se hace referencia a las Figuras 1-3, que ilustran, respectivamente

- Fig. 1, las relaciones en las regiones pequeñas *pol* y *env* entre cepas del grupo O del VIH-1 ensayadas de la Tabla 1 y el alineamiento de referencia del grupo O del VIH-1:

30 el panel izquierdo es un árbol filogenético de una región *pol* (transcriptasa inversa, 689 pb), y el árbol de la derecha deriva de una región *env* pequeña (gp41; 394 pb). Las flechas resaltan cepas del panel usadas en la invención; algunas cepas no se secuenciaron debido a limitaciones del material (volúmenes de plasma pequeños disponibles, carga viral plasmática baja). Otras secuencias del grupo O usadas como referencias proceden de la base de datos del VIH (<http://www.hiv.lanl.gov/>);

35 - Fig. 2, las relaciones filogenéticas entre los virus SIVcpz y SIVgor ensayados para evaluar el ensayo de RT-qPCR de la invención: el árbol deriva de una región *env* pequeña (gp41; 248 pb), construida por BioNJ (64). Las flechas blancas resaltan cepas procedentes del panel de muestra fecal usadas (excepto de CR4112 amplificada solamente en la región *pol*, y CR6278, 6466, 6495, 6534, 6682 amplificadas en una región pequeña de 195 pb de gp41), y las negras (ídem) resaltan cepas procedentes de muestras de plasma. Estas secuencias y otras usadas como referencias proceden de la base de datos del VIH (<http://www.hiv.lanl.gov/>); y

40 - Fig. 3A y 3B, la carga viral de ARN del grupo M del VIH-1 cuantificada mediante el kit Generic de la carga viral del VIH-1 de Biocentric y el ensayo de RT-qPCR según la invención:

45 A- en total, en esta gráfica de linealidad se representaron gráficamente 185 muestras detectadas con ambas técnicas. La línea continua representa la regresión ajustada. Correlación de Pearson  $r$ , 0,95 ( $p < 0,0001$ ). El límite de detección de 2,50  $\log_{10}$  copias/ml está representado por una línea discontinua gris.

50 B- las 185 muestras detectadas con ambas técnicas se representaron gráficamente en esta gráfica de diferencia de Bland-Altman. En el eje vertical, la diferencia entre la carga viral del ensayo de Biocentric y del nuevo ensayo mediante RT-qPCR, frente a la carga viral media entre las dos técnicas, en el eje horizontal. En la gráfica se muestran el sesgo medio en la diferencia (línea continua,  $a = 0,023 \log_{10}$  copias/ml) y los límites de concordancia (líneas discontinuas). En el eje vertical derecho se representan dos límites principales: el límite de  $\pm 0,5 \log_{10}$  copias/ml y el intervalo de CI95 (-0,027 a  $0,072 \log_{10}$  copias/ml).

## Materiales y métodos

## Muestras de plasma negativas para VIH

5 Para la determinación del control negativo y de la especificidad, se dispuso de 72 muestras de plasma negativas para VIH procedentes de pacientes que acuden a un hospital en Yaoundé, Camerún, para una prueba de VIH. La negatividad de estas muestras se determinó mediante diversas pruebas serológicas de VIH (ICE VIH-1.0.2 (Murex Biotech Limited, Dartford, UK), Wellcozyme HIV Recombinant (Murex), Determine VIH-1/2 (Abbott Laboratories, Tokio, Japón)).

## Muestras de plasma del grupo M del VIH-1

10 Para la cuantificación viral se dispuso de un total de 190 extractos de ARN del grupo M del VIH-1 procedentes de muestras de plasma. En la Tabla 1 en lo sucesivo se identifican dichas muestras.

TABLA 1

Subtipo/CRF	Burundi	Camerún	RDC	Togo	Francia	Total
A	2	-	6	-	-	8
B	-	-	-	-	14	14
C	16	1	3	-	-	20
D'	-	3	-	-	-	3
F2	-	3	-	-	-	3
G	-	-	2	3	-	5
H	-	-	3	-	-	3
J	-	-	3	-	-	3
U	-	-	-	-	-	1
CRF01	-	2	1	-	-	3
CRF02	-	34	3	25	-	62
CRF06	-	2	-	3	-	5
CRF11	-	3	1	-	-	4
CRF13	-	-	1	-	-	1
CRF14	-	1	-	-	-	1
CRF18	-	1	-	-	-	1
CRF22	-	8	-	-	-	8
CRF37	-	-	1	-	-	1
URF	-	3	12	6	-	21
Desconocido/No realizado	-	4	-	17	-	23
Total	18	65	39	54	14	190

15 Las 190 muestras se detectaron (posiblemente por debajo del umbral de cuantificación) mediante el kit Generic de la carga viral del VIH-1 de Biocentric, y se ensayaron con el método de la invención. Las muestras provenían de cuatro países diferentes en África y de Francia. Los subtipos o CRFs de estos grupos M del VIH-1 se determinaron mediante análisis de genotipado de la región pol.

Veintitrés muestras permanecieron desconocidas puesto que la región pol no se amplificó para los análisis filogenéticos debido a que la VL estaba por debajo de 1000 copias/ml (límite de detección del ensayo propio de resistencia a fármacos con un volumen de plasma de 200 UL como entrada).

5 Todas las muestras se detectaron previamente de forma analítica con el kit Generic de la carga viral del VIH-1 de Biocentric (4) para estudios clínicos, y se conservaron a -80°C. Su VL osciló entre 1,68 y 7,78 log<sub>10</sub> copias/ml, detectándose analíticamente (amplificación mediante PCR) 12 de las 190 muestras plasmáticas pero bajo el umbral de cuantificación determinado por Biocentric (umbral de cuantificación de Biocentric, 2,5 log<sub>10</sub> copias/ml) (5). Las 178 muestras plasmáticas restantes fueron clínicamente positivas según se cuantificó mediante la técnica de Biocentric (por encima de 2,5 log<sub>10</sub> copias/ml).

10 Para 167/190 muestras plasmáticas positivas para el grupo M del VIH-1 que tuvieron una VL superior a 3 log<sub>10</sub> copias/ml, se amplificó y se secuenció como se describió previamente una región de aproximadamente 1.865 pb en pol (regiones de proteasa y de transcriptasa inversa), principalmente para determinar el perfil de resistencia a fármacos y los genotipos para estudios previos.

15 En la Tabla 1 se muestran los diferentes subtipos y CRFs. La evaluación incluyó muestras plasmáticas procedentes de cuatro países diferentes de África con diferente distribución de subtipos/CRFs del VIH-1: 18 de Burundi y 54 de Togo con una heterogeneidad genotípica relativamente baja (principalmente subtipo C y CRF02, respectivamente), 65 de Camerún y 39 de la RDC con subtipos y CRFs muy diversos. También se incluyeron 14 muestras de plasma con cepas del subtipo B del VIH-1 procedentes del hospital de Montpellier, Francia (34).

El panel cubrió la heterogeneidad de subtipos y CRFs de cepas circulantes del grupo M del VIH-1: se representaron todos los subtipos, a excepción del subtipo K; también estaban presentes las CRFs principales; y se incluyeron 21 URFs. Este panel también comprendió 23 muestras (calificadas como “desconocidas/no realizadas” en la tabla 1 cuyo genotipado no se pudo realizar o no se realizó debido a sus cargas virales bajas (< 3 log<sub>10</sub> copias/ml).

20 Muestras de plasma del grupo O del VIH-1

En la Tabla 2 a continuación se dan los resultados de la detección y cuantificación obtenidos mediante RT-qPCR.

TABLA 2

ID de la muestra	VL (Real Time Abbott)	VL (qRT-PCR nuevo)	$\delta$
Muestras de plasma para cuantificación			
YD1396	2,28	2,43	-0,15
C1/378/LIMA	2,47	2,11	0,37
YD1431	2,53	4,22	-1,69
CM2080	3,04	3,38	-0,35
03/096/A66	3,12	3,84	-0,72
YD656	3,14	4,32	-1,19
CI973	3,18	3,21	-0,03
CM1070	3,29	3,51	-0,22
C1/251/NKPI	3,65	3,70	-0,06
2778/07	3,68	3,61	0,07
MR140	-	3,64	Nuevo + / Abbott -
HJ2464	-	3,16	Nuevo + / Abbott -
HJ2653	-	2,18	Nuevo + / Abbott -
HJ2656	-	3,25	Nuevo + / Abbott -
YD593	-	-	
YD594	-	-	
YD603	-	-	
1689/09	-	-	
2634/08	-	-	

CI706	-	-
up0041	-	-
HJ2722	-	-
Muestras de ADN para detección		
HJ020		3,64
HJ036		4,46
HJ100		4,00
HJ162		3,92
HJ736		-
MI159		4,72
PA206		3,60
SKPI4077		3,32
SKPI1015		5,22

- La Tabla 2 se divide en dos partes principales: la parte superior para muestras de plasma, para ensayar la detección y cuantificación del grupo O del VIH-1; la parte inferior para muestras de ADN, para ensayar la detección del grupo O del VIH-1. Se dan las identificaciones de las muestras. Para cada muestra, las cargas virales (VL en  $\log_{10}$  copias/ml) obtenidas a partir de ambas técnicas se dan si se pudieron detectar (los signos negativos en las columnas de VL reflejan la falta de detección de las muestras), y se calcula la diferencia entre ellas ( $\delta = \text{VL}(\text{Abbott}) - \text{VL}(\text{RT-qPCR nuevo})$ ; en  $\log_{10}$  copias/ml). “Ensayo de la invención + / Abbott -” muestra que solamente el ensayo de la invención pudo detectar y cuantificar las cepas correspondientes.
- Para muestras positivas para el grupo O del VIH-1, se amplificó y secuenció una pequeña región en env (gp41) de aproximadamente 450 pb y/o una región en pol (transcriptasa inversa) de aproximadamente 1.800 pb cuando se dispuso de suficiente material (14/31 muestras).
- Las cepas del grupo O secuenciadas y ensayadas en este estudio cubrieron la diversidad genética del grupo O del VIH-1 como se representa en la Figura 1.
- Muestras plasmáticas de SIVcpz procedentes de chimpancés
- Se ensayaron muestras plasmáticas procedentes de tres chimpancés infectados con SIVcpz descritos previamente y un chimpancé no infectado como control negativo.
- Dos chimpancés SIVcpz<sup>+</sup> (Gab2 y Ch-Go) proceden de la subespecie *Pan troglodytes troglodytes*, y estaban infectados con SIVcpzPtt-Gab2 y SIVcpzPtt Cam155, respectivamente.
- Estas cepas se agrupan en la línea SIVcpzPtt/HIV-1M/HIV-1N próxima a otra SIVcpzPtt que infecta chimpancés de Camerún y de Gabón (Figura 2).
- Ch-No, el tercer chimpancé positivo para SIVcpz, procede de la subespecie *P.t.schweinfurthii*, y estaba infectado con SIVcpzPts-ant que se agrupa en la línea monofilética de cepas de SNcpzPts, fuera de la línea SIVcpzPtt/SIVgor/HIV-1 (8, 9). Muestras plasmáticas secuenciales estaban disponibles para Ch-Go (dos puntos de tiempo separados siete años) y para Ch-No (cuatro puntos de tiempo entre octubre de 1989 y enero de 1991).
- Los resultados se dan en la Tabla 3 a continuación.

TABLA 3

Subespecie de chimpancé	ID del	SIVcpz	ID de la muestra plasmática	Fecha de extracción del ARN	Serología	Detección	Cuantificación (log <sub>10</sub> copias/ml)
Ch-Go <i>P.t.trogodytes</i>		SIVcpzPtt-Cam155	CAM155-01.05.04	26.02.09	+	+	5,12
			CAM155-31.03.11	01.04.11 <sup>a</sup>	+	+	4,64*
Gab2 <i>P.t.trogodytes</i>		SIVcpzPtt-Gab2	GAB2-01.04.88-1	12.04.11	+	+	3,26
			GAB2-01.04.88-2	12.04.11	+	+	3,29
Ch-No <i>P.t.schweinfurthii</i>		SIVcpzPts-ANT	NOAH-29.09.89	12.04.11	+	-	
			NOAH-27.10.89	12.04.11	+	-	
			NOAH-14.04.90	12.04.11	+	+	2,68
			NOAH-08.01.91	12.04.11	+	+	3,98 <sup>#</sup>
Ch-Ni <i>P.t.schweinfurthii</i>		Negativo	NIKO-07.11.89	12.04.11	-	-	
			NIKO-07.11.89	12.04.11	-	-	

Extracción de ARN de VIH/VIS procedente de muestras plasmáticas

Se extrajo ARN de VIH y de VIS a partir de 200 µl de plasma, se conservó a -80°C, usando QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Courtabeuf, Francia), y se eluyó con 60 µl de tampón de elución. Los patrones y el control reproductivo, proporcionados por el kit Generic de la carga viral del VIH-1 de Biocentric (Biocentric, Bandol, Francia), fueron sobrenadantes de cultivo del subtipo B del VIH-1, y se extrajeron con el mismo protocolo.

5

Muestras fecales procedentes de chimpancés y gorilas de vida salvaje infectados con VIS

78 muestras fecales, conservadas en -RNAlater™, procedentes de chimpancés (n = 24) y gorilas (n = 54) de Camerún, que se describe previamente que tienen anticuerpos de reacción cruzada para VIH-1 (10, 11).

10

En estos estudios previos, los fragmentos en las regiones virales pol y/o gp41 procedentes de cinco muestras de chimpancés (5/24) y procedentes de quince muestras de gorila (15/54) se amplificaron y se secuenciaron después de dos a diez extracciones de ARN independientes e intentos de RT-PCR subsiguientes.

Estas cepas representaron la diversidad genética de los virus SIVcpzPtt y SIVgor. Aquí, se extrajo ARN total a partir de 1,5 ml de cada muestra fecal de mono, usando el NucliSens Magnetic Extraction kit (Biomérieux, Craponne, Francia) como se describió previamente (11), para obtener un volumen de extracto de ARN final de 50 µl.

15

Los resultados obtenidos se dan en la Tabla 4 a continuación.

TABLA 4

Muestras fecales	Individuo	Amplificación mediante RT-PCR después de múltiples intentos en diversos extractos de ARN <sup>a</sup>	Amplificación mediante RT-PCR en el extracto de ARN dado <sup>b</sup>	Detección mediante RT-PCR en tiempo real en el extracto de ARN dado <sup>c</sup>	"VL" si se detecta <sup>d</sup>
Chimpancés infectados con SIVcpzPtt					
Cam155-1	Ch-Go	-	-	-	
Cam155-4		-	-	-	
Cam155-2		Pos	Pos	Pos	1,9
Cam155-3		Pos	Pos	Pos	2,56
CR4891	BYc-ID1	Pos	-	Pos	1,63
CR3261	DJc-ID1	Pos	-	-	
CR6369	DJc-ID3	-	-	-	
CR5137	MBc-ID4	-	-	-	
CR5138		-	-	-	
CR6232	MBc-ID8	-	-	-	
CR6233		Pos	Pos	-	
CR6234		-	-	-	
CR6235		-	-	-	
CR6236		-	-	-	
CR6386		-	-	-	
CR6387		-	-	Pos	2,75*
CR6388		-	-	Pos	2,71
CR6254	MBc-ID9	-	-	-	
CR6405	MBc-ID11	-	-	Pos	2,45*

ES 2 545 823 T3

IDII				
CR6406		-	-	-
CR6407		-	-	Pos
CR6413		-	-	-
CR6414		-	-	Pos
Gorilas infectados con SIV gor				
CR6411	MBC-ID10			
CR6684	CPg-ID?	-	-	-
CR3428	CPg-ID01	Pos	-	-
CR3428		Pos	-	Pos
CR6101	CPg-ID02	-	-	-
CR6435	CPg-ID04	-	-	-
CR6437		-	-	-
CR6438		-	-	-
CR6451		-	-	-
CR6473		-	-	-
CR6477		-	-	-
CR6481		-	-	Pos
CR6485		-	-	-
CR6486		-	-	-
CR6495		Pos	-	-
CR6640		-	-	-
CR6641		-	-	Pos
CR6682		Pos	-	-
CR5752	CPg-ID05	-	-	-
CR5803		-	-	-
CR5804		-	-	-
CR5849		-	-	-
CR6442		-	-	Pos
CR6453		-	-	-
CR6465		-	-	Pos
CR6466		Pos	-	-
CR6476		-	-	-
CR6478		-	-	Pos
CR6488		-	-	-
CR6489		-	-	-

ES 2 545 823 T3

CR6685		-	-	-	
CR2744	CPg-ID11	-	-	-	
CR2749		-	-	-	
CR3018	CPg-ID13	-	-	-	
CR3403	CPg-ID30	Pos	-	Pos	1,65
CR3411	CPg-ID31	Pos	-	-	
CR6631	CPg-ID37	-	-	-	
CR6635		-	-	-	
CR4763	CPg-ID38	Pos	Pos	-	
CR5832	CPg-ID60	-	-	-	
CR5816	CPg-ID65	-	-	-	
CR6484		-	-	-	
CR6534	CPg-ID66	Pos	-	-	
CR6555		-	-	-	
CR5810	CPg-ID67	-	-	-	
CR6688	CPg-ID72	-	-	-	
CR6090	CPg-mixto	Pos	Pos	Pos	1,66
CR6091		Pos	Pos	-	
CR3795	DJg-ID1	Pos	-	-	
CR4099b	DJg-ID2	Pos	-	Pos	1,64
CR5265	DJg-ID3	-	-	Pos	1,66
CR4112	DJg-ID4	Pos	-	-	
CR6259	DJg-Idx	-	-	Pos	2,84*
CR6278		Pos	Pos	Pos	2,76*
CR6279		-	-	Pos	2,59
Total		20	7	21	

Desarrollo del ensayo de RT-qPCR en tiempo real para la detección y cuantificación de cepas virales procedentes de la línea VIH-1/SIVcpz/SIVgor

5 Los siguientes cebadores y sonda se diseñaron usando un alineamiento de secuencias de diversas cepas de VIH-1 de los cuatro grupos (M, N, O, y P), virus SIVcpzPtt y SIVcpzPts, y SIVgor. La región de LTR se exploró en primer lugar para determinar su baja variabilidad entre cepas, y se localizaron las mejores posiciones para los cebadores y la sonda.

10 Se diseñó el cebador directo (posición 523-539 de HXB2) de secuencia SEC ID N°3: 5'-SSCTCAATAAAGCTTGCC-3'), y el cebador inverso (posición 622-642 de HXB2) de secuencia SEC ID N°4: 5'-AAAATCTCTAGCAGTGGCGCC-3' fue como Rouet et al. 2007 (15).

Amplificaron un fragmento pequeño de 120 pb. Estos cebadores se ajustaron para amplificar los grupos M, N, O, y P del VIH-1, virus SIVcpzPtt, SIVcpzPts, y SIVgor, puesto que coincidieron en todas las secuencias con una homología del 100%.

La nueva sonda (posición 588-603 de HXB2) de secuencia SEC ID N°1: 5'-CTAGAGATCCCTCAGA-3' fue una sonda TaqMan interna inversa que porta un informador de FAM en 5' y un desactivador no fluorescente que se une al surco menor en 3' (Applied Biosystems, Foster City, CA).

- 5 La secuencia de la sonda se diseñó para unirse con todos los grupos del VIH-1 (secuencias ensayadas) de los virus SIVcpzPtt, y SIVgor. Es de señalar que se observó un resto nucleotídico desemparejado en el extremo 3' para tres cepas de SIVcpzPts (SIVcpzPtsTAN1, 2, 3).

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 20 µl que contiene 10 µl de extracto de ARN, los cebadores y la sonda a 500 nM, 1X de TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix (Applied Biosystems), y agua libre de ARNasa hasta el volumen final.

- 10 Las condiciones del ciclado térmico fueron como siguen: transcripción inversa a 50°C durante 5 min., inactivación de RT y desnaturalización inicial a 95°C durante 20 s, y amplificación con 50 ciclos a 95°C durante 3 s y 58°C durante 30 s (duración total ~ 70 min.).

El ciclado y la adquisición de datos se llevaron a cabo usando el sistema 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems).

- 15 Se usaron cinco patrones: del Optiquant™ VIH-1 RNA Quantification Panel (2,78, 3,78, 4,78, 5,78, 6,78 log<sub>10</sub> copias/ml) y el Optiquant™ VIH-1 RNA low-positive control (3,78 log<sub>10</sub> copias/ml) (Biocentric).

El límite inferior máximo al que una muestra se puede cuantificar de forma correcta se evaluó diluyendo el patrón de 3,78 log<sub>10</sub> copias/ml hasta dos concentraciones bajas (2,50 y 1,78 log<sub>10</sub> copias/ml). Se ensayaron en ocho réplicas.

Técnicas de referencia de RT-qPCR

- 20 El ensayo Generic de la carga viral del VIH-1 de Biocentric se usó como una referencia para la detección y cuantificación del grupo M, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo de Biocentric se validó previamente en comparación con Versant bDNA HIV RNA kit v3.0 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) y Amplicor VIH-1 Monitor standard RT-PCR assay v1.5 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) 5, 7) en vista de su capacidad para detectar una amplia diversidad de subtipos y CRFs del grupo M del VIH-1.

- 25 Usando 200 µl de plasma, el umbral del ensayo de Biocentric se estableció a 2,50 log<sub>10</sub> copias/ml. La duración total de la amplificación fue ~120-140 min.

El ciclado y la adquisición de datos se llevaron a cabo usando el ABI Prism 7000 Sequence Detection System o el 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems).

- 30 Como referencia para la detección y cuantificación del grupo O, se usó el ensayo de VIH-1 Abbott m2000rt RealTime™ (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL), puesto que se validó previamente para la cuantificación de muestras del grupo O del VIH-1. La técnica se llevó a cabo en el laboratorio de IMPM/IRD en Yaoundé, Camerún, según las instrucciones del fabricante.

Análisis estadísticos

- 35 Para todos los análisis estadísticos descritos se usó el paquete de software STATA versión 10.1 (Stata Corp., College Station, Texas). Los patrones y el control de bajo positivo se ensayaron en diez experimentos independientes para determinar la reproducibilidad, la linealidad, y la variabilidad entre experimentos de nuestra técnica de RT-qPCR. La variabilidad dentro del experimento se evaluó ensayando seis muestras diferentes (cinco patrones y el control poco reproductivo) en ocho réplicas en el mismo experimento. La especificidad del ensayo se calculó como el número de muestras negativas del número total de muestras ensayadas de individuos no infectados. La sensibilidad analítica para ARN del grupo M del VIH-1 se calculó como el número de muestras detectadas con la técnica según la invención dividido entre el número de muestras detectadas con el ensayo Generic de Biocentric, incluyendo muestras por debajo del umbral de cuantificación. La correlación entre los resultados de la prueba Generic de Biocentric y el ensayo de RT-qPCR de la invención se midió mediante un coeficiente de correlación de Pearson y mediante un coeficiente de correlación de rangos de Spearman para resultados procedentes de cada país. Se generó una gráfica de diferencia de Bland-Altman para las medidas del sesgo y concordancia, incluyendo límites de concordancia (12).
- 45

Resultados

Reproducibilidad, y variaciones entre y dentro de los experimentos

- 50 La reproducibilidad entre ensayos de la curva patrón con el método de RT-qPCR de la invención se evaluó en diez ensayos independientes. En todos los casos, hubo una fuerte correlación lineal entre los valores del umbral del ciclo encontrados en cada experimento y la carga viral (log<sub>10</sub> copias/ml) con un coeficiente de correlación de la mediana de 1,00 (intervalo, 0,99 a 1,00). La pendiente media de la curva patrón fue -3.33 (intervalo, -3,44 a -3,15), que corresponde a una eficiencia media de amplificación de 99,2%. El patrón con la concentración más baja (2,78 log<sub>10</sub> copias/ml) se detectó y amplificó siempre. La muestra diluida a 2,50 log<sub>10</sub> copias/ml se detectó y cuantificó siempre

- con un coeficiente de variación bajo (inferior a 15%), mientras que la muestra diluida a 1,78 log<sub>10</sub> copias/ml se detectó en seis de ocho réplicas. De este modo, nuestro ensayo de RT-qPCR tiene un umbral de cuantificación inferior a 2,50 log<sub>10</sub> copias/ml usando un volumen de entrada de 200 µl de plasma (límite incluido en el intervalo de 1,78-2,50 log<sub>10</sub> copias/ml). El control de positivo bajo a 3,78 log<sub>10</sub> copias/ml se añadió a cada prueba, y se usó para evaluar adicionalmente la reproducibilidad y determinar la variación entre experimentos. El valor medio de este control positivo fue 3,83 log<sub>10</sub> copias/ml (SD, +/- 0,19), con un coeficiente de variación de 4,8%.
- Estos datos son muy similares a lo que se ha determinado para el ensayo Generic de la carga viral del VIH de Biocentric, conformando una buena reproducibilidad entre experimentos.
- Para evaluar la variación dentro del experimento, los patrones (n = 5) y el control de positivo bajo se replicaron cada uno ocho veces en el mismo experimento. El control de positivo bajo y los patrones se detectaron siempre y se cuantificaron correctamente con un coeficiente de variación medio de 4,0% (SD, +/- 0,2).
- Los análisis de muestras del grupo M del VIH-1 y muestras negativas para VIH muestran que el ensayo tiene una buena sensibilidad y especificidad.
- Para la evaluación analítica, se detectó un total de 190 muestras plasmáticas positivas para el grupo M del VIH-1 mediante el ensayo Generic de la carga viral del VIH de Biocentric, y se ensayaron con la nueva prueba de RT-qPCR (intervalo de la VL, 1,68 a 7,78 log<sub>10</sub> copias/ml).
- De ellas, 185 muestras plasmáticas se detectaron de forma eficaz con la técnica de la invención (intervalo de la VL, 2,14 a 8,07 log<sub>10</sub> copias/ml).
- La sensibilidad analítica del ensayo según la invención se pudo estimar a 97,4% (CI95, 94,0 a 99,1%).
- Cinco muestras, con una carga viral de Biocentric entre 2,18 y 3,04 log<sub>10</sub> copias/ml, no se detectaron con nuestro ensayo, incluyendo tres por debajo del umbral de cuantificación de Biocentric (2,5 log<sub>10</sub> copias/ml).
- Dos muestras tuvieron una carga viral superior al umbral de cuantificación: una procedente de Camerún (VL(Biocentric), 3,04 log<sub>10</sub> copias/ml) cuyo genotipo no se pudo obtener a pesar de dos intentos de amplificación en la región pol conservada, y una procedente de la RDC (VL, 2,94 log<sub>10</sub> copias/ml) sin ningún genotipado disponible.
- La especificidad de la prueba se evaluó con 72 muestras negativas para VIH procedentes de Camerún. Todas las muestras produjeron resultados negativos con nuestra prueba. De este modo, la especificidad del ensayo fue 100% (CI95, 95,9 a 100%).
- Correlación excelente entre la prueba según la invención y el ensayo de referencia de Biocentric para la cuantificación del grupo M del VIH-1, independientemente del genotipo
- Los resultados de la carga viral del VIH de Biocentric y las medidas de la carga viral del ensayo de RT-qPCR según la invención estuvieron disponibles para 185 muestras plasmáticas del grupo M del VIH-1.
- Se encontró una excelente correlación entre los resultados de ambos ensayos (coeficiente de correlación de Pearson r = 0,95; p < 0,0001).
- Considerando el umbral de cuantificación de 2,5 log<sub>10</sub> copias/ml, el ensayo de Biocentric y la prueba de RT-qPCR de la invención cuantificaron 178 y 179 muestras por encima de este límite, respectivamente.
- Tres muestras estuvieron por debajo del umbral con ambas técnicas, mientras que cuatro y tres muestras estuvieron por debajo del umbral con Biocentric y el ensayo de la invención, respectivamente.
- La concordancia entre los dos ensayos se determinó mediante la gráfica de diferencia de Bland-Altman (Figura 3B) (12). La diferencia media de la carga viral entre las dos pruebas fue 0,02 log<sub>10</sub> copias/ml, y no fue significativamente diferente de 0 (p = 0,37). De forma importante, la diferencia entre ambos ensayos no aumentó a cargas virales bajas o altas (ninguna correlación entre la diferencia y la media de las cargas virales de ambos ensayos, r = 0,09; p = 0,24). La desviación estándar fue de 0,34 log<sub>10</sub> copias/ml, y el intervalo de confianza del 95% osciló desde -0,03 hasta 0,07, incluido en los límites de +/- 0.50 log<sub>10</sub> copias/ml (45). En total, 95,1% de las 185 muestras cuantificadas estaban dentro de los límites de concordancia (media +/- 1,96 SD).
- Dos muestras, subtipo H y CRF02, tuvieron una mayor carga viral con la técnica de Biocentric (Tabla 1).
- Sin embargo, siete muestras: un subtipo B, una CRF22, una CRF37, dos CRF02, y dos con genotipo desconocido, tuvieron mayor carga viral con nuestro nuevo método de RT-qPCR, con una diferencia media de -0,92 log<sub>10</sub> copias/ml.
- El panel ensayado de muestras del grupo M del VIH-1 fue muy diverso y cubrió la diversidad genética de los subtipos y CRFs del grupo M del VIH-1. Cada subtipo o CRF se representó por una a 62 muestras. Las muestras para este estudio procedieron de cuatro países diferentes de África con epidemiología molecular del VIH-1 muy

distinta, y de un hospital en Francia. Para determinar si estas diferentes situaciones epidemiológicas moleculares afectarían negativamente sobre el ensayo cuantitativo según la invención, se llevó a cabo para cada país estudiado una evaluación de la correlación entre Biocentric y la técnica de la invención.

5 Se encontró que para cada país africano, el coeficiente de correlación de Spearman entre las dos técnicas fue superior a 0,95 ( $p < 0,0001$ ), independientemente de la situación epidemiológica molecular (es decir, el panel de Burundi tuvo muestras mayoritariamente del subtipo C, mientras que el panel de la RDC poseyó una diversidad genética elevada con 11 subtipos o CRFs diferentes, 12 URFs y 2 de genotipo desconocido. El ensayo de la invención mostró así una muy buena capacidad para cuantificar la carga viral de las muestras plasmáticas del grupo M del VIH-1, independientemente de la situación epidemiológica molecular y del genotipo del grupo M del VIH-1.

10 Detección y cuantificación de cepas del grupo O del VIH-1

Se ensayaron 31 muestras del grupo O del VIH-1 en busca de la detección viral con el ensayo de RT-qPCR según la invención, 22 fueron muestras plasmáticas previamente ensayadas con el kit de Abbott RealTime™, y nueve fueron extractos de ADN con confirmación de secuencia del grupo O del VIH-1 (Tabla 2).

15 Con el método de la invención, se detectaron las diez muestras plasmáticas del grupo O del VIH-1 que se detectaron previamente con el kit de Abbott, mostrando que el ensayo de la invención puede detectar fácilmente virus del grupo O del VIH-1.

Entonces se llevó a cabo una comparación entre las cargas virales de cada muestra plasmática evaluada con la técnica de la invención y con el ensayo de Abbott RealTime™.

20 Para siete de diez muestras del grupo O del VIH-1, se encontró una buena correlación, con una diferencia media de la carga viral de  $-0,05 \log_{10}$  copias/ml (intervalo de  $\delta$  VL(Abbott) - VL(qRT-PCR nuevo),  $-0,35$  a  $0,37 \log_{10}$  copias/ml).

Tres muestras se cuantificaron con una carga viral significativamente mayor que la técnica de Abbott ( $\delta$ ,  $-0,72$ ,  $-1,19$ , y  $-1,69 \log_{10}$  copias/ml).

De forma importante, se pudieron detectar cuatro cepas adicionales del grupo O del VIH-1 que no fueron detectadas mediante el método de referencia. Las cargas virales de estas cuatro muestras oscilaron de  $2,18$  a  $3,64 \log_{10}$ /ml.

25 De este modo, la técnica de la invención permitió detectar y cuantificar más ARN viral del grupo O del VIH-1 que el método de referencia (mayor sensibilidad analítica, 64% frente a 45%), y algunas muestras detectadas mediante ambos métodos tuvieron mayores cargas virales con el método de la invención.

Como se muestra por los árboles filogenéticos en las regiones *pol* y *env* (Fig.1), las cepas del panel cubrieron la diversidad del grupo O del VIH-1 en estas regiones.

30 Estos datos muestran claramente que la técnica de la invención proporciona una mejor cuantificación de los virus del grupo O del VIH-1 que la prueba comercial de referencia, independientemente de la diversidad genética.

Detección y cuantificación de ARN de SIVcpzPtt y SIVcpzPts

35 Las cepas de SIVcpz procedentes de los tres chimpancés infectados se detectaron fácilmente con el ensayo de la invención, mientras que las dos muestras plasmáticas de Ch-Ni, el chimpancé negativo para VIS, fueron negativas (Tabla 3), mostrando que el ensayo de RT-qPCR de la invención fue capaz de detectar específicamente ambas cepas SIVcpzPts y SIVcpzPtt.

Las muestras plasmáticas de Cam155 se detectaron y cuantificaron todas, y tuvieron cargas virales de aproximadamente  $5 \log_{10}$  copias/ml (Tabla 3).

40 Previamente, la cuantificación de la concentración plasmática de ARN de SWcpzPttCam155 se llevó a cabo también con el ensayo de bDNA en el año 2004 (Versant VIH-1 RNA 3.0) y la prueba de Abbott RealTime™ en el año 2011. En el año 2004, la VL(Versant) fue  $5,09 \log_{10}$  copias/ml, no significativamente diferente de la carga viral encontrada con el ensayo de RT-qPCR de la invención. Sin embargo, se encontró una carga viral de  $3,76 \log_{10}$  copias/ml con la prueba de Abbott en el año 2011, que fue significativamente menor que con la técnica de la invención ( $\delta$ ,  $-1,02 \log_{10}$  copias/ml).

45 El ensayo de la invención permitió detectar y cuantificar SIVcpzPttGab2 de una muestra plasmática de chimpancé Gab2 extraída en abril de 1988. Se llevaron a cabo dos extracciones y cuantificaciones de ARN independientes, y se encontraron cargas virales similares de alrededor de  $3 \log_{10}$  copias/ml (Tabla 3). La cepa que infecta a Ch-No procede de la línea SIVcpzPts, un clado más divergente de VIH-1 que SIVcpzPtt. Sin embargo, la prueba de la invención todavía fue capaz de detectar y cuantificar esta variante divergente. Para Ch-No, se usaron cuatro  
50 muestras de sangre secuenciales tomadas entre septiembre de 1989 y enero de 1991: las dos primeras al final del año 1989 tuvieron una carga viral indetectable, y las dos últimas en abril de 1990 y en enero de 1991 tuvieron cargas virales detectables de  $2,68$  y  $3,98 \log_{10}$  copias/ml, respectivamente.

- 5 Previamente, Kestens y colegas observaron un patrón fluctuante con la medida de títulos virales en plasma que varía desde indetectables hasta 1.000 TCID/ml. Desde el final del año 1997 hasta 2001 (es decir, fechas después del panel de la invención), Ondoa et al. cuantificaron ARN viral procedente de muestras plasmáticas de Ch-No con un ensayo específico propio, y los valores variaron desde 3,93 hasta 5,80 log<sub>10</sub> copias/ml (13, 14) en el intervalo de las cargas virales encontradas según la invención.
- Por lo tanto, a pesar de las distancias genéticas elevadas entre cepas de SIVcpz, el ensayo según la invención fue capaz de detectar y cuantificar el ARN de SIVcpzPtt y de SIVcpzPts procedente de muestras plasmáticas de chimpancé.
- Detección de SIVcpz y SIVgor a partir de muestras fecales
- 10 Aquí, la detección de ARN viral de SIVcpzPtt y de SIVgor a partir de muestras fecales se ensayó (i) para determinar si el ensayo de RT-PCR en tiempo real de la invención fue capaz de detectar ambos tipos de virus, ancestros directos de todos los grupos del VIH-1, y (ii) para ensayar si este ensayo fue suficientemente sensible para la detección viral en muestras fecales.
- 15 Se ensayó mediante serología que 24 muestras fecales procedentes de nueve chimpancés *P.t.troglodytes* diferentes estaban infectados con SIVcpzPtt. Puesto que estos chimpancés procedieron de cuatro localizaciones diferentes en el sur de Camerún, y debido al agrupamiento filogeográfico de SIVcpzPtt, se esperaba que los virus ensayados tuviesen distancias genéticas elevadas entre ellos, lo que se pudo confirmar para cuatro de ellos.
- 20 Aquí, a partir de un único extracto de ARN, SIVcpzPtt se pudo amplificar a partir de solamente tres muestras fecales (correspondientes a dos individuos) con el RT-PCR convencional, mientras que SIVcpzPtt se pudo detectar a partir de ocho muestras fecales (correspondientes a cuatro individuos) con el ensayo de RT-PCR en tiempo real (Tabla 4).
- Los análisis de secuencias confirmaron que los fragmentos de LTR amplificados correspondieron a SIVcpzPtt. De este modo, es posible detectar SIVcpzPtt en muestras fecales usando este sistema de RT-PCR en tiempo real. La sensibilidad del ensayo según la invención es mejor que con RT-PCR convencional.
- 25 Además, se ensayaron 54 muestras fecales de 22 individuos *G.g.gorilla* de Camerún, que se mostró previamente, mediante serología, que estaban infectados con SIVgor.
- En estudios previos de los inventores, fragmentos pequeños de SIVgor se amplificaron y secuenciaron con una RT-PCR convencional en solamente 15 muestras después de múltiples extracciones e intentos de amplificación.
- 30 Aquí, en un único extracto de ARN, los virus de SIVgor procedentes de solamente cuatro muestras fecales (que corresponden a tres gorilas infectados) se pudieron amplificar con la RT-PCR convencional, mientras que los virus de SIVgor se pudieron detectar en 13 muestras fecales (que corresponden a ocho individuos) con el ensayo de RT-PCR en tiempo real de la invención (Tabla 4).
- Mediante análisis de secuenciación de LTR, se confirmó que los fragmentos amplificados correspondían a SIVgor.
- Los resultados anteriores establecen claramente que el método de la invención es así capaz de detectar virus de SIVgor en muestras fecales.
- 35 Después de un intento, el ensayo en tiempo real de la invención fue capaz de detectar cepas de SIVgor en 24% de las muestras, en comparación con solamente 7% con el método convencional.
- 40 Como se muestra mediante los resultados anteriores, las herramientas y el ensayo de RT-PCR en tiempo real de la invención permiten detectar y cuantificar un amplio intervalo de variantes del VIH-1 y sus progenitores SIVcpz y SIVgor, que infectan a chimpancés y gorilas respectivamente. El coste por reacción fue comparable a los costes de otros ensayos genéricos o "propios", y lo más importante, muy inferior a los ensayos comerciales de alrededor de 50-100 \$ por reacción.
- 45 Ventajosamente, el ensayo de la invención tiene una eficiencia de PCR elevada con variaciones bajas entre y en los experimentos (coeficientes de variación, 4,8% y 4,0%, respectivamente). El umbral de cuantificación fue inferior a 2,50 log<sub>10</sub> copias/ml (intervalo, 1,68 a 2,50) con un volumen de entrada de 200 µl, que es comparable a ensayos comerciales con el mismo volumen de entrada. Estas características técnicas también son similares a las dadas a conocer para otros ensayos genéricos o "propios".
- 50 La especificidad de la prueba según la invención fue 100% (CI95, 95,9 - 100%). Este parámetro es esencial para un buen ensayo de carga viral, puesto que un resultado de falso positivo podría tener consecuencias adversas para un paciente en ART con una carga viral normalmente indetectable. La sensibilidad analítica de este nuevo ensayo en tiempo real, 97,4% (CI95, 94,0 a 99,1%), se calculó en 190 muestras positivas para el grupo M del VIH-1 previamente ensayadas con el kit Generic de Biocentric (intervalo de VL, 1,68 a 7,78 log<sub>10</sub> copias/ml). Se detectaron efectivamente ocho muestras con una carga viral entre 2,5 y 3 log<sub>10</sub> copias/ml, y otras siete con una carga viral inferior a 2,5 log<sub>10</sub> copias/ml según el ensayo de Biocentric se pudieron detectar usando el ensayo de la invención.

El ensayo Generic de Biocentric y la prueba de RT-qPCR según la invención están muy correlacionados ( $r = 0,95$ ,  $p < 0,0001$ ) sin diferencia significativa entre su carga viral media ( $p = 0,37$ ) según se evalúa en 185 muestras del grupo M del VIH-1 (intervalo, 1,68 a 7,78  $\log_{10}$  copias/ml), y el 95,1% de las muestras cuantificadas estaban dentro de los límites de concordancia entre los dos métodos (media  $\pm 1,96$  SD) (12). Siete muestras procedentes de diversos subtipos se cuantificaron significativamente mejor con el método de la invención ( $\hat{c} > \pm 0,5 \log_{10}$  copias/ml). De forma importante, tres de ellas tuvieron cargas virales por debajo del umbral de Biocentric, pero se cuantificaron con el ensayo de la invención por encima del límite de 2,5  $\log_{10}$  copias/ml.

El panel usado según la invención incluyó muestras del grupo M del VIH-1 procedentes de cinco países diferentes (cuatro en África y uno en Europa) con una distribución de subtipos/CRFs del VIH-1 muy diversa, incluyendo 39 muestras procedentes de la RDC y 65 de Camerún, dos países con diversidad genética amplia. Para cada país, se encontró una correlación excelente entre los resultados de ambos métodos para la VL, mostrando que la diversidad del grupo M del VIH-1 no afectó negativamente sobre la cuantificación viral llevada a cabo según la invención. Este aspecto es de gran importancia, y los ensayos de la VL deberían ser validados siempre y evaluados posteriormente en diferentes países con rasgos epidemiológicos moleculares diferentes, como se ha realizado para diversos ensayos “propios” previos desarrollados para escenarios con recursos limitados.

A diferencia de las pruebas “propias” descritas previamente, el ensayo de RT-qPCR de la invención también fue capaz de detectar y cuantificar virus del grupo O del VIH-1 a partir de muestras plasmáticas. De forma importante, de 22 muestras del grupo O, cuatro muestras que no se detectaron mediante el ensayo de Abbott Real-time™ se detectaron y se cuantificaron llevando a cabo el ensayo de la invención, y en tres muestras se midieron mayores cargas virales ( $\hat{c}$ , -1,69 a -0,72), mostrando que el método de la invención es más sensible que el ensayo comercial.

En los experimentos llevados a cabo según la invención, se ensayó un número significativamente elevado de cepas del grupo O del VIH-1 (22 muestras plasmáticas y nueve extractos de ADN, que representan 31 cepas diferentes del grupo O del VIH-1). De forma importante, el panel del grupo O cubrió la diversidad genética del grupo O del VIH-1, reflejando que la elevada diversidad genética de este grupo no influyó sobre la detección. El nuevo ensayo tiene entonces la capacidad para detectar cepas muy divergentes (grupos N y P del VIH-1) como se encuentran en solamente pocos casos en seres humanos, puesto que puede detectar cepas de SIVcpz y SIVgor genéticamente distantes.

Debido al riesgo continuado de transmisiones de VIS entre especies desde monos a seres humanos, y a la necesidad de realizar el seguimiento de la infección por SIVcpz y SIVgor en sus hospedantes naturales para comprender mejor la patogenicidad de estos progenitores del VIH-1 en sus hospedantes naturales, el ensayo también se desarrolló con la meta de detectar y cuantificar todos los virus del clado VIH-1/SIVcpz/SIVgor.

Como se muestra por los resultados dados anteriormente, el ensayo de la invención es particularmente útil para detectar y cuantificar virus SIVcpzPtt y SIVcpzPts en muestras plasmáticas procedentes de chimpancés del África occidental y del África central oriental. Las cargas virales de SIVcpz plasmáticas encontradas en chimpancés infectados de forma natural parecen estar en el intervalo de las cargas virales del VIH-1 en seres humanos. Además, se detectó SIVcpzPtt a partir de 33% de muestras fecales de chimpancés seropositivos a VIS con el ensayo en tiempo real de la invención, frente a un éxito de amplificación (en el primer intento) de 13% en el mismo panel con una RT-PCR básica en fragmentos pequeños de pol o env. La prueba también fue capaz de detectar virus SIVgor, precursores del grupo P del VIH-1 y ancestros probables del grupo O del VIH-1.

Las cepas de SIVgor se amplificaron a partir de 24% de 54 muestras fecales de gorilas seropositivos a VIS, frente a 7% de éxito de amplificación en el mismo panel en el primer intento con una RT-PCR convencional usando cebadores específicos de SIVgor dirigidos contra un fragmento pequeño gp41.

El nuevo ensayo puede ser un buen complemento para la RT-PCR básica para confirmar la presencia viral en muestras seropositivas. Los resultados también confirman que las cargas virales de SIVcpz y SIVgor son muy bajas en muestras fecales. De forma interesante, las cargas virales de SIVcpzPtt tanto de muestras plasmáticas como fecales se pudieron ensayar para Ch-Go, y se encontró una diferencia de más de 100 veces entre ambos compartimentos (Tablas 3 y 4, primeras líneas). La amplificación de tales variantes divergentes, SIVcpz y SIVgor, no fue posible con la técnica de Biocentric, y la cuantificación de SIVcpz pareció ser subóptima con el ensayo de Abbott Real-Time™. Por lo tanto, la prueba de RT-PCR en tiempo real de la invención es una nueva oportunidad para detectar nuevos virus emergentes posibles de la inmunodeficiencia del simio desde monos hacia seres humanos.

En conclusión, la invención proporciona un ensayo de RT-PCR en tiempo real de coste relativamente bajo capaz de detectar y cuantificar todas las cepas virales del clado VIH-1/SIVcpz/SIVgor, lo que quiere decir que la diversidad del VIH-1 está cubierta y que también se pueden monitorizar los precursores del VIH-1. Esta nueva prueba es de este modo un avance en el campo de la cuantificación de la carga viral, puesto que podría monitorizar cualesquiera cepas del VIH-1 actualmente en circulación en seres humanos, pero también podría detectar nuevas apariciones del VIS de SIVcpz/SIVgor en seres humanos.

## Referencias

1. Lambert, J. S., D. R. Harris, E. R. Stiehm, J. Moye, Jr., M. G. Fowler, W. A. Meyer, 3rd, J. Bethel, y L. M. Mofenson. 2003. Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34:512-519.
- 5 2. Fiscus, S. A., B. Cheng, S. M. Crowe, L. Demeter, C. Jennings, V. Miller, R. Respass, y W. Stevens. 2006. HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *PLoS medicine* 3:e417.
3. Plantier, J. C., M. Leoz, J. E. Dickerson, F. De Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemeé, F. Damond, D. L. Robertson, y F. Simon. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* 15:871-872.
- 10 4. Drosten, C., M. Panning, J. F. Drexler, F. Hansel, C. Pedroso, J. Yeats, L. K. de Souza Luna, M. Samuel, B. Liedigk, U. Lippert, M. Sturmer, H. W. Doerr, C. Brites, y W. Preiser. 2006. Ultrasensitive monitoring of HIV-1 viral load by a low-cost real-time reverse transcription-PCR assay with internal control for the 5' long terminal repeat domain. *Clinical chemistry* 52:1258-1266.
- 15 5. Rouet, F., D. K. Ekouevi, M. L. Chaix, M. Burgard, A. Inwoley, T. D. Tony, C. Danel, X. Anglaret, V. Leroy, P. Msellati, F. Dabis, y C. Rouzioux. 2005. Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. *J Clin Microbiol* 43:2709-2717.
6. Gueudin, M., J. C. Plantier, F. Damond, P. Roques, P. Mauclore, y F. Simon. 2003. Plasma viral RNA assay in HIV-1 group O infection by real-time PCR. *Journal of virological methods* 113:43-49.
- 20 7. Rouet, F., M. L. Chaix, E. Nerrienet, N. Ngo-Giang-Huong, J. C. Plantier, M. Burgard, M. Peeters, F. Damond, D. K. Ekouevi, P. Msellati, L. Ferradini, S. Rukobo, V. Marechal, N. Schvachsa, L. Wakrim, C. Rafalimanana, B. Rakotoambinina, J. P. Viard, J. M. Seigneurin, y C. Rouzioux. 2007. Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA Quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45:380-388.
- 25 8. Peeters, M., K. Fransen, E. Delaporte, M. Van den Haesevelde, G. M. Gershy-Damet, L. Kestens, G. van der Groen, y P. Piot. 1992. Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS* 6:447-451.
- 30 9. Vanden Haesevelde, M. M., M. Peeters, G. Jannes, W. Janssens, G. van der Groen, P. M. Sharp, y E. Saman. 1996. Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. *Virology* 221:346-350.
- 35 10. Neel, C., L. Etienne, Y. Li, J. Takehisa, R. S. Rudicell, 1. N. Bass, J. Moudindo, A. Mebenga, A. Esteban, F. Van Heuverswyn, F. Liegeois, P. J. Kranzusch, P. D. Walsh, C. M. Sanz, D. B. Morgan, J. B. Ndjango, J. C. Plantier, S. Locatelli, M. K. Gonder, F. H. Leendertz, C. Boesch, A. Todd, E. Delaporte, E. Mpoudi-Ngole, B. H. Hahn, y M. Peeters. 2010. Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas. *Journal of virology* 84:1464-1476.
11. Etienne, L., S. Locatelli, A. Ayouba, A. Esteban, C. Butel, F. Liegeois, A. Aghokeng, E. Delaporte, E. Mpoudi Ngole, y M. Peeters. 2012. Non-invasive follow-up of simian immunodeficiency virus infection in wild-living non-habituated western lowland gorillas in Cameroon. *Journal of virology*.
- 40 12. Bland, J. M., y D. G. Altman. 1999. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical methods in medical research* 8:135-160.
13. Ondoa, P., L. Kestens, D. Davis, C. Vereecken, B. Willems, K. Fransen, J. Vingerhoets, G. Zissis, P. ten Haaft, J. Heeney, y G. van der Groen. 2001. Longitudinal comparison of virus load parameters and CD8 T-cell suppressive capacity in two SIVcpz-infected chimpanzees. *Journal of medical primatology* 30:243-253.
- 45 14. Ondoa, P., D. Davis, B. Willems, L. Heyndrickx, L. Kestens, 1. van der Berg, S. Coppens, W. Janssens, J. Heeney, y G. van der Groen. 2001. Genetic variability of the V1 and V2 env domains of SIVcpz-ant and neutralization pattern of plasma viruses in a chimpanzee infected naturally. *Journal of medical virology* 65:765-776.
15. Rouet, F., H. Menan, J. Viljoen, N. Ngo-Giang-Huong, K. Mandaliya, D. Valea, T. X. Lien, S. Danaviah, D. Rousset, A. Ganon, y E. Nerrienet. 2008. In-house HIV-1 RNA real-time RT-PCR assays: principle, available tests and usefulness in developing countries. *Expert review of molecular diagnostics* 8:635-650.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IRD

<120> HERRAMIENTAS Y MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS VIH-1, SIVcpz Y SIVgor GENÉTICAMENTE DIVERSOS

<130> CP/BB 63347-

<160> 5

5 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Fragmento nucleico

<400> 1

ctagagatcc ctcaga 16

<210> 2

15 <211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento nucleico

20 <400> 2

tctgagggat ctctag 16

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 3

ssctcaataa agcttgcc 18

30 <210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador

<400> 4

aaaatctcta gcagtgccgc c 21

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador

<400> 5 21

ggcgccactg ctagagattt t 21

**REIVINDICACIONES**

1. Oligonucleótido de secuencia SEC ID N° 1:

5'-CTAGAGATCCCTCAGA - 3',

o su secuencia complementaria de secuencia SEC ID N° 2:

5 5'- TCTGAGGGATCTCTAG - 3'

útil como sonda para detectar y cuantificar todas las formas circulantes del VIH-1 y sus precursores SIVcpz/SIVgor.

2. La sonda de la reivindicación 1, que consiste en una sonda Taqman con un marcador fluorescente en la posición 5' y un desactivador en la posición 3'.

10 3. Conjunto de cebadores/sonda, en el que los cebadores consisten en un cebador directo de secuencia SEC ID N°3:

5'-SSCTCAATAAAGCTTGCC-3'

en la que S representa G o C

y un cebador inverso de secuencia SEC ID N°4:

5'-AAAATCTCTAGCAGTGGCGCC-3'

15 o su secuencia complementaria de secuencia SEC ID N°5:

5 - GGCGCCACTGCTAGAGATTTT - 3'

y la sonda de dicho conjunto es según la reivindicación 1 o 2.

4. Un método para detectar y cuantificar en una muestra de ensayo formas circulantes del VIH-1 y sus precursores SIVcpz/SIVgor, comprendiendo dicho método las etapas de

20 - formar una mezcla de reacción que comprende un conjunto de cebadores/sonda tal como se define en la reivindicación 3 y una muestra de ensayo que contiene una secuencia diana del VIH-1, o sus precursores SIVcpz/SIVgor,

- colocar la mezcla de reacción en condiciones de amplificación para formar un producto de amplificación y detectar el híbrido de producto/sonda como una indicación de la presencia de dichos virus en la muestra,

25 - formar un híbrido entre el producto de amplificación y una sonda,

- detectar el híbrido como una indicación de la presencia de HIV-1/SIVcpz/SIVgor en la muestra de ensayo.

5. Kits para detectar y cuantificar en una muestra de ensayo formas circulantes del VIH-1 y sus precursores SIVcpz/SIVgor, que comprenden un conjunto de cebadores/sonda como se define en la reivindicación 3 en recipientes adecuados y provistos de reactivos adicionales, tales como reactivos de amplificación.

30

Figura 1

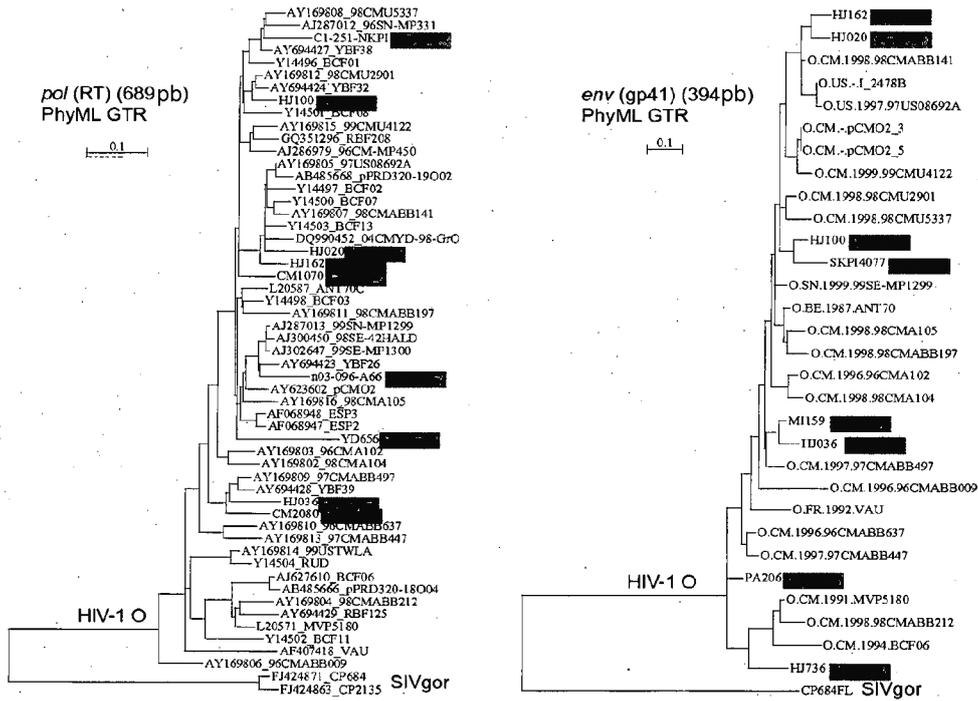


Figura 2

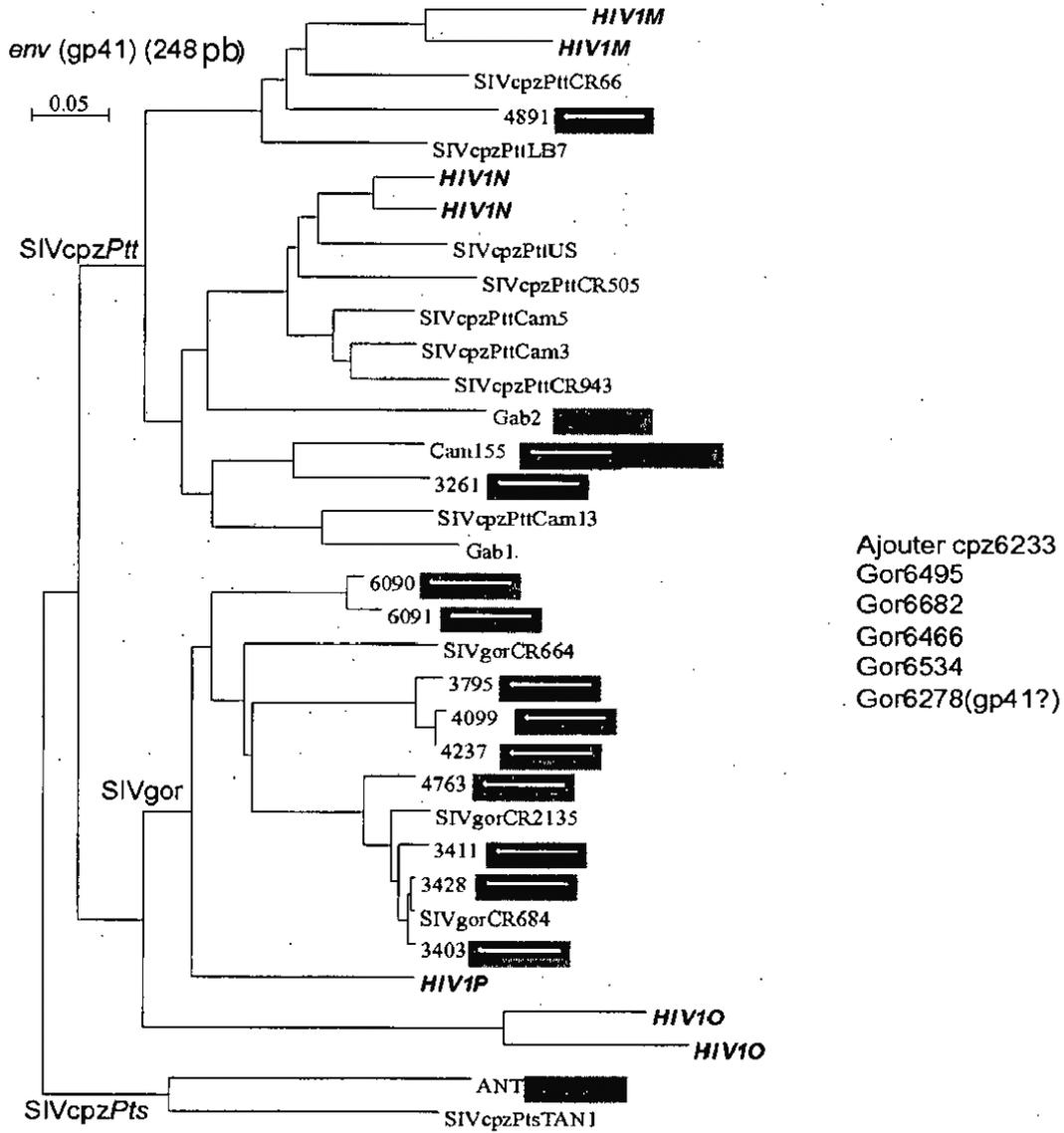
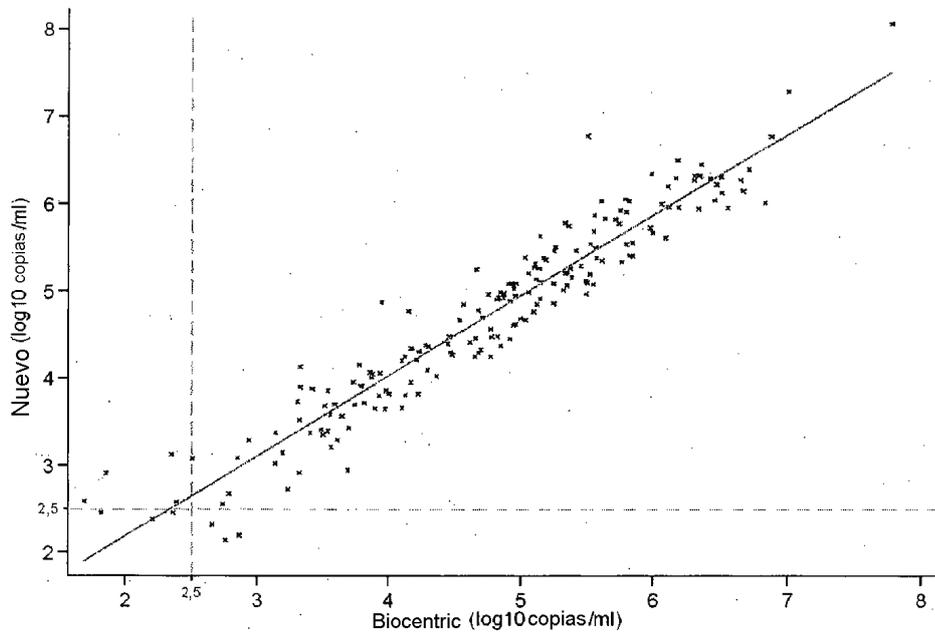


Figura 3

A



B

